



**Universidade Federal de Rondônia – UNIR**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental - PGBIOEXP**  
**Luan Felipe Botelho Souza**

**Análise molecular do vírus da hepatite Delta: desenvolvimento de transcrição reversa-PCR em tempo real e nested PCR-RFLP para quantificação e genotipagem viral.**

Orientadora: Dra. Deusilene Souza Vieira

**Porto Velho-RO**  
**2014**

**Luan Felipe Botelho Souza**

**Análise molecular do vírus da hepatite Delta: desenvolvimento de transcrição reversa-PCR em tempo real e nested PCR-RFLP para quantificação e genotipagem viral.**

Orientadora: Dra. Deusilene Souza Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre.

Porto Velho-RO

2014

*FICHA CATALOGRÁFICA*

**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

B748a

Botelho-Souza, Luan Felipo

Análise molecular do vírus da hepatite Delta: desenvolvimento de transcrição reversa-PCR em tempo real e Nested PCR-RFLP para quantificação e genotipagem viral./ Luan Felipo Botelho Souza, 2014. 80f. : il.

Orientadora: Dra. Deusilene Souza Vieira

Coorientador: Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia/ UNIR, Porto Velho, Rondônia, 2014.

1. Vírus da hepatite Delta. 2. PCR em tempo real. 3. Genotipagem. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.9

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11- 549

**LUAN FELIPO BOTELHO SOUZA**

**Análise molecular do vírus da hepatite Delta: desenvolvimento de transcrição reversa-PCR em tempo real e nested PCR-RFLP para quantificação e genotipagem viral.**

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre, em sessão pública realizada em 25 de fevereiro de 2014.

**Banca examinadora**

---

Dra. Deusilene Souza Vieira  
Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia

---

Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo  
Fundação Oswaldo Cruz - Rondônia

---

Dra. Joana D’Arc Neves Costa  
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPem/SESAU

Dedico esta dissertação à Deus, à minha amada esposa, aos meus pais, familiares e orientadores pela dedicação, incentivo, paciência e apoio constante para minha formação. Sem eles nada disso seria possível.

Muito obrigado!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar grandes bênçãos em minha vida.

À toda equipe do Laboratório Plataforma Técnica, do Ambulatório de Hepatites Virais e do Laboratório de Sorologia da Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia pelo auxílio e amizade. Ao Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) por disponibilizar toda a estrutura de seus laboratórios para realização da pesquisa. Também agradeço aos pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites virais participantes desta pesquisa.

Gostaria de registrar os meus sinceros sentimentos de respeito, admiração, amizade e também pelo profissionalismo e dedicação de toda equipe do Laboratório Plataforma técnica, em especial a minha orientadora Dra. Deusilene Souza Vieira, Msc. Alcione de Oliveira dos Santos, todos os alunos de iniciação científica e os demais alunos de mestrado que contribuíram direto ou indiretamente. Agradeço ao meu coorientador Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo pela contribuição com dedicação, ensino e gentileza.

Agradeço a minha amada esposa Élen Pereira N. Botelho por me suportar em amor com carinho, companheirismo, cuidado, zelo e pela quase que infinita paciência para comigo. Élen, amo muito você. Aos meus pais, Oswaldo Souza Neto e Maria Clei R. Botelho pelo incentivo a busca por conhecimento, apoio nas minhas decisões e estímulo a prosseguir. Aos meus irmãos e amigos que se alegram a cada conquista, Andrews Botelho Regis, Andreia Paula Botelho Regis, Jalusa Lua Botelho Pererira, Aislan Botelho Souza, Hermínio Neto e Marcos Barros Luiz.

## RESUMO

O vírus da hepatite Delta (HDV) é um patógeno que causa uma infecção grave e rapidamente progressiva nos pacientes portadores. A determinação da quantidade e do genótipo do vírus circulante no sangue de pacientes com a infecção pelo HDV é importante para o diagnóstico, monitoramento do tratamento e para oferecer suporte para estudos de acompanhamento da replicação viral no curso da doença. Neste estudo desenvolvemos *in house* um ensaio capaz de detectar e quantificar o vírus da hepatite Delta através de amostras de soro baseando-se em uma Transcrição reversa-PCR em tempo real quantitativa (HDV RT-qPCR) e uma nested PCR-RFLP para a genotipagem do HDV. Para a determinação da carga viral foram produzidos dois calibradores padrão, um cDNA HDV clonado em plasmídeo e um transcrito de RNA HDV. Para a validação este ensaio foram utilizadas 140 amostras clínicas de soro, sendo 100 amostras clínicas de pacientes anti-HDV e antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) reagentes por ELISA, 30 amostras clínicas de doadores de sangue, 5 amostras clínicas mono infectadas pelo vírus da hepatite B (HBV) e 5 amostras mono infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV). Para genotipagem foi estabelecida uma nested PCR-RFLP, utilizando *Xho* I e a *Sma* I para digerir os *amplicons*, os resultados corroboraram com as análises por sequenciamento. O desempenho do ensaio HDV RT-qPCR foi melhor quando utilizado o calibrador padrão HDV baseado em cDNA clonado em plasmídeo linear com uma eficiência de 99,8% e linearidade de  $R^2$  0,97 e uma especificidade de 100% nos ensaios *in vitro*. Este estudo representa o primeiro ensaio HDV RT-qPCR desenvolvido com amostras clínicas do Brasil e oferece um grande potencial para novos estudos de eficácia clínica da terapêutica antiviral para utilização em pacientes com hepatite Delta na região ocidental da Amazônia.

**Palavras chaves:** Vírus da hepatite Delta, RNA HDV, PCR em tempo real quantitativa, Genotipagem.

## ABSTRACT

The hepatitis Delta virus (HDV) is a pathogen that causes a severe and rapidly progressive disease of hepatocytes. The measurement of viral load in the peripheral blood of patients with HDV infections is important for diagnosis, treatment monitoring, and support for follow-up studies of viral replication during the course of the disease. This study reports the development of an assay capable of detecting and quantifying the abundance of HDV particles in serum samples, based on reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and a Nested PCR-RFLP for genotyping of HDV. Two standards for calibration were produced for determining the viral load of HDV: a cDNA cloned into a linear plasmid and a transcribed RNA. For validating this assay, 140 clinical samples of sera were used, comprising 100 samples from patients who tested positive for anti-HDV and hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) by ELISA; 30 samples from blood donors; 5 samples monoinfected with hepatitis B virus (HBV); and 5 samples monoinfected with hepatitis C virus (HCV). The HDV RT-qPCR assay performed better when calibrated using the standard based on HDV cDNA cloned into a linear plasmid, yielding an efficiency of 99.8% and a specificity of 100% in the in vitro assays. For genotyping a nested PCR-RFLP was established using *Xho I* e a *Sma I* to digest the amplicons, the results corroborates the analysis by sequencing. This study represents the first HDV RT-qPCR assay developed with clinical samples from Brazil and offers great potential for new clinical efficacy studies of antiviral therapeutics for use in patients with hepatitis Delta in the western Amazon region.

**Keywords:** Hepatitis Delta vírus, RNA HDV, Quantitative real-time PCR, genotyping.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático de uma partícula viral infectante .....	17
<b>Figura 2.</b> Os três RNAs HDV que se acumulam durante a replicação do genoma.....	18
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de edição do RNA HDV.....	19
<b>Figura 4.</b> Estruturas dos dois tipos de antígeno Delta.....	20
<b>Figura 5.</b> Mecanismo do tipo <i>double-rolling circle</i> e as estruturas sub nucleares envolvidas na replicação viral.....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema do ciclo de replicação e montagem.....	22
<b>Figura 7.</b> Prevalência mundial do HDV e a distribuição geográfica de seus genótipos.....	24
<b>Figura 8.</b> Evolução típica de marcadores sorológicos e virológicos nos cursos naturais da infecção.....	25
<b>Figura 9.</b> Fluxograma para o diagnóstico da hepatite Delta.....	27
<b>Figura 10.</b> As etapas com os respectivos ciclo de temperatura da PCR.....	30
<b>Figura 11.</b> Curvas de amplificação de duas amostras numa PCR em tempo real.....	33
<b>Figura 12.</b> Curva Padrão de uma PCR em tempo real.....	344
<b>Figura 13.</b> Método utilizando corantes intercalantes.....	355
<b>Figura 14.</b> Gráfico esquemático de uma análise da <i>T<sub>m</sub></i> .....	366
<b>Figura 15.</b> Métodos utilizando sondas de hidrólise.....	377
<b>Figura 16.</b> Alinhamento múltiplo através do CLUSTAL W 2.1.....	48
<b>Figura 17.</b> Curva de dissociação da PCR em tempo real utilizando o SYBR Green I.....	499
<b>Figura 18.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da RT-PCR.....	509
<b>Figura 19.</b> Ligação do inserto de 135 pb HDV ao pTZ57R/T.....	50
<b>Figura 20.</b> Cultivo de células recombinantes.....	50
<b>Figura 21.</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da digestão enzimática.....	511
<b>Figura 22.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% do RNA HDV transcrito.....	511
<b>Figura 23.</b> Curva de regressão linear do calibrador HDV padrão de cDNA.....	522
<b>Figura 24.</b> Curva de regressão linear do calibrador HDV padrão de RNA.....	532
<b>Figura 25.</b> Carga viral das amostras de soro.....	533
<b>Figura 26.</b> Eletroforese de gel de Agarose a 1,5% da nested PCR-RFLP.....	565
<b>Figura 27.</b> Eletroforese de gel de Agarose do RFLP dos amplicons da Nested PCR.....	565
<b>Figura 28.</b> Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança.....	576

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais marcadores envolvidos no diagnóstico para infecção pelo HDV .....	28
<b>Tabela 2.</b> Perfil genotípico da digestão com <i>SmaI</i> e <i>XhoI</i> .....	47
<b>Tabela 3.</b> Avaliação do intra-ensaio de repetibilidade com o padrão de cDNA HDV. ....	53
<b>Tabela 4.</b> Avaliação do intra-ensaio de repetibilidade com o padrão de RNA HDV.....	54
<b>Tabela 5.</b> Avaliação do inter-ensaio de reprodutibilidade do padrão de cDNA HDV.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADAR-1</b>	Adenosina deaminase 1
<b>ALT</b>	Alanina amino transferase
<b>Anti-HBc</b>	Anticorpo contra o core do vírus da hepatite B
<b>Anti-HBe</b>	Anticorpo contra o antígeno E do vírus da hepatite B
<b>anti-HDAg</b>	Anticorpo contra o antígeno do vírus da hepatite Delta
<b>Anti-HDV</b>	Anticorpo contra o vírus da hepatite Delta
<b>BLAST</b>	<i>Basic local alignment search tool</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Ct</b>	<i>Cycle Threshold</i>
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>DCC</b>	Domínio <i>coiled-coil</i>
<b>dCTP</b>	Desoxicitosina trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>DLR</b>	Domínio de ligação a RNA
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>Fhemeron</b>	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Rondônia
<b>FRET</b>	Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência
<b>HBeAg</b>	Antígeno E do vírus da hepatite B
<b>HBsAg</b>	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
<b>HBV</b>	Vírus da hepatite B
<b>HCV</b>	Vírus da hepatite C
<b>HDAg</b>	Antígeno do vírus da hepatite Delta
<b>HDAg-L</b>	Antígeno longo do vírus da hepatite Delta
<b>HDAg-S</b>	Antígeno curto do vírus da hepatite Delta
<b>HDV</b>	Vírus da hepatite Delta
<b>ICTV</b>	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
<b>LDD</b>	Limite de detecção
<b>MEGA5</b>	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5</i>
<b>MIQE</b> quantitativas	Informações mínimas para publicação de experimentos com PCR em tempo real
<b>M-MLV</b>	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
<b>NAT</b>	Amplificação de ácidos nucleicos

<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
<b>RFLP</b>	Polimorfismos por comprimento de fragmentos de restrição
<b>RNA Pol II</b>	RNA polimerase II
<b>RT-PCR</b>	Transcrição reversa - PCR
<b>RT-qPCR</b>	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
<b>SINAN</b>	Sistema de nacional de informação e notificação
<b>SLN</b>	Sinal de localização nuclear
<b>SMV</b>	Sinal de montagem do vírus
<b>ssRNA</b>	RNA de fita simples
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de <i>melting</i>
<b>μL</b>	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Histórico</b> .....	15
<b>1.2 O vírus da hepatite D</b> .....	17
1.2.1 Classificação.....	17
1.2.2 Estrutura viral.....	17
1.2.3 RNAs HDV.....	18
1.2.4 Antígeno Delta.....	19
1.2.5 Replicação viral.....	21
1.2.6 Genótipos e epidemiologia.....	23
1.2.7 Curso natural da doença.....	25
1.2.8 Diagnóstico laboratorial.....	26
<b>1.3. Bases moleculares do diagnóstico</b> .....	29
1.3.1 PCR convencional: Pesquisa do RNA HDV.....	29
1.3.2 Aplicação da PCR para Genotipagem do HDV.....	31
1.3.3 PCR quantitativa.....	32
1.3.3.1 Corantes fluorescentes aplicados em PCR em tempo real.....	34
1.3.3.2 SYBR® Green.....	35
1.3.3.3 Sondas de hidrólise.....	37
1.3.4 Validação de uma RT-qPCR.....	38
1.3.4.1 Determinação da temperatura de anelamento, análise da curva de dissociação, análise de eletroforese em gel de agarose e controle negativo.....	38
1.3.4.2 Estabelecimento de uma curva padrão (para avaliar a eficiência PCR).....	39
1.3.5 RT-qPCR para RNA HDV.....	40
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	41
4.1 Amostras clínicas.....	41
4.2 Extração do HDV RNA.....	41
4.3 Transcrição Reversa (RT).....	42
4.4 Desenho e otimização de primers e sonda.....	42
4.5 HDV real-time PCR quantitativa (HDV-qPCR).....	43
4.6 Produção da curva padrão.....	43
4.6.1 Transcrição Reversa-PCR.....	43
4.6.2 cDNA HDV clonado em plasmídeo e RNA transcrito in vitro.....	43
4.6.3 Análise da pureza, integridade e quantificação dos calibradores padrão.....	45
4.7 Desempenho analítico.....	46
4.7.1 Sensibilidade analítica e intervalo dinâmico linear.....	46
4.7.2 Especificidade analítica.....	46
4.7.3 Eficiência da amplificação e linearidade HDV-qPCR.....	46
4.7.4 Reprodutibilidade e Repetibilidade.....	46
4.7.5 Análise estatística.....	46
4.8 Genotipagem do HDV.....	47
4.8.1 HDV nested-PCR.....	47
4.8.2 Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).....	47
4.8.3 Sequenciamento e análise filogenética.....	48
<b>5. RESULTADOS</b> .....	48
5.1 Análise <i>in silico</i> dos primers e da sonda de hidrólise.....	48
5.2 Controle de qualidade da curva padrão.....	49
5.2.1 pureza, integridade e quantificação dos calibradores padrão.....	49
5.3 Desempenho analítico.....	52

5.3.1 Sensibilidade analítica e intervalo dinâmico linear .....	52
5.3.2 Especificidade analítica in vitro .....	53
5.3.3 Eficiência da amplificação e linearidade HDV-qPCR .....	53
5.3.4 Reprodutibilidade e Repetibilidade.....	55
<b>5.4 Genotipagem .....</b>	<b>55</b>
5.4.1 Nested PCR-RFLP .....	55
5.4.2 Análise filogenética .....	56
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>65</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>65</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico

O vírus da hepatite Delta ou D (HDV) foi descoberto em 1977 por Rizzetto e colaboradores, enquanto examinavam biopsias hepáticas de pacientes cronicamente infectados com o vírus da hepatite B (HBV). Este novo antígeno que passou a ser chamado de agente Delta, atualmente conhecido como antígeno Delta (HDAg), foi encontrado nos núcleos dos hepatócitos e os anticorpos contra o HDAg (anti-HDAg) também estavam presentes circulantes no soro, ambos foram detectados por imunofluorescência. Inicialmente foi idealizado que este HDAg seria um novo marcador para HBV. A presença e persistência de anticorpos anti-HDAg também foram associados com a infecção crônica por HBV e para o desenvolvimento de danos progressivos no fígado (RIZZETTO, 1979). Em um estudo ultraestrutural deixou ainda mais claro a associação entre o HDAg e o HBV (CANESE, 1979).

Em seguida, iniciaram estudos para desvendar o papel deste novo agente na infecção pelo HBV. Para tanto foram realizados estudos de inoculação em chimpanzé, no qual eram inoculados os soros de pacientes com HBV e HDAg. Onde foi demonstrado que a infecção pelo HBV associado ao HDAg não se desenvolveu nos chimpanzés que apresentavam previamente títulos de anticorpos contra o HBsAg. Porém, em chimpanzés previamente expostos ao HBV foi verificado um rápido aumento e a persistência da síntese do HDAg do que em animais não expostos previamente ao HBV. A partir deste ponto foi sugerido que o HDAg era, na verdade, um novo marcador de um agente patogênico transmissível, ou uma variante do HBV ou ainda outro agente viral que necessitaria das funções auxiliares do HBV, podendo assim interferir na replicação do HBV (RIZZETTO, 1980a).

Em 1980a Rizzetto e colaboradores, em estudo de soroprevalência, observou a presença do anti-HDAg no soro de pacientes da Itália e de vários lugares do mundo, o que sugeria que o HDAg era amplamente distribuído geograficamente e o estudo também sugeriu uma prevalência em pacientes portadores de HBsAg poli transfundidos.

A descoberta seguinte foi que no soro de chimpanzés este novo antígeno protéico além de associado ao HBsAg também associava-se a um RNA de baixo peso molecular (BONINO et al., 1980), o que supunham tratar-se do material genético desse novo agente. Isso era um forte indício que se tratava de novo agente viral infeccioso. Inicialmente acreditava-se que além da necessidade de encapsulação com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), importante para a

transmissão e acesso aos hepatócitos suscetíveis, este novo vírus exigiria as funções auxiliares do HBV para replicação e expressão de sua proteína. Assim o HDV ficou conhecido por conter o menor genoma entre os vírus de RNA conhecidos (apenas 1.7 Kb), se assemelhando aos vírus de plantas (RIZZETTO, 1980c). O tamanho do genoma do HDV indicou que não se tratava de um vírus convencional, pois era nitidamente menor do que todos os vírus conhecidos de animal. Em 1986 o HDV foi descrito como o primeiro vírus animal identificado com um genoma de RNA circular. RNAs circulares só tinham sido encontrados em vírus de plantas. Notou-se que, além da similaridade de nucleotídeos, o tamanho e suas estruturas secundárias eram semelhantes aos RNAs de viróides e virusóides de plantas superiores, o que sugeriu que HDV pode ter se originado a partir de planta em vez do mundo animal (RIZZETTO, 1985; KOS et al., 1986).

Uma segunda característica única do HDV foi à descoberta, em 1989, que ambas as fitas de RNA genômico e antígenômico continham uma ribozima, uma sequência de aproximadamente 85 nucleotídeos capaz de autoclicar e autoligar (WU et al., 1989; WU & LAI, 1989). As ribozimas também estão presentes em viróides, no entanto ribozimas descritas em vírus de plantas eram diferentes das encontradas no HDV (SALEHI-ASHTIANI, 2006)

Uma das questões existentes nas pesquisas sobre o HDV foi como esse vírus poderia se replicar, em vista do seu genoma muito pequeno que codifica somente o HDAg e que esse genoma não é capaz de codificar uma proteína com funções tão complexas necessárias para a replicação independente. Naturalmente presumiu-se que o HDV explorava o HBV e as funções celulares, utilizando a maquinaria do HBV para viabilizar esta replicação (BRANCH, 1989).

Em 1993 foi publicado por Fu e Taylor um estudo importante para a compreensão do papel do HBV e das células hospedeira (os hepatócitos) na replicação do HDV. Onde hepatócitos nucleados extraídos de cultura de células foram capazes de reproduzir fielmente o genoma completo e o antigenoma sem qualquer fator estranho. O experimento mostrou que o HDV não depende da maquinaria de replicação do HBV, porém necessita apenas do HBsAg o qual permite a propagação da infecção nos hepatócitos. O enigma seguinte era como o HDV se replicava no hospedeiro sem nenhuma polimerase, tendo em vista que seu genoma de RNA necessitaria de uma RNA-polimerase própria. A explicação é que a RNA polimerase II (RNA Pol II) do hospedeiro é induzida ao erro pelo HDV, por causa da estrutura secundária formada pelo RNA viral, tornando possível a leitura e reprodução de novas cópias do RNA HDV. Presumiu-se que a conformação em bastão do RNA viral é reconhecida como o DNA dupla fita pela RNA Pol II (FU & TAYLOR, 1993;

LAI, 2005; CHANG, 2008). A última etapa da replicação é o rearranjo do RNA genômico e antígenômico do HDV que é catalisado pelas suas ribozimas, que clivam o produto da transcrição do genoma/antigenoma para formação de estrutura circular infecciosa (FU & TAYLOR, 1993; TAYLOR, 2006a).

## 1.2 O vírus da hepatite D

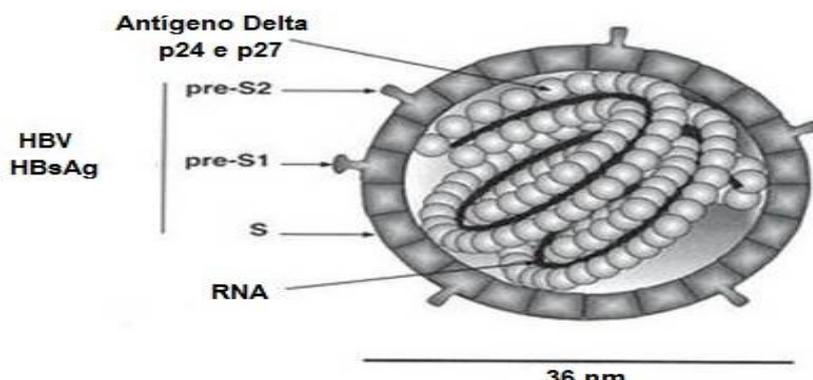
### 1.2.1 Classificação

O HDV foi reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*), como uma nova espécie de vírus de vertebrados, sendo estabelecido um novo gênero chamado Deltavirus para atribuí-lo, porém não lhe foi imputado uma ordem ou família. Pois, embora o HDV tenha muita semelhança estrutural e no modo de replicação aos fitopatógenos, viróides e virusóides, ele é suficientemente diferente para ser atribuído a um gênero separado.

O HDV é popularmente classificado como vírus satélite do HBV, pois baseia-se nos princípios biológicos de que o HDV compõe-se de um RNA incapaz de infectar na ausência do HBV e por depender da ajuda de um vírus constituído de DNA (TAYLOR, 2006b). Porém o HDV não possui similaridade nucleotídica com o seu vírus auxiliar e ainda possui a capacidade de replicar o seu genoma e expressar sua proteína independente, diferente dos vírus satélites comumente encontrados que utilizam a maquinaria do vírus auxiliar. Portanto, taxonomicamente, HDV constitui uma entidade única (LAI, 1995).

### 1.2.2 Estrutura viral

O HDV é constituído de uma pequena partícula esférica envelopada pelo HBsAg medindo aproximadamente 36 nm (figura 1) (BONINO et al, 1986).

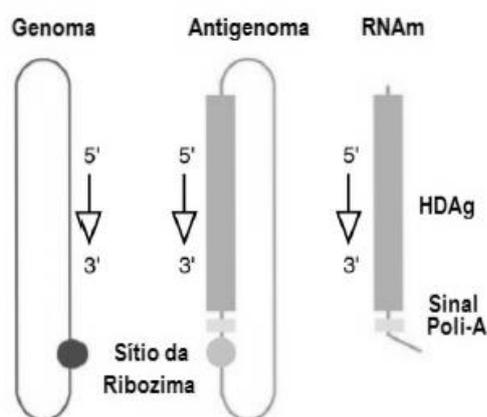


**Figura 1.** Desenho esquemático de uma partícula viral infectante, ou seja, o vírion. O vírion é composto externamente pelo antígeno de superfície do vírus da hepatite B, HBsAg, que é dividido em três proteínas a grande, a média e a pequena (Large, Middle e Small) e seus respectivos genes codificadores, pre-S1, pre-S2 e S. No interior existe o RNA HDV complexado as proteínas do HDV, o antígeno Delta, formando a ribonucleoproteína viral. (Fonte: HIGHLEYMAN, 2009, <<http://www.hivandhepatitis.com>>, modificado).

No interior do vírion há um pequeno genoma de RNA (TAYLOR, 2006; HUGHES et al., 2011). O RNA deste vírus encontra-se associado às proteínas antigênicas do HDV (HDAg) formando uma ribonucleoproteína (RIZZETTO et al., 1980a).

### 1.2.3 RNAs HDV

O genoma é o material genético encontrado no vírion, sendo constituído por um RNA de fita simples (ssRNA), circular e de polaridade negativa de aproximadamente 1,7kb (Figura 2.). Este genoma é único para vírus que infectam animais e está mais relacionado com viróides de plantas do que com patógenos humanos. Devido a grande quantidade de GC quase 74% dos nucleotídeos se auto-complementam intramolecularmente, podendo dobrar-se numa estrutura secundária semelhante a um bastão e é encontrado complexado ao HDAg (WANG et al., 1986; KUO et al., 1988; LAI, 2005; TAYLOR, 2006).



**Figura 2.** Os três RNAs HDV que se acumulam durante a replicação do genoma. O genoma e o antigenoma, possuem ribozimas com os seus sítios de clivagem (indicado por círculos). O antigenoma também contém o gene que codifica a proteína do HDV (HDAg) e um sinal poliadenilado (Poli-A). O gene do HDAg é traduzido em um RNA mensageiro (RNAm) de 800 nucleotídeos, que possui um CAP-3' e uma cauda poli-A-5'. (Fonte: TAYLOR, 2006, Virology, modificado).

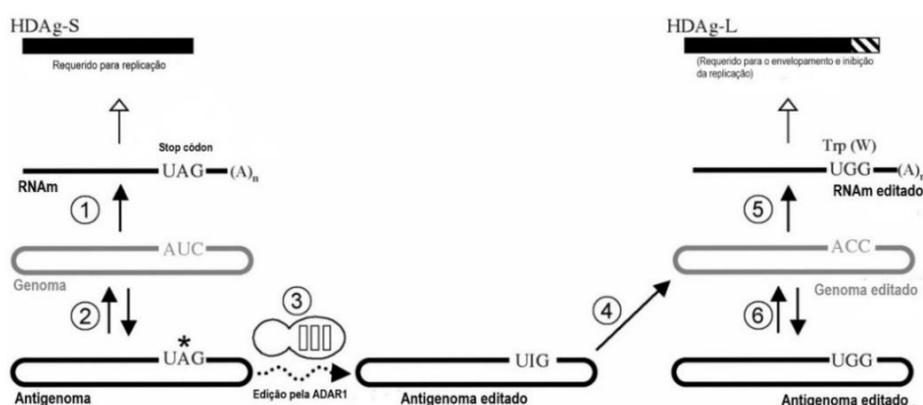
A replicação do genoma é totalmente dirigida por RNA, ou seja, toda a síntese de novos RNAs têm como molde o próprio RNA HDV, não tendo nenhum molde de DNA intermediário na replicação. O HDV sintetiza nos hepatócitos um RNA complementar a partir do seu genoma e

utiliza-o como molde intermediário, este recebe o nome de antigenoma e que jamais foi encontrado no vírion (figura 2.) (LAI, 2005; TAYLOR, 2006). Em 1986, Chen e colaboradores relataram que durante a replicação viral foi detectado um acúmulo de cerca de 300.000 cópias de RNA genômico no interior de cada célula hepática infectada. E esse número diminui 10 vezes para o acúmulo do antigenoma (CHEN et al., 1986).

O genoma e antigenoma contêm um domínio de ribozima cada um com cerca de 85 nucleotídeos (SHARMEEN et al., 1988; FERRE-D'AMARE et al., 1998), que possuem a capacidade de autoclivar e autoligar-se, essa atividade é extremamente necessária para a replicação do RNA viral (BENN, 2006). Em geral, ribozima é uma sequência de RNA que possui uma capacidade auto catalítica, ou seja, que podem catalisar reações, por essa característica também são chamadas de enzimas de RNA. Essas ribozimas são comuns em viróides e virusóides, vírus que infectam plantas (BENN, 1992).

#### 1.2.4 Antígeno Delta

O antígeno Delta é a única proteína codificada pelo HDV. O HDAg é uma fosfoproteína e pode ser encontrada em duas formas de proteínas, uma curta (short) denominada de HDAg-S e outra longa (large) chamada de HDAg-L, com 24 kilodaltons (195 aminoácidos) e 27 kilodaltons (214 aminoácidos) de peso molecular, respectivamente (figura 3) (WANG & CHAO, 2003).

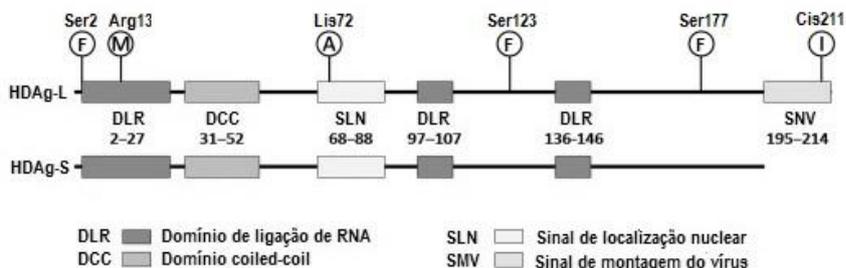


**Figura 3.** Mecanismo de edição do RNA HDV. (1) O RNA genômico (retângulo arredondado em cinza) serve como molde para a síntese de RNAm que é traduzido em HDAg-S, o qual é necessário para síntese de novos RNAs. (2) O genoma serve de molde para a síntese do antigenoma (retângulo arredondado em preto), que também serve de molde para novos RNAs genômicos. (3) Uma fração de RNAs antigenômicos são editados através da enzima adenosina deaminase 1 (ADAR-1) no sítio UAG (stop códon), também chamado sítio Amber/W (seta ondulada e pontilhada), onde uma adenina é substituída por uma inosina. (4) Os antigenomas editados servem do molde para genomas editados (retângulo arredondado editado para ACC). (5) Genomas editados servem para a síntese de RNA mensageiros editados (com UGG – Triptofano em vez de UAG-stop códon) que codificam o HDAg-L, que é o fator fundamental para o envelopamento do vírus e para inibição da replicação. (6) Os genoma e antigenomas editados são sintetizados simultaneamente por

uma mecanismo de replicação chamado de círculo-rolagem. Assim os níveis de edição acumulam os produtos da replicação. Note que o esquema de numeração destina-se a indicar um repertório crescente de atividades que persistem enquanto a replicação ocorre, em vez de uma progressão gradual em que os processos anteriores são encerradas. (Fonte: CASEY, 2012. *Curr Top Microbiol Immunol*, nossa tradução, modificado)

As duas isoformas dessa proteína são idênticas em sequência, exceto que a HDAg-L contém um adicional de 19 aminoácidos na região C-terminal (LAI, 1995). Estudos tem demonstrado que o HDAg-S promove a replicação do RNA enquanto o HDAg-L promove o envelopamento do RNA HDV, para montagem do vírion (WANG et al, 1986; MAKINO et al., 1987; CHAO et al., 1990; GLENN et al., 1991; SHEU et al., 1996; SHEU, 2002).

Durante o ciclo de replicação o antigenoma sofre modificação pós-transcricional onde o gene que codifica o HDAg-S é modificado por uma enzima chamada adenosina deaminase substituindo uma adenina por uma inosina, indiretamente trocando o UAG-stop códon por um UGG-triptofano, conhecido como sítio Amber/W, que dará origem ao gene que codifica o HDAg-L com 19 aminoácidos adicionais (CASEY, 2012).



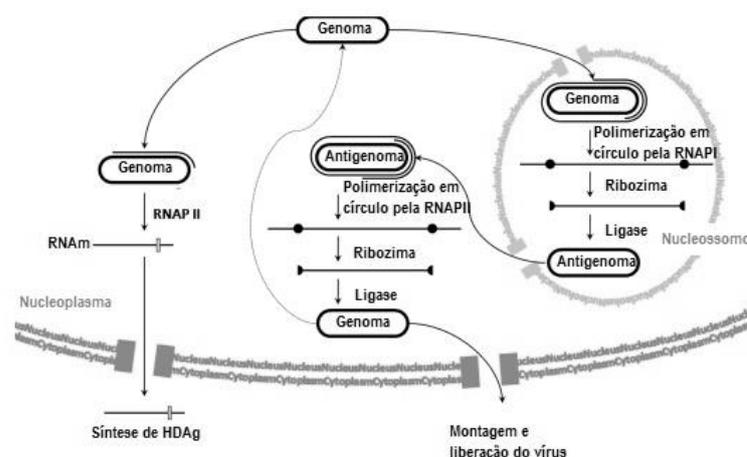
**Figura 4.** Estruturas dos dois tipos de antígeno Delta. (Fonte: LAI, 2005, *Journal of Virology*, modificado).

A diferença entre as duas formas do HDAg está nos 19 aminoácidos adicionais na região C-terminal do HDAg-L. Estas duas formas HDAg possuem vários domínios funcionais em comum, incluindo o domínio de ligação de RNA (DLR), um sinal de localização nuclear (SLN), um domínio coiled-coil (DCC), e um trecho C-terminal da sequência rica em prolina e glicina. Os 19 aminoácidos adicionais do HDAg-L constituem o sinal de montagem do vírus (SMV), que consiste de uma sequência altamente variável e específica para cada genótipo (CHAO et al., 1990). Sendo fundamental para a montagem do vírus, pois serve como sítio de ligação interagindo com o HBsAg/membrana (figura 4) (LAI, 2005).

O HDAg sofre várias outras modificações pós-transcricionais, como por exemplo fosforilação (CHANG et al., 1988; MU et al., 1999), acetilação (MU et al., 2004) e metilação (LI et al., 2004) e, no caso de HDAg-L, isoprenilação (GLENN et al., 1992). A metilação de Arg13, a acetilação da Lis72, e fosforilação de Ser177 e Ser123 foram relacionados com a localização subcelular do HDAg e replicação de RNA (figura 4). A maior parte destas modificações são importantes para as funções de HDAg-S na replicação do RNA HDV que age estimulando diretamente o alongamento da transcrição através da substituição do fator de alongamento repressor de transcrição ligado à RNA polimerase II (LAI, 2005).

### 1.2.5 Replicação viral

O HDV utiliza uma via de replicação chamada, em inglês *de double-rolling circle*, ou duplo rolamento em círculos (figura 5) que é muito semelhante a estratégia utilizada por viróides, virusóides e RNAs satélites semelhantes a viróides (do inglês; *viroid-like satellite RNAs*) (EIRAS et al., 2006). De modo geral, as principais características deste tipo de replicação é a utilização de uma fita de RNA circular como molde, no qual é transcrito por uma RNA polimerase dependente de RNA do hospedeiro ou do vírus auxiliar. Porém no caso do HDV onde a sua célula hospedeira é o hepatócito e o fato de não existir RNA Polimerase dependente de RNA em células eucarióticas, nesta replicação o vírus engana e utiliza a própria RNA Polimerase do hepatócito. Posteriormente as novas fitas de RNA sofrem clivagem catalisada por ribozimas e, finalmente, são ligadas por enzimas da célula hospedeiro (FLORES et al., 2011).

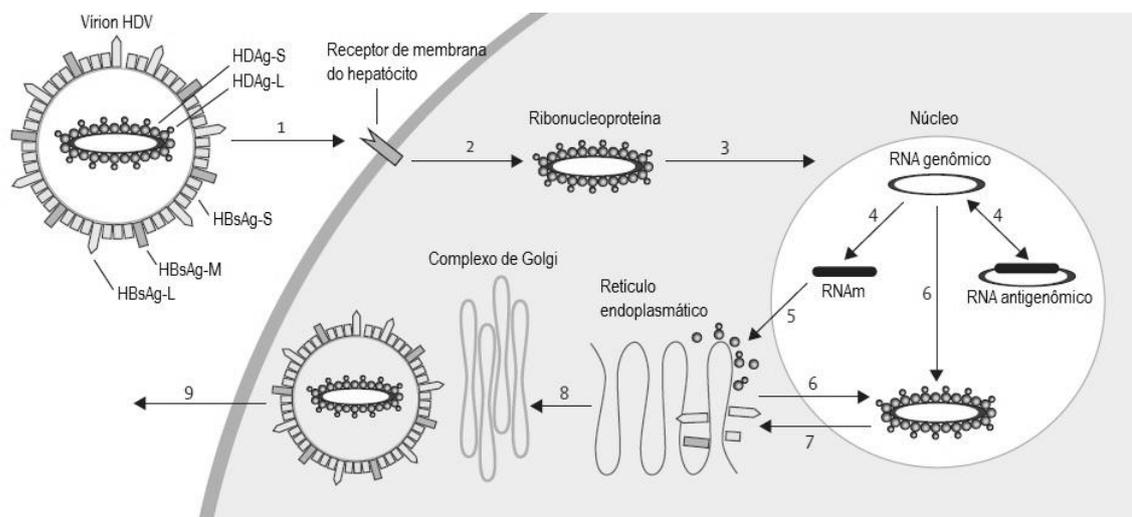


**Figura 5.** Mecanismo do tipo *double-rolling circle* e as estruturas sub nucleares envolvidas na replicação viral. Note que quando RNA genômico serve como molde para a síntese de RNA antigenômico e vice-versa é polimerizado uma fita linear maior que, por sua vez, é clivada pelo sítio da ribozima para retirar sequências excedentes e ligada por ligases do hospedeiro para produzir uma fita circular. (Fonte: PASCARELLA & NEGRO, 2010, Liver International, modificado.)

O ciclo replicativo do HDV (Figura 6) inicia-se com a adesão do vírion através da interação entre o HBsAg-L e o receptor ainda desconhecido do hepatócito. Pelo fato do HDV e o HBV compartilharem o mesmo envelope, acredita-se que os mecanismos de adesão e entrada também sejam comuns entre os dois vírus. Porém sabe-se que o HBsAg-L é fundamental para manter o HBV infeccioso (BARRERA et al., 2005; ENGELKE et al., 2006).

O HBsAg se funde com a membrana plasmática, liberando a ribonucleoproteína no citoplasma da célula. Mediado pelo HDAg através do sítio sinal de localização nuclear (SLN) (ver figura 4), a ribonucleoproteína é importada por importinas celulares para o núcleo da célula (XIA et al., 1992; TAVANEZ et al., 2002; ALVES et al., 2008).

No núcleo, especificamente no nucleoplasma, o RNA genômico é transcrito pela RNA polimerase II (FU & TAYLOR, 1993; MODAHL et al., 2000; LAI, 2005; LI et al., 2006; CHANG, 2008) em RNAm não modificado que, por sua vez, migra para o citoplasma onde é traduzido em HDAg-S (requerido para a replicação do RNA HDV) (Lai, 2005). Ainda no núcleo, mais especificamente no nucleossomo, o RNA genômico é transcrito pela RNA polimerase I (GRECO-STEWART et al., 2009) em um RNA molde complementar, chamado de RNA antígenômico. No nucleoplasma o RNA antígenômico é transcrito pela RNA polimerase II em novos RNAs genômicos (figura 5) (MODAHL et al., 2000; LI et al., 2006).



**Figura 6.** Esquema do ciclo de replicação e montagem. (1) O vírion adere-se ao hepatócito através de uma interação entre o HBsAg-L e um receptor de membrana ainda não caracterizado na célula hospedeira, (2) o vírion entra na célula e perde o envelope. (3) A ribonucleoproteína (RNA HDV complexado ao HDAg) é importada para o núcleo da célula, (4) o RNA genômico é transcrito no núcleo em RNAm e o RNA antígenômico que, por sua vez, serve como molde para novos transcritos de RNA genômico. (5) O RNAm é exportado para o citoplasma, onde ele é traduzido em HDAg-S no retículo endoplasmático, (6) as novas moléculas de HDAg-S retornam para o núcleo da célula para dar suporte a replicação de mais RNA. As duas formas do HDAg se associam aos novos RNA genômicos para formar novas ribonucleoproteínas, (7) que são

exportadas para o citoplasma onde irão interagir com as proteínas do envelope do HBV através do HDAg-L no retículo endoplasmático para formar novas partículas virais. (8) Estas partículas por meio de um brotamento em compartimento intermediários (9) são exportadas do hepatócito através de da rede trans-golgi para reinfectar novas células. (Fonte: HUGHES, 2011, Lancet, modificado.)

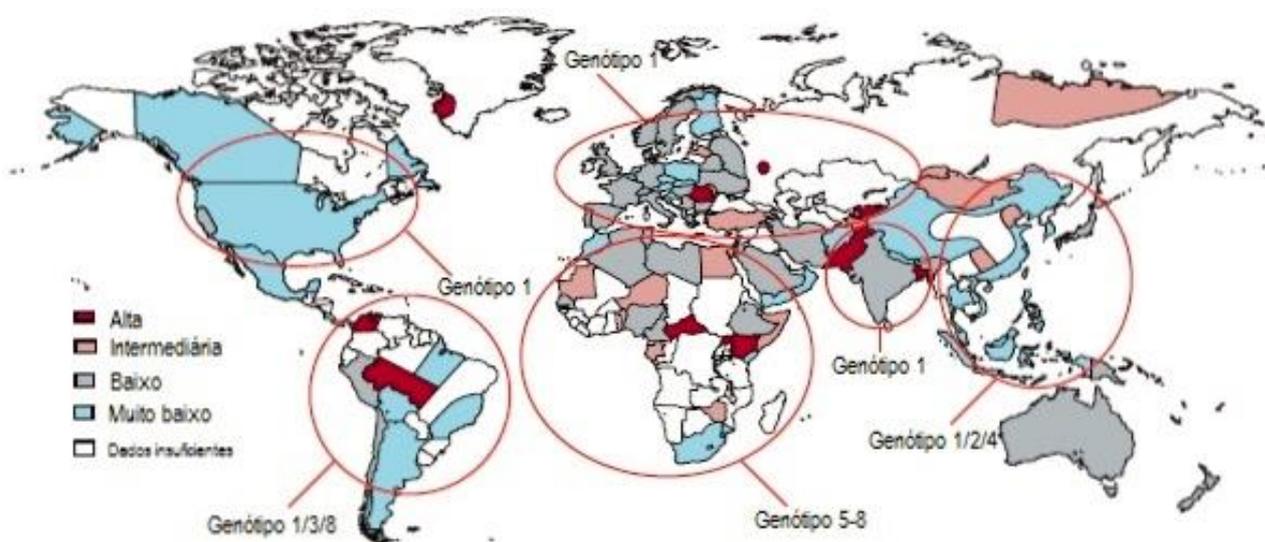
Mas tardiamente, uma fração de RNAs antigenômicos sofrem uma edição pela ADAR1, que servirá de molde para RNAs genômicos editados, conseqüentemente a RNAm editados e, posteriormente, darão origem ao HDAg-L (CASEY, 2012). Ambos os HDAGs novos são encaminhados para o núcleo para associarem aos novos RNA genômicos não editados, formando a uma nova ribonucleoproteína, a qual é exportada para o citoplasma (TAVANEZ et al., 2002) onde, mediado pelo HDAg-L, irão interagir com o HBsAg no retículo endoplasmático para montagem do vírion (HWANG & LAI, 1993; LEE et al., 2004). E por fim ocorre a liberação das novas partículas virais através do complexo de Golgi.

#### 1.2.6 Genótipos e epidemiologia

A definição de genótipo baseia-se na comparação da similaridade entre as sequências de RNA HDV que foram descobertas e caracterizadas até o momento. A porcentagem de similaridade de nucleótidos corresponde diretamente ao número de posições nucleotídeos idênticos entre pares de sequências, dividido pelo comprimento do alinhamento. Devido a pouca atividade revisora da RNA polimerase a sequência genômica do HDV é altamente variável (ROGGENDORF, 2012) podendo existir uma divergência de até 16% dentro do mesmo genótipo e essa variação chega em 20-40% entre os diferentes genótipos (IMAZEKI et al., 1991; CASEY et al., 1993; WU et al., 1998; DÉNY, 2006; HUGHES et al., 2010). Porém essa heterogeneidade não é distribuída uniformemente por todo genoma, mas está localizada na região C-terminal no sinal de montagem do vírus (SMV) no HDAg. Por sua vez a sequência da ribozima e o domínio de ligação ao RNA são altamente conservados (CHAO et al., 1990; LAI, 2005; DÉNY, 2006; HUGHES et al., 2010). A diversidade genética viral está relacionada com a origem geográfica dos isolados (Figura 7), sendo que até o momento foram identificados oito genótipos classificados de HDV-1 à HDV-8 (IMAZEKI et al., 1991; CASEY et al., 1993; WU et al., 1998; RADJEF et al., 2004; DÉNY, 2006; LE GAL et al., 2006; HUGHES et al., 2010).

Dos 350 milhões de portadores crônicos do HBV em todo o mundo , mais de 15 milhões têm evidência sorológica de exposição ao HDV (FARCI, 2003; HUGHES et al., 2010). Tradicionalmente, as regiões com altos índices de endêmicidade são o centro e o norte da África, a Bacia Amazônica, o leste Europeu e Mediterrâneo, o Oriente Médio e partes da Ásia (RIZZETTO et al., 1990). O HDV-1 é onipresente (SHAKIL et al., 1997), porém é frequentemente isolado no

Estados Unidos, Europa e Oriente Médio, mas também já foi isolado na Rússia, na África, Ásia e no Brasil (MAKINO et al., 1987; CHAO et al., 1990; CASEY et al., 1993; SHAKIL et al., 1997; LE GAL et al., 2006; PARANÁ et al., 2006). O HDV-2, anteriormente conhecido como genótipo IIa, é encontrado no Japão, Taiwan e Rússia (IMAZEKI et al., 1991; WU et al., 1998; IVANIUSHINA et al., 2001). O HDV-3 foi isolado na região amazônica (Peru, Colômbia, Equador e Brasil) (CASEY et al., 1993, PARANÁ et al., 2006; GOMES-GOUVEA et al. 2009; ALVARADO-MORA et al. 2011). O HDV-4 (o antigo genótipo IIb) é encontrado em Taiwan e Japão (WU et al., 1998; SAKUGAWA et al., 1999; IVANIUSHINA et al., 2001). Os genótipos HDV-5, HDV-6 HDV-7 e HDV-8 são encontrados na África (RADJEF et al., 2004; LE GAL et al., 2006). Recentemente foi isolado o HDV-8 na zona rural do estado do Maranhão (Brasil) em dois indivíduos nativos (BARROS et al., 2011).



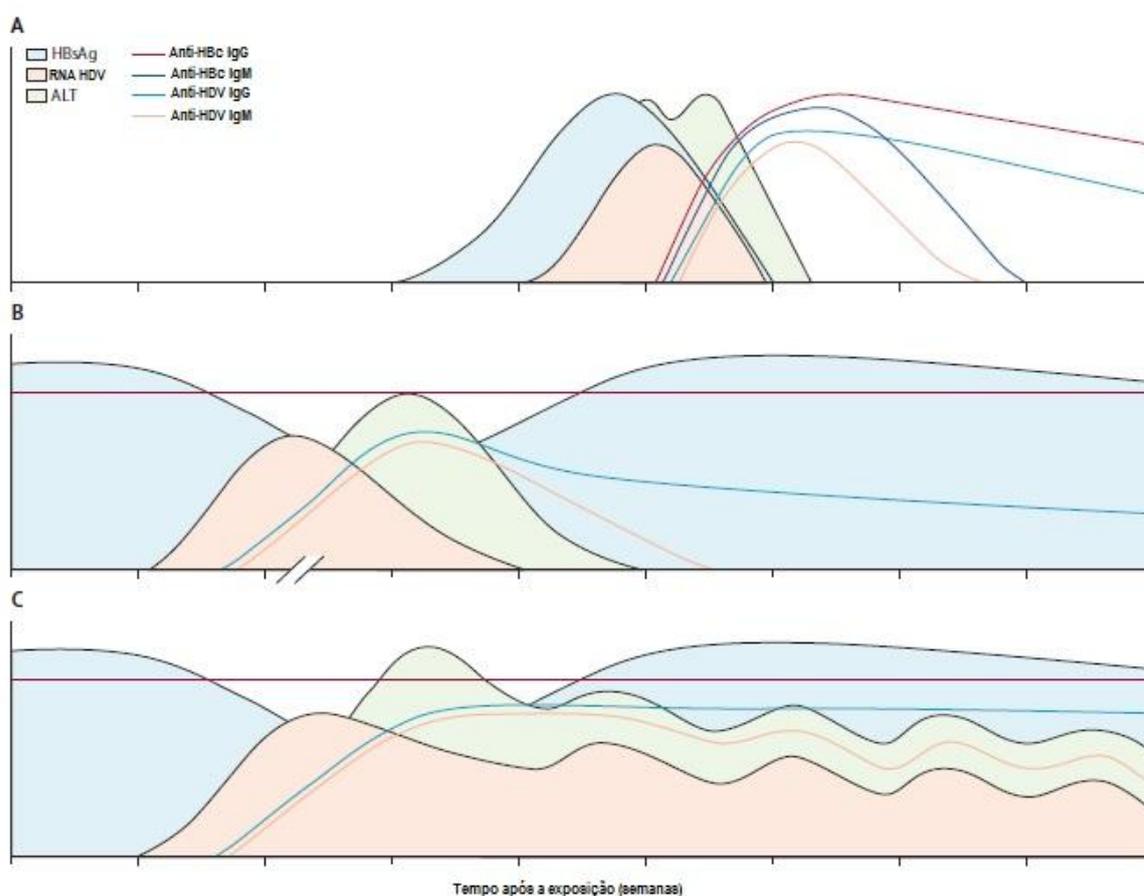
**Figura 7.** Prevalência mundial do HDV e a distribuição geográfica de seus genótipos. (Fonte: HUGHLES, 2011, Lancet, modificado).

O HDV-3 é responsável por epidemias de hepatite grave e fulminante comum no nordeste da América do Sul (CASEY et al., 1993). Estudos mostram que o HDV-3 é prevalente na Amazônia brasileira. Esse genótipo está, aparentemente, relacionado à maior agressividade do HDV (CASEY et al., 1993b; VIANA et al., 2005; PARANÁ et al., 2006; GOMES-GOUVEA et al. 2009; ALVARADO-MORA et al. 2011).

No Brasil segundo o Ministério da Saúde, em 2012, no último boletim epidemiológico das hepatites virais, no período de 1999 a 2011 foram confirmados 2.197 casos de hepatite D notificados no Sistema de informação de agravo e notificação (SINAN) sendo que 79,2% destes casos encontram-se na região Norte do país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

### 1.2.7 Curso natural da doença

A hepatite Delta é uma doença infecciosa viral severa que causa grave inflamação no fígado (SARACCO et al., 1987; LE GAL et al., 2005; FARCI & NEGRO, 2012). Vários estudos têm demonstrado que a infecção crônica pelo HDV conduz a uma doença hepática mais grave do que a monoinfecção crônica causada pelo HBV, com acelerada progressão para fibrose, descompensação precoce por cirrose e aumento do risco de carcinoma hepatocelular (BENSABATH et al., 1987a; BENSABATH et al., 1987b; ROMEO et al., 2009; NIRO et al., 2010; WEDEMEYER, 2010; BUTI et al., 2011) (figura 8).



**Figura 8.** Evolução típica de marcadores sorológicos e virológicos nos cursos naturais da infecção pelo HDV. (A) Coinfecção simultânea com HBV e HDV, o que resulta na eliminação de ambos os vírus, na maioria dos casos. (B) Resultado da superinfecção pelo HDV autolimitada num portador do HBV. A eliminação espontânea de RNA HDV pode levar anos para ocorrer (indicado pela quebra no eixo x) e, em alguns casos, pode acontecer o declínio do HBsAg (não retratado). (C) superinfecção pelo HDV num portador de HBV com replicação viral persistente crônica, o resultado mais comum após a superinfecção. ALT: Alamina amino transferases. (Fonte: HUGHLES, 2011, Lancet, nossa tradução, modificado).

A infecção pelo HDV pode ocorrer de duas formas diferentes: a coinfecção e a superinfecção. A coinfecção é uma infecção simultânea com ambos os vírus HBV e HDV,

cl clinicamente não se distingue da monoinfecção aguda causada pelo HBV. Embora possa ser mais grave que a monoinfecção pelo HBV 95% dos casos de coinfeção em indivíduos adultos resulta numa eliminação viral espontânea (WEDEMEYER 2010). A superinfecção é a infecção pelo HDV em um indivíduo cronicamente infectado com HBV (SMEDILE et al., 1982). Ocasionalmente a superinfecção pelo HDV pode ser autolimitada e neste caso, ocorre a eliminação do RNA HDV em alguns anos. Também pode acontecer a depuração viral quando tratado com terapia antiviral, podendo em alguns casos ocorrer diminuição dos anticorpos contra o HDV e desaparecer o HBsAg no soro. Na superinfecção pelo HDV com replicação viral persistente, comumente é encontrado níveis de RNA HDV detectáveis, Alamina aminotranferase elevada e anticorpos contra o HDV flutuantes e persistentes (HUGHES et al., 2011).

Embora os primeiros estudos identificaram que os genótipos HDV afetam a curso natural da hepatite Delta, os genótipos mais recentemente identificados (HDV-5 ao 8) não são tão bem caracterizados (HUGHLES et al., 2011). Um estudo de Taiwan (SU et al., 2006) mostrou uma menor taxa de remissão e os resultados mais adversos em pacientes com o genótipo 1 do que naqueles com genótipo 2. Pacientes com genótipo 4, muitas vezes têm doença hepática leve (WU 2006), mas uma variante do genótipo 4 na Ilha Miyako, em Okinawa, no Japão, está associada a uma maior progressão para cirrose do que é o genótipo 4 em Taiwan (WATANABE et al., 2003).

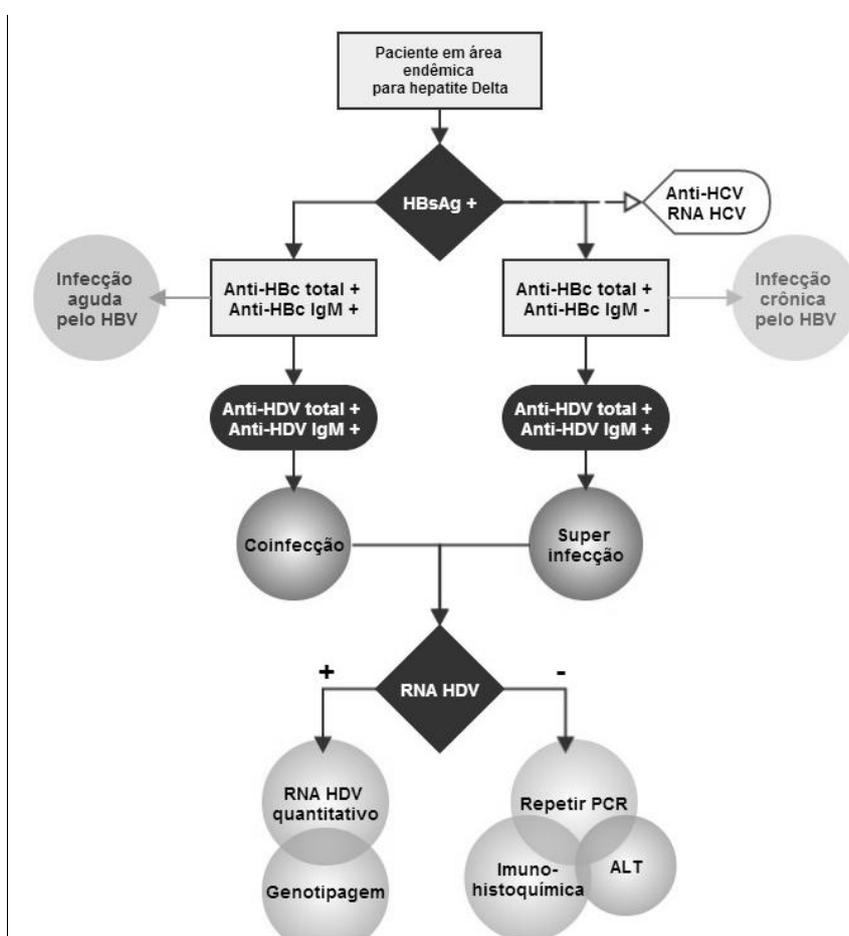
O genótipo 3 tem sido associada a graves surtos de infecção pelo HDV (febre de Lábrea), culminando em insuficiência hepática aguda e morte na Bacia Amazônica da América do Sul (BENSABATH et al., 1987; CASEY et al., 1993, GOMES-GOUVÊA et al., 2009). Surtos de hepatite relacionadas ao genótipo 1 também tem sido relatados, (NIRO et al., 1997), tornando a relação entre o genótipo e o curso natural da doença difíceis de interpretar.

#### 1.2.8 Diagnóstico laboratorial

O primeiro passo para o diagnóstico do HDV é pesquisar os anticorpos contra o HDAg (anti-HDV IgM e IgG) em indivíduos HBsAg positivos. Em pacientes com anti-HDV reagente, o próximo passo é a pesquisa pelo RNA HDV no soro para determinar se a presença do anticorpo contra o HDAg reflete uma infecção ativa persistente (RNA HDV positivo) ou se apenas representa uma cicatriz sorológica decrescente (RNA HDV negativo). No indivíduo com infecção pelo HDV e com doença hepática (alteração das ALT, ver figura 8) é fundamental distinguir o tipo de infecção pelo HDV/HBV, se coinfeção aguda ou se superinfecção em pacientes cronicamente portadores de

HBsAg (Figura 9), pois o prognóstico e gestão dos dois tipos de infecção são diferentes (BUTI et al., 1988; BUTI et al., 1993).

Em indivíduos reagente para HBsAg e em área endêmica para hepatite Delta (como por exemplo a Amazônia ocidental) é recomendado a determinação da fase da infecção pelo HBV (aguda ou crônica) através da pesquisa dos anti-HBc total e IgM. A infecção aguda pelo HBV é caracterizada pela presença anti-HBc IgM, e quando acompanhado ao anti-HDV total e/ou IgM reagentes corresponde a uma coinfeção pelo HDV. A infecção crônica pelo a HBV é caracterizada pela presença do anti-HBc IgG (anti-HBc total reagente com anti-HBc IgM não reagente), e quando acompanhado ao anti-HDV total e/ou IgM reagentes corresponde a uma superinfecção pelo HDV.



**Figura 9.** Fluxograma para o diagnóstico da hepatite Delta.

Tanto na coinfeção quanto na superinfecção pelo HDV faz-se necessário a pesquisa do RNA HDV, através de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), como o objetivo de quantificar o vírus circulante no sangue (PCR em tempo real) e determinar o genótipo (PCR convencional, *restriction fragment length polymorphism* – RFLP ou sequenciamento) (JARDI et al., 1995). Em caso em que o RNA HDV for negativo é recomendado a repetição da PCR e/ou se

necessário o uso de outros métodos de diagnóstico como a imuno-histoquímica por biópsia hepática e bioquímicos como a verificação das ALTs. Também é importante a pesquisa de outras infecções virais como o vírus da hepatite C (HCV) através da pesquisa do anti-HCV e/ou RNA HCV (BUTI et al., 1996).

Os testes sorológicos para o diagnóstico do HDV não reflete uma infecção ativa, pois é baseado na detecção indireta do vírus através da pesquisa por anticorpos contra o HDAg (anti-HDV IgM e IgG) (JARDI et al., 1994). Segundo Smedile e colaboradores (2002) na infecção aguda, por coinfeção, o HDAg pode não ser detectado porque embora apareça cedo, a duração é curta e, geralmente, desaparece com o HBsAg, de forma que a maior parte dos pacientes não evoluem para a forma crônica. Apenas em 25% dos indivíduos é possível detectar o HDAg, provavelmente porque quando este antígeno é liberado no soro, forma imunocomplexos com o anti-HDV, dificultando a sua detecção (SMEDILE *et al.*, 2004) (ver tabela 1).

**Tabela 1.** Principais marcadores envolvidos no diagnóstico para infecção pelo HDV e sua importância

teste	Importância e significado
Anti-HDV IgG contra o	Positivo em todos os indivíduos expostos a HDV e persiste a longo prazo, mesmo depois de a eliminação viral.
Anti-HDV IgM contra	Indica infecção aguda pelo HDV ou infecção crônica pelo HDV com doença ativa. Pode ser usado para determinar pacientes com anti-HDV IgG. Às vezes usado como marcador substituto para a replicação HDV, mas não é 100% disponíveis não são padronizados.
Anti-HDV	Marcador de replicação HDV e infecção ativa, constitui o padrão-ouro para determinar a infecção pelo HDV. Positivo em infecção crônica. Negativo na depuração viral espontânea ou induzida por tratamento. Este teste pode ser falso-positivo em pacientes com outros genótipos HDV.
Anti-HDV RNA	Método útil para prever ou controlar a resposta ao tratamento. Não há associação entre os níveis séricos de RNA e doença hepática.
Anti-HDV	Diferentes genótipos de HDV pode ser associada com os cursos clínicos distintos
Anti-HDV no sangue	Deve ser positivo para infecção pelo HDV. Deve ser positivo para HDV infectividade, está associada com nível de determinação o nível de HBsAg no sangue (HBsAg quantitativo) também pode ser aplicada, pois o clearance erradicação do HDV e, portanto, o monitoramento do nível de HBsAg pode ser útil durante o tratamento antiviral.
Anti-HBV DNA	A indicação do tratamento com inibidores de polimerase do HBV depende da quantidade de DNA HBV detectável no sangue ou na urina, por isso pode ocorrer a supressão pelo HDV. Mas pode ser aumentado, especialmente em pacientes reativar após eliminação espontânea ou induzida por tratamento do HDV.
Anti-HDV e anti-HBe	Cerca de 15 a 20% dos pacientes com infecção pelo HDV é positivo para HBeAg, o qual está associado com a replicação de HBV e a presença de HBV DNA. O teste para anti-HDV pode ser indicado se o tratamento com IFN- $\alpha$ não é possível. O HBeAg é raro em pacientes com anti-HBe detectável.
Anti-HDV e anti-HCV	Até um terço dos pacientes na Europa, com infecção pelo HDV estão coinfectados com HCV. A triagem para HCV deve ser realizada em todos os pacientes com infecção pelo HDV.
Anti-HDV e anti-HBe	Deve ser realizada em todos os pacientes com hepatite D, pois os marcadores não-invasivos de fibrose hepática e esteatose podem prever com precisão o estágio da doença hepática em pacientes com infecção pelo HDV.
Anti-HDV e anti-HBe	Normalmente apresenta-se elevada, mas não se correlaciona bem com o grau de lesão hepática histológica.
Anti-HDV e anti-HBe	Normalmente apresenta-se elevada, mas não se correlaciona bem com o grau de lesão hepática histológica.

O anti-HDV IgM não é um marcador específico de fase aguda. Na hepatite Delta aguda autolimitada, este anticorpo aparece tardiamente (5 a 7 semanas após o início da infecção) mas

está presente em altos títulos durante a infecção Delta crônica (PURCELL, 1984). Em pacientes cirróticos, a alta positividade do anti-HDV IgM indica a manutenção da atividade replicativa do HDV e correlaciona-se com a severidade da hepatopatia embora, algumas vezes, este anticorpo possa ser encontrado na ausência do HDAg no fígado por biópsia hepática (JARDI et al., 1994).

Segundo Wu e colaboradores (1995) nas formas crônicas de hepatite Delta, a presença do HDAg no soro é um fato incomum, enquanto nas formas agudas e fulminantes, o índice de positividade é de 35% e 20%, respectivamente. Na superinfecção, observa-se o declínio do HBsAg enquanto o HDAg permanece no soro (WU et al., 1995).

Na coinfeção o título do anti-HDV total (pesquisa de IgM e IgG) é frequentemente baixo, podendo declinar a níveis indetectáveis após a resolução da doença, não permanecendo nenhum marcador sorológico indicativo de infecção ou exposição ao HDV. Na hepatite Delta aguda, por superinfecção, o anticorpo anti-HDV total aparece tardiamente, apresentando-se em altos títulos quando a infecção torna-se crônica.

### **1.3. Bases moleculares do diagnóstico**

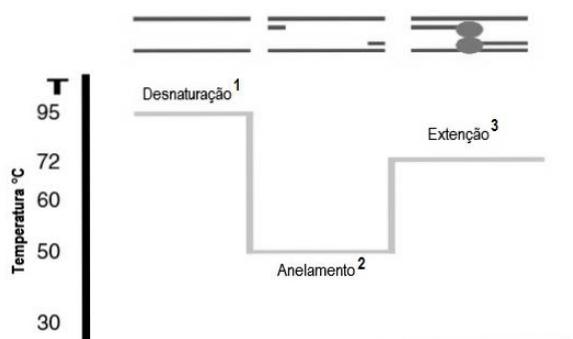
#### **1.3.1 PCR convencional: Pesquisa do RNA HDV**

A pesquisa do RNA HDV pode ser realizada por técnicas moleculares, geralmente é utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). A PCR foi desenvolvida em 1980 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1994.

Mullis e colaboradores (1980) desenvolveu um processo pelo qual o DNA poderia ser multiplicado artificialmente através de ciclos de temperaturas repetidos cuja reação seria catalisada pela DNA polimerase. Esta técnica baseia-se na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA alvo, correspondendo a um mecanismo de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA através de uma *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase. Assim pequenas quantidades de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo assim uma detecção rápida e confiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas, doenças genéticas, entre outras aplicações. Pode ainda ser aplicada no mapeamento genético, na clonagem de genes, em testes de paternidade e na construção de árvores filogenéticas (KOLMODIN & BIRCH, 2002; SANTOS et al., 2004; ISHMAEL & STELLATO, 2008; VALONES, 2009; OLIVEIRA, 2010).

Uma mistura da PCR, contendo a amostra de DNA molde, ou seja, amostra a ser investigada (template), a Taq DNA polimerase, um par de primers, os Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP's), o tampão e o cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), passa por três etapas:

- *Desnaturação*. O DNA-alvo se desnatura pelo calor ( $94-96^{\circ}C$ ), quebrando as pontes de hidrogênio que unem a dupla fita de DNA, de modo a separar as duas fitas de DNA.
- *Anelamento ou hibridação*. Os primers são oligonucleotídeos iniciadores que se anelam por complementariedade através de ligações não covalentes de hidrogênio (pontes de hidrogênio) ao DNA alvo desnaturado. Para permitir essa associação a temperatura geralmente varia de  $50$  e  $65^{\circ}C$ .
- *Extensão*: A Taq DNA Polimerase inicia a polimerização, ou seja, a adição dos nucleótidos trifosfatados – dNTP's (dATP - desoxiadenosina trifosfato; dTTP - desoxitimidina trifosfato; dGTP - desoxiguanosina trifosfato e dCTP - desoxicitosina trifosfato) que estão livres e em excesso na solução da reação a partir dos primers, assim sintetizando novos fragmentos de DNA complementar ao DNA-alvo. O produto da PCR com milhões de novas cópias de DNA é chamado de *amplicons*. Geralmente esta etapa ocorre na temperatura de  $72^{\circ}C$  (KOLMODIN & BIRCH, 2002; SANTOS et al., 2004; ISHMAEL & STELLATO, 2008; VALONES, 2009; OLIVEIRA, 2010).



**Figura 10.** As etapas com os respectivos ciclo de temperatura da PCR. (1) A temperatura é aumentada para cerca de  $95^{\circ}C$  para desnaturar o DNA de fita dupla, (2) a temperatura é baixada para permitir que os primers se anelem e (3) por fim a temperatura é ajustada a  $72^{\circ}C$  para deixar a Taq polimerase alongue a novas fitas a partir do primers (Fonte: KUBISTA, 2006, Molecular Aspects of Medicine, modificado).

Este ciclo de temperatura é repetido por várias vezes, entre 25 a 45 vezes, o que leva a uma amplificação do DNA-alvo de forma exponencial, elevando o número de cópias desse DNA-

alvo. O ritmo de variação da temperatura, o tempo de incubação e o número de vezes que cada ciclo se repete são controlados por um termociclador (MACKAY, 2002).

A separação do produto da PCR convencional é através da técnica de eletroforese, que consiste numa técnica de separação de moléculas por migração em gel de agarose quando submetidas a uma diferença de potencial. As moléculas se separam de acordo com seu tamanho. Quanto maior o tamanho da molécula menor é a migração, enquanto, as menores migram mais rapidamente através do gel de agarose. A revelação é através de fluoróforos intercalantes que marcam o DNA ligando entre as pontes de hidrogênio, e quando excitado por luz ultravioleta emite fluorescência, como por exemplo o gel red (KOLMODIN & BIRCH, 2002; SANTOS et al., 2004; ISHMAEL & STELLATO, 2008; VALONES, 2009; OLIVEIRA, 2010).

A pesquisa do RNA do HDV tem importância fundamental no diagnóstico da hepatite Delta. É importante lembrar que o HDV possui o material genético de ácido ribonucléico (RNA) por isso é aplicado uma variação da PCR chamada RT-PCR (Transcrição Reversa-PCR), na qual o RNA HDV é convertido em DNA complementar (cDNA) através da técnica de transcrição reversa (RT) utilizando a enzima Transcriptase Reversa (HEID *et al.*, 1996) antes de submeter a uma PCR.

### 1.3.2 Aplicação da PCR para Genotipagem do HDV

A PCR-Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), em inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*, é uma variação da PCR convencional que pode ser aplicada para determinação do genótipo do HDV (WU, et al., 1995; 1998; WANG & CHAO, 2005; CHAO, et al., 2006; RAMIA, et al., 2007; MIRSHAFIEE, et al., 2009). Esta técnica está baseada na pesquisa de polimorfismos através da análise do tamanho do fragmento resultante de digestão enzimática de *amplicons*. A digestão enzimática de *amplicons* é mediada por enzimas endonucleases bacterianas recombinantes que possuem a capacidade de clivar DNA dupla fita em sequencias específicas (NATHANS & SMITH, 1975; LOENEN, et al., 2013). A análise do RFLP geralmente é realizada através da eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida.

Outra aplicação da PCR convencional é o sequenciamento dos *amplicons*. Os fragmentos da amplificados na PCR são sequenciados, comparados como outras sequencias do HDV depositadas nos bancos de dados através de análises filogenéticas para a determinação dos genótipos do HDV (CHAO, et al., 1990; ZHANG, et al., 1996; SHAKIL, et al., 1997; RADJEF, et al.,

2004; LE GAL, et al., 2006; GOMES-GOUVEA, et al, 2008; MAKUWA, et al., 2009; ALVARADO-MORA, et al., 2011)

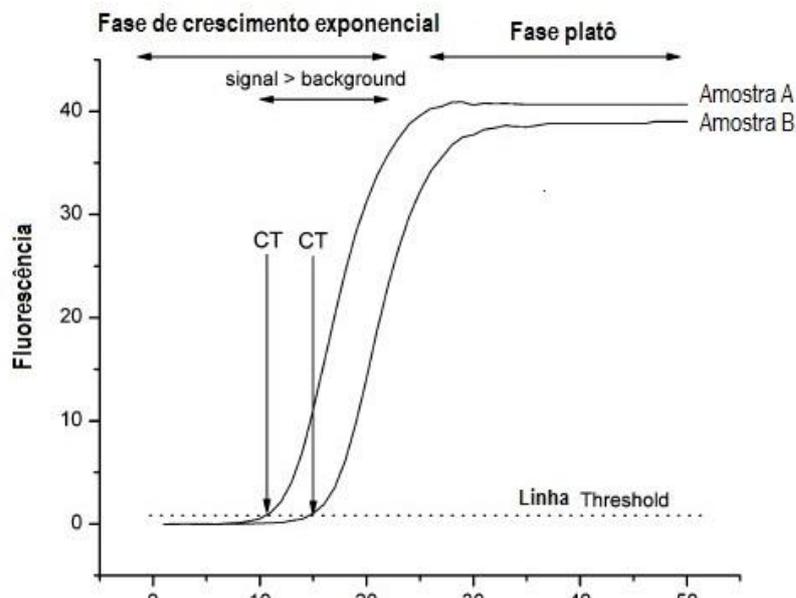
### 1.3.3 PCR quantitativa

A técnica PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) é uma evolução da PCR convencional que possibilita a monitoramento da reação e da quantificação de ácidos nucleicos com maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão. Esse monitoramento da amplificação, o aumento do números de cópias do DNA-alvo, em tempo real tem sido possível graças os primers marcados com fluoróforos chamados de sondas ou por fluoróforos intercalantes a produtos de amplificação com moléculas fluorogênicas. A velocidade de uma qPCR é menor, pois possui ciclos com tempos reduzidos, não necessita de procedimentos pós-PCR para revelação (eletroforese) da reação (MACKAY et al., 2002; NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004; DEEPAK et al., 2007).

A qPCR necessita de uma molécula fluorescente chamada de *repórter* que se liga ao produto formado na PCR e revela a sua presença por fluorescência. O *repórter* gera um sinal de fluorescência, que reflete a quantidade de produto formado. Durante os primeiros ciclos da PCR o sinal é fraco e não pode ser distinguido, à medida que a quantidade de produto se acumula o sinal fluorescente inicial se desenvolve aumentando exponencialmente, gerando um gráfico da curva da amplificação. Posteriormente os níveis de emissão de sinal satura, e isso pode estar relacionado com os primers, reporter ou os dNTPs. Além disso, o número de moléculas de Taq DNA polimerase pode ser limitativo, no caso em que a amplificação exponencial entra em uma fase de amplificação linear (fase platô). É importante notar que, em uma qPCR típica todas as curvas de amplificações alcançam o mesmo nível de saturação (figura 11).

Por isso, uma PCR convencional de ponto final não nos dizem nada a respeito da concentração inicial de moléculas do DNA-alvo que estavam presentes nas amostras, pois ele é somente qualitativo (só distingui um resultado positivo ou negativo de uma amostra). Por outro lado, as curvas de amplificação são separados na fase de crescimento exponencial da reação (figura 11), então é esta fase que reflete a diferença na concentração inicial de DNA-alvo nos amostras.

A diferença na concentração inicial é quantificada por comparação do número de ciclos de uma PCR necessários para que as curvas de amplificação alcance um nível de sinal de fluorescência mínimo ou limiar específico (chamado de *threshold*). O número de ciclos necessários para o sinal de amplificação alcançar o limiar é chamado de *CycleThreshold* (*Ct*), figura 11.



**Figura 11.** Curvas de amplificação de duas amostras numa PCR em tempo real. O nível do *threshold* é ajustado de modo suficientemente acima do *background* e o número de ciclos necessários para alcançar o *threshold*, CT. (Fonte: KUBISTA, 2006, Molecular Aspects of Medicine, modificado)

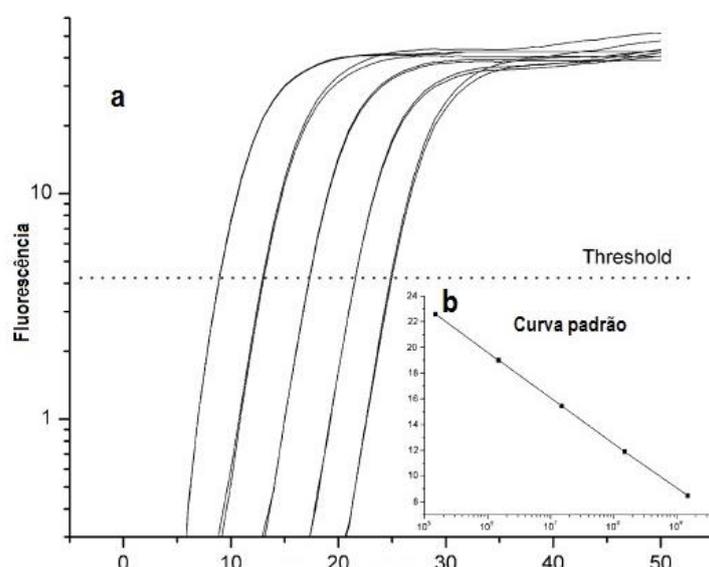
As curvas de amplificação são dispostas paralelamente na fase de crescimento exponencial da reação e o ajuste do nível do *threshold* pode ser realizado por diferentes softwares, métodos e algoritmos, porém seu ajuste pode ser feito manualmente. Por isso, deve-se evitar comparar valores Cts individuais entre os experimentos, e incluir uma amostras de referência por ensaio para o qual todas as outras curvas de amplificação possam ser relacionado (KUBISTA, et al., 2006).

Uma característica essencial de uma PCR que deve ser avaliada é a eficiência. Então assumindo que uma PCR é 100% eficiente duplica o número de DNA-alvo em cada ciclo, a proporção entre o número inicial de cópias de DNA-alvo em duas amostras (A e B) (figura 11), em que a curva de amplificação da amostra A aparece quatro ciclos mais tarde do que a amostra B, ou seja, é necessário quatro ciclos de PCR adicionais para atingir o mesmo nível *threshold*, logo a amostra A deve ter contido inicialmente  $(1+1)^4$  ou  $2 \times 2 \times 2 \times 2 = 16$  vezes menos moléculas de DNA-alvo que a amostra B. Assim o sinal da amostra que continha inicialmente menos moléculas requer maior número de ciclos de amplificação para alcançar o *threshold* e, portanto, se desenvolve mais tarde (figura 11). Assim teríamos a seguinte equação,  $[N_0]_A/[N_0]_B = 2^{(Ct_B - Ct_A)}$  (RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003; KUBISTA, et al., 2006).

No caso de uma PCR com uma eficiência de 90% (0,9), o que é bastante comum quando se utiliza as amostras biológicas. A diferença entre as duas amostras é de 4 ciclos de amplificação, em seguida, reflete uma relação de proporcionalidade de  $(1 + 0,9)^4 = 13$  entre os números iniciais de

cópias de moléculas de DNA-alvo das amostras B e A. 16 e 13 vezes são estimativas bastante diferentes, por isso a importância de estimar a eficiência de uma qPCR. Assim teríamos a seguinte equação,  $[N_0]_A / [N_0]_B = (1 + E)^{(Ct_B - Ct_A)}$  (RUTLEDGE E CÔTÉ, 2003; KUBISTA, et al., 2006).

A eficiência de um ensaio de PCR pode ser estimada a partir de uma curva padrão baseada em diluição seriada de um calibrador padrão conhecido, que pode ser um produto de PCR purificado ou um plasmídeo purificado contendo o DNA-alvo (RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003). Os valores dos Cts das diluições do padrão são mensurados, e representados graficamente versus o logaritmo da concentração das amostras, número de cópias da DNA-alvo ou contra fator de diluição (figura 12) (RUTLEDGE & CÔTÉ, 2003; KUBISTA, et al., 2006).



**Figura 12.** Curva Padrão de uma PCR em tempo real. (a) As curvas de amplificação da PCR em tempo real, mostrados em escala logarítmica para cinco amostras do padrão diluído. Os pontos de cruzamento com a linha de limite são os valores do CT. (b) No eixo Y encontra-se os valores dos Cts que são correlacionados com o logaritmo do número inicial de cópias de DNA-alvo nas diluições do padrão, no eixo X. (Fonte: KUBISTA, 2006, Molecular Aspects of Medicine, modificado).

A diluição seriada do padrão, ou seja, a curva padrão proporciona uma boa estimativa da eficiência do ensaio de PCR. Mas estes padrões purificados não refletem os efeitos de uma amostra biológica real, pois as amostras biológicas são complexas e podem conter substâncias inibidoras, que não estão presentes nos padrões baseado em modelo purificado, e isto pode reduzir a eficiência da PCR.

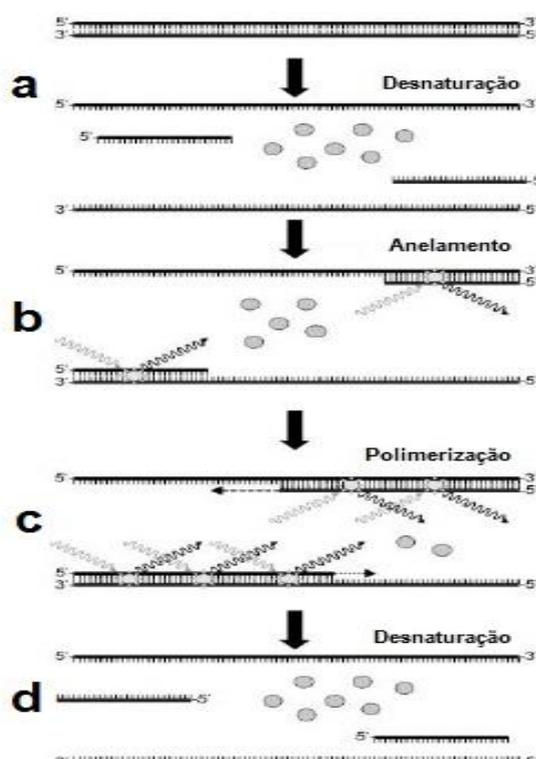
### 1.3.3.1 Corantes fluorescentes aplicados em PCR em tempo real

Diferentes fluoróforos ou moléculas fluorogênicas (chamados de *repórters*), moléculas que emitem fluorescência em um comprimento de onda específico, são usados na qPCR para a

revelação dos *amplicons*. Existem dois tipos de *repórters*; as sondas que é um primer marcado com sequências específicas; e os marcadores não específicos, ou intercalantes, que emitem fluorescência após se intercalarem em moléculas de DNA dupla fita (MACKAY et al., 2002 e NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

### 1.3.3.2 SYBR® GREEN

Um dos principais e mais populares fluoróforos intercalantes é o SYBR® Green I, um corante assimétrico de cianina, que praticamente não tem nenhuma fluorescência quando estão livres em solução devido ao sistema aromático com nitrogênio, assim convertem a energia de excitação em calor que se dissipa no solvente. Porém estes corante tornam-se fluorescentes quando se ligam á DNA, qPCRs que utilizam o SYBR® Green pode ser menos específicos pelo fato de se ligar inespecificamente a qualquer DNA dupla fita (MACHAY et al., 2002).

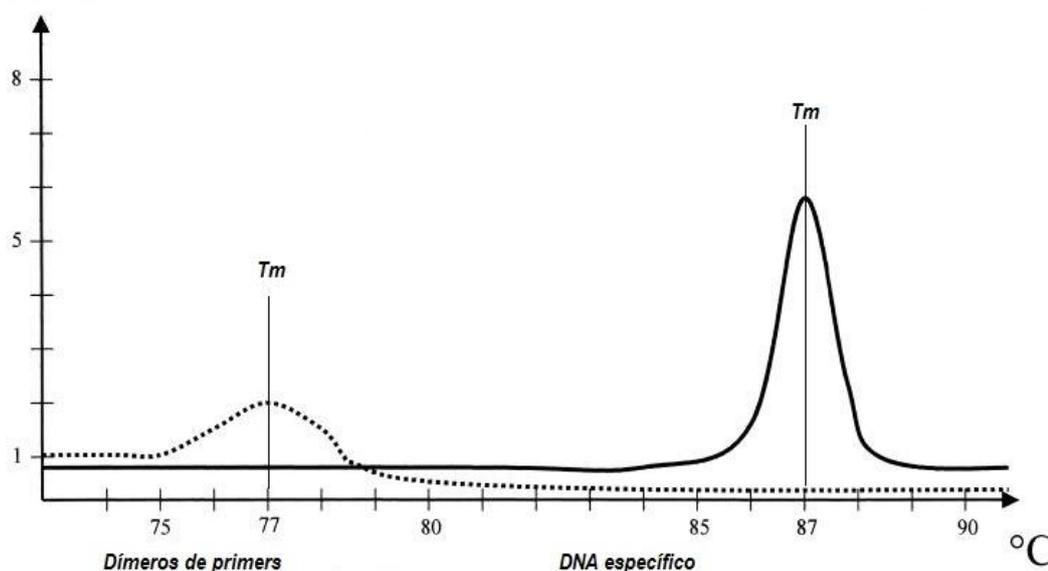


**Figura 13.** Método utilizando corantes intercalantes. (A) Durante a desnaturação, o SYBR Green I livre na solução apresenta pouca fluorescência. (B) Na temperatura de anelamento, algumas moléculas de SYBR Green I se ligam ao primer/DNA-alvo de cadeia dupla, resultando na emissão de luz por excitação. (C) Durante o passo de polimerização, uma quantidade maior de moléculas de SYBR Green I se ligam ao novo DNA sintetizada, e o aumento na fluorescência podem ser monitorizadas em tempo real. (D) Na desnaturação, as moléculas de SYBR Green I são liberadas e o sinal de fluorescência regressa ao background (Fonte: BUSTIN, 2000, Journal of Molecular Endocrinology, modificado).

Na PCR com estes corantes intercalantes, a fluorescência aumenta com o aumento do números de novos DNA dupla fita produzidos (figura 13). Uma das desvantagens do uso desse tipo

de corante intercalante é que ele se liga á qualquer fita dupla de DNA e não apenas ao DNA-alvo, neste caso podendo gerar resultados falso positivo, e existe também uma restrição na ligação desses corantes em regiões *minor grooves* e nas rotações ao redor do grupo metino na cadeia de DNA, podendo subestimar ou gerar resultados falso negativos.

Eles emitem um sinal de fluorescência na presença de qualquer DNA de dupla fita, inclusive na presença de dímeros de primers indesejados na reação. A formação de dímeros de primers interfere com a formação dos produtos de DNA específicos, devido à competição de reagentes das duas reações e pode levar a leituras errôneas. A produção de produtos de DNA inespecíficos pode ser controlado através da análise da curva de dissociação, também conhecida como *melting curve*, dos produtos. A fluorescência é medida em função da temperatura, ou seja a fluorescência diminui com o aumento da temperatura. Então na PCR, o aumento da temperatura desnatura, separando os produtos de DNA dupla fita, neste momento o corante se desliga e a fluorescência diminui rapidamente. Esta temperatura, recebe o nome de temperatura de *melting* ( $T_m$ ) - a temperatura na qual 50% das moléculas primer/DNA estão desnaturadas (ou desemparelhadas). Cada produto tem um temperatura de dissociação específica, o que diferencia o produto-alvo de produtos inespecíficos. Dado que os produtos de dímeros de primers são tipicamente mais curto do que os produto de DNA-alvo, que dissociam a uma temperatura mais baixa e a sua presença é facilmente reconhecido por análise da curva de dissociação (figura 14) (BUSTIN, 2000; KUBISTA, 2006).

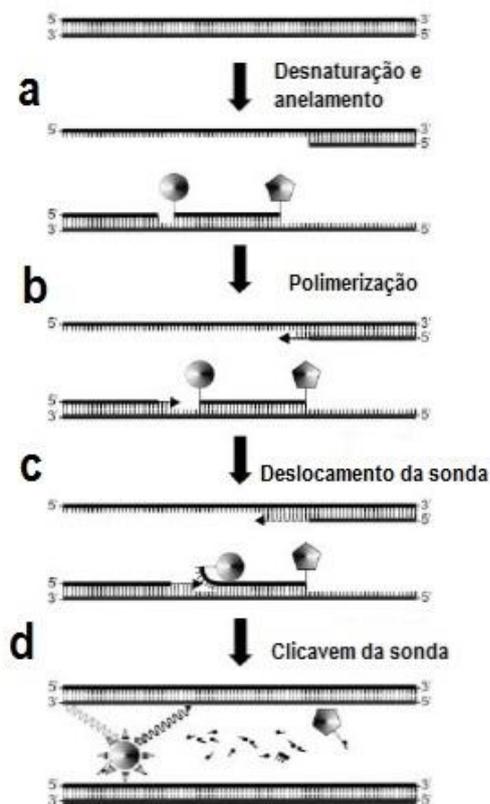


**Figura 14.** Gráfico esquemático de uma análise da  $T_m$  (ou dissociação) ao final de uma PCR. Dímeros de primers apresentam uma  $T_m$  de 77 °C que é perceptivelmente diferente da  $T_m$  da amplificação do DNA pesquisado específico, com uma  $T_m$  de 87 °C. (Fonte: PANG, 2004, Journal of Clinical Microbiology, modificado)

### 1.3.3.3 Sondas de hidrólise

Os primers marcados com fluoróforos, chamados de sondas Taqman ou sondas FRET, são mais comumente usados em qPCR baseiam-se em Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET). Nas extremidade 5' da sonda há um fluoróforo que emite fluorescência, chamado de *Repórter*, e na outra extremidade há um fluoróforo supresor, chamado de *Quencher*, que dispersa a energia em forma de calor, em vez de fluorescência (figura 15) (MACKAY et al., 2002).

O método aplicado na qPCR usa a atividade 5' exonucleásica da Taq DNA polimerase, a sonda hibridizada ao DNA-alvo é degradada na fase de extensão da PCR, resultando no aumento da emissão fluorescente que é proporcional à amplificação da amostra. Na degradação da sonda a emissão da energia fluorescente pelo *repórter* não é mais absorvida de forma eficiente pelo *quencher*, elevando a emissão de fluorescência (HEID et al., 1996).



**Figura 15.** Métodos utilizando sondas de hidrólise. (a) Primeiro passo a desnaturação e anelamento de primers e da sonda (b) Inicia-se a polimerização e a sonda ainda está intacta, e os dois fluoróforos estão próximos, o quencher (pentano) suprime o sinal de fluorescência do repórter (círculo). (C) A polimerase desloca e (d) hidrolisa a sonda. O repórter fluorescente é libertado perdendo a proximidade com o quencher, e a fluorescência é detectada (Fonte: BUSTIN, 2000, Journal of Molecular Endocrinology, modificado).

A técnica de PCR em tempo real permite detectar poucas cópias do genoma viral no soro, pois descarta a necessidade de métodos que prolonguem a revelação do ensaio, como por exemplo, a eletroforese. Além disso, permite a visualização da detecção ainda durante o ensaio, e vem sendo empregada para determinação da carga viral do vírus HDV devido a sua rapidez, precisão e exatidão (YAMASHIRO et al., 2004).

#### 1.3.4 Validação de uma RT-qPCR

Um ensaio de qPCR validado é aquele que foi avaliado quanto um gradiente ideal de temperatura de anelamento dos primers, a eficiência da reação e a especificidade usando um controle padrão. Isto deve assegurar que as condições da reação, tampões e dos primers foram otimizados e que as amostras de cDNA não estão contaminados com inibidores de PCR. Para nortear as qPCR e RT-qPCR existem guias de orientação para tentar normatizar as informações mínimas para a validação e publicação de experimentos com PCR em tempo real quantitativas (*MIQE Guidelines – Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009; BUSTIN et al., 2010a; BUSTIN, 2010b, TAYLOR et al., 2010; JOHNSON et al., 20013; TAYLOR et al., 2014).

##### 1.3.4.1 Determinação da temperatura de anelamento, análise da curva de dissociação, análise de eletroforese em gel de agarose e controle negativo

Um dos passos mais importantes na validação de uma PCR é avaliação da temperatura de anelamento dos primers. É decisivo que os primers esteja otimizados a uma temperatura adequada anelarem eficientemente no seu DNA-Alvo, de modo a impedir ligações inespecíficas e a formação de dímeros de primers. O caminho mais rápido para determinar a temperatura ideal é a utilização de um termociclador que possibilita a realização do um gradiente de temperatura. Uma faixa de temperaturas devem ser testadas e devem ser calculadas a partir da  $T_m$  (TAYLOR et al., 2010).

É importante verificar a especificidade da qPCR por análise dos *amplicons* através da eletroforese em gel de agarose. A análise da curva de dissociação, realizada no final dos ciclos PCR, deve ser utilizada para confirmar a especificidade dos primers. A curva de dissociação deve exibir um único pico agudo (Figura 14). Além disso, as amostras devem ser submetidas a eletroforese gel de agarose ou gel de poliacrilamida, para confirmar se o fragmento amplificado é do tamanho esperado (TAYLOR et al, 2010). É sugerido a realização dos ensaios a inclusão uma duplicata do controle negativo (amostras sem o DNA-Alvo) para avaliar se os reagentes estão livres de contaminação com o DNA-Alvo (BUSTIN, 2010b; TAYLOR et al., 2010).

#### 1.3.4.2 Estabelecimento de uma curva padrão (para avaliar a eficiência PCR)

A eficiência de um PCR é uma medida da velocidade a que a polimerase converte os reagentes (dNTPs, oligonucleotídeos e DNA molde) em novas moléculas de DNA-Alvo. O aumento máximo do fragmento amplificado por ciclo é de 2 vezes o que representa uma reação que é 100% eficiente. É importante determinar a eficiência da reação, uma vez que esta serve de parâmetro, pois a mesma pode oferecer um indicativo de problemas com o qPCR que podem causar resultados errôneos. A baixa eficiência de reações (<90%) pode ser causada por contaminação com inibidores da Taq DNA polimerase, temperatura de anelamento abaixo ou acima do ideal, Taq polimerase inativa, primers mal desenhados ou DNA-Alvos com estruturas secundárias. Uma exagerada eficiência da reação (>110%) é geralmente o resultado de dímeros de primers ou de amplificação de sequências inespecíficas. As causas mais comuns de uma exagerada ou baixa eficiência de reação são pipetas mal calibradas a má técnica de pipetagem (BUSTIN 2010a; TAYLOR et al., 2010).

Uma curva padrão é geralmente usada para determinar a eficiência da reação de qualquer qPCR. Normalmente o padrão utilizado é um *amplicon*, ou seja, um fragmento amplificado da amostra (uma pequena parte) do DNA-Alvo ou um DNA ligado em plasmídeo. É recomendado a produção inicial de uma série de diluições de 10 vezes ao longo de oito pontos a partir do padrão de DNA mais concentrado. Para assegurar uma curva padrão que abranja todas as concentrações em potencial, isto é um amplo intervalo dinâmico. Cada diluição deve ser submetida a qPCR em triplicata, a curva padrão é construída representando graficamente o logaritmo da concentração inicial das diluições do padrão *versus* os valores de Cts obtidos. A equação da linha de regressão linear, juntamente com o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) ou o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), pode então ser utilizado para avaliar se o ensaio de qPCR é otimizado (BUSTIN 2009; TAYLOR et al., 2010).

Idealmente, a diluição seriada deve produzir curvas de amplificação uniformemente espaçadas, se correr as perfeita duplicação a cada ciclo de amplificação, o espaçamento entre as curvas de amplificações será determinada pelo  $2^n =$  fator de diluição equação, onde  $n$  é o número de ciclos que separa as curvas no *threshold* de detecção (em outras palavras, a diferença dos valores de Cts das curvas). Por exemplo, com uma diluição em série de 10 vezes do DNA padrão, temos  $2^n = 10$ . Por conseguinte,  $n = 3,32$ , e os valores dos Cts devem ser separados por 3.32 ciclos de amplificação da PCR. As curvas de amplificação separadas uniformemente no *threshold* irá

produzir uma curva padrão linear ideal num intervalo de 90-110% de eficiência de reação (TAYLOR et al., 2010; BUSTIN 2009).

O valores de  $R^2$  ou  $R$  de uma curva padrão representa o quão bem os dados experimentais se encaixam a linha de regressão, isto é, quanto os dados são lineares. Linearidade, por sua vez, oferece a avaliação da variabilidade entre repetições do ensaio e se a eficiência de amplificação é a mesma para diferentes números de cópias das diluição padrão. Uma diferença significativa nos valores observados entre o  $C_t$ s das repetições irá diminuir o valor de  $R$  ou de  $R^2$ . Um  $r$  com um valor absoluto  $>0,99$  ou um valor de  $R^2 > 0,98$  é desejável para RT-qPCRs. Exclusão de pontos em ambas as extremidades da curva padrão pode ser necessário para se obter um slope aceitável (eficiência). Porém, conseqüentemente isso irá redefinir intervalo dinâmica da curva padrão (BUSTIN 2009; TAYLOR et al., 2010).

### 1.3.5 RT-qPCR para RNA HDV

Estudos moleculares baseando-se na quantificação do RNA HDV através de uma *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* quantitativa (RT-qPCR) em tempo real com Light Cycler DNA Master SYBR Green I mix (Boehringer Mannheim), demonstraram uma correlação entre os níveis de RNA HDV circulante no soro e a lesão hepática, sendo que os níveis do HBV DNA não apresentavam dita correlação nos diferentes estágio clínicos (YAMASHIRO et al., 2004).

A quantificação do RNA HDV circulante no soro é fundamental tanto no diagnóstico da infecção, como no monitoramento do tratamento, permitindo identificar diferentes perfis de resposta virológica à terapia com Interferon (IFN) com maior precisão do que os testes meramente qualitativos (Le Gal et al., 2005; Mederacke et al., 2010). Em 2009, Kiesslich e colaboradores utilizaram a técnica RT-qPCR em tempo real para avaliar a influência do genótipo do HBV no curso da doença em pacientes coinfectados HBV-HDV através da aferição da carga viral.

Recentemente em 2012, Ferns e colaboradores padronizaram uma RT-qPCR em tempo real utilizando um transcrito de RNA HDV do genoma completo com objetivo de minimizar o risco de produção de resultados falso-negativos e subestimar a carga viral. Outro estudo realizado por Shang e colaboradores (2012) desenvolveu uma técnica de RT-qPCR em tempo real capaz determinar a carga viral através de soro ou plasma de todos os genótipos do HDV.

## 2. JUSTIFICATIVA

Muitos estudos tem utilizado ensaios RT-qPCR *in house* para monitoramento do tratamento (YAMASHIRO et al., 2004; LE GAL et al., 2005; CASTELNAU et al., 2006; FARCI et al., 2006), por isso muitos laboratórios têm desenvolvido ensaios RT-qPCR em tempo real *in house* com o objetivo de diagnosticar e monitorar o tratamento da infecção HDV, pois não existe testes comercial confiáveis disponíveis (BRICHLER et al., 2013). Como esses ensaios são muito limitados e ainda não foi definido um padrão de identificação e quantificação para HDV o objetivo deste estudo é produzir um ensaio *in house* que permita o diagnóstico precoce qualitativo, quantitativo e genotipagem do HDV para o monitoramento do tratamento dos pacientes, tendo em vista que a região da Amazônia Ocidental é considerada uma área de alta endêmicidade para este vírus.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver de um sistema para rápida detecção, quantificação e genotigem do vírus da hepatite Delta através de transcrição reversa-PCR em tempo real e Nested PCR–RFLP.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Implantar os testes moleculares para quantificação e genotipagem do HDV na rotina laboratorial do Ambulatório de Hepatites Virais da Fiocruz/CEPEM.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Amostras clínicas**

Foram incluídos neste estudo 100 amostras clínicas de soro de pacientes com infecção pelo HDV/HBV atendidos no Ambulatório Especializado de Hepatites Virais do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPEM. Todas essas amostras apresentavam evidências laboratoriais da presença de anticorpos contra o HDAg no sangue através da técnica de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Para testar a especificidade da HDV RT-qPCR foi incluído um grupo controle de 30 doadores de sangue atendidos no banco de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Rondônia (Fhemeron), sendo todos negativos para vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2, HBsAg, Anti-HBc e Anti-HCV. Também foram incluídas 05 amostras clínicas de soro de indivíduos cronicamente monoinfectados com HCV e 05 amostras clínicas monoinfectadas com HBV. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética, com o parecer 33/10 CEP/CEPEM e número de registro 110/2010.

#### **4.2 Extração do HDV RNA**

A extração do RNA HDV foi realizada com o *Kit QIAamp®Viral RNA Mini* (Qiagen, Alemanha), utilizando 200 µL de soro, de acordo com as instruções do fabricante através do protocolo spin Viral RNA QIAamp. O RNA precipitado foi ressuspendido em 50 µL de tampão de eluição. O Kit QIAamp Viral RNA Mini representa uma tecnologia de uso geral bem estabelecida para a extração de RNA viral, combinando as propriedades de ligação seletiva de uma membrana à base de gel de sílica com rápidas centrifugações, sendo ideal para o processamento simultâneo de múltiplas amostras. Para obtenção do RNA HDV as amostras de soro foram primeiro lisadas sob condições altamente desnaturante para inativar RNases e para garantir o isolamento do RNA viral intacto. Condições tamponantes foram ajustadas para fornecer uma ótima ligação do RNA HDV a membrana de sílica, e a solução foi transferida para a coluna contendo a membrana de sílica e centrifugada para favorecer a interação do RNA viral e membrana de sílica. Os contaminantes são removidos por lavagens e centrifugações. O RNA viral foi eluído em 50µL de tampão livre de RNase.

Em seguida uma fração do eluído contendo o RNA HDV foi transformada em cDNA e a outra fração foi armazenada a -80 °C.

#### **4.3 Transcrição Reversa (RT)**

Para a produção de um DNA complementar (cDNA) a partir do RNA HDV foi utilizada uma transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa. O HDV RNA foi desnaturado a 95°C por 5 minutos, com o objetivo de desfazer as estruturas secundárias, e convertido em cDNA a partir de 15µL de RNA da extração com 200 unidades da enzima *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) (Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA), 1µL do Tampão 10X M-MLV Reverse Transcriptase, 1µL de primer randômico e 1µL de dNTP MIX a 10mM. As condições de termociclagem para síntese do cDNA foram: 70°C por 10 minutos, 37°C por 50 minutos e 94°C por 10 minutos.

#### **4.4 Desenho e otimização de primers e sonda**

Os primers e a sonda de hidrólise (TaqMan Probes) foram desenhados baseados em sequências HDV completas conhecidas e depositadas no *GenBank* através do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* utilizando o software CLUSTAL W 2.1 (THOMPSON et al., 1994) via *European Bioinformatics Institute*. Sequências nucleotídicas dos oito genótipos descritas no banco de dados foram alinhadas e mapeada as regiões conservadas. A especificidade dos primers foi analisada *in silico* através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al.,

1997) no banco de dados americano através NCBI e também *in vitro* através da avaliação da curva de dissociação da PCR em tempo real com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Para otimização de concentração dos primers foi realizado um gradiente de concentração de 50nM á 900nM utilizando a PCR em tempo real com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Após a otimização dos primers a concentração da sonda também foi otimizada através de um gradiente de concentração de 50nM á 300nM através do sistema TaqMan® PCR Master Mix (Applied Biosystems).

#### 4.5 HDV real-time PCR quantitativa (HDV-qPCR)

A HDV-qPCR foi realizada na plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com volume de reação de 25uL contendo 12,5uL Taqman Universal Master Mix 2x (Applied Biosystems), 5uL do cDNA, 100nM do primer sense HDVq (nt) 5'-TGGCTCTCCCTTAGCCATCCGA-3', 100nM do primer antisense HDVqb (nt) 5'-GGGTTTCCACTCACAGGTTTGC-3', 100nM da sonda 5'-FAM-CCGCGAGGAGGTGGAGATGCCAT-TAMRA-3' que amplificam um fragmento de aproximadamente 135nt correspondente a ribozima. A sonda é marcada com um corante fluorescente *repórter* [FAM (6-carboxifluoresceína)] no extremo 5' e um corante fluorescente *quencher* [TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina)] na extremidade 3'.

#### 4.6 Produção da curva padrão

##### 4.6.1 Transcrição Reversa-PCR

Para produção do controle padrão foi realizado uma reverse transcription-PCR (RT-PCR) do RNA HDV extraído, conforme descrito nas seções 4.3 e 4.5, de uma amostra controle positivo com HBsAg e Anti-HDV total reagente por ELISA (Diasorin, Saluggia, Itália). Na RT-PCR foi utilizado 10uL de extração de RNA adicionado a 40 µL de PCR mix [Tris 20 mM-HCl (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs, 10 pmol de primers sense HDVq e antisense HDVqb e 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA)]. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: 2min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30s a 94°C, 50s a 60°C e 45s a 72°C, com uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C.

##### 4.6.2 cDNA HDV clonado em plasmídeo e RNA transcrito in vitro

O produto da PCR foi purificado através da enzima ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA), para tanto foi utilizado 5 µL de *amplicons* com 2uL de ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio,

USA). Em seguida um mix de ligação contendo 345 ng/ $\mu$ L do *amplicons* purificado, 55 ng/ $\mu$ L de plasmídeo de clonagem pTZ57R/T (Thermo Scientific® Fermentas,), tampão de ligação 1X [60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1mg de albumina bovina, 70 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1mM ATP, 20 mM dithiothreitol e 20 mM spermidine] e 4U/ $\mu$ L de T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA) foi incubado por 16 horas a 4 °C para a inserção do fragmento do HDV no plasmídeo, denominado de cDNA HDV recombinante.

Células competentes foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Messing e colaboradores em 1977. Bactérias *E. coli* quimicamente competentes da linhagem TOP10F' (Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), que contêm o gene de resistência ao antibiótico tetraciclina, estocadas a -80 °C em meio Luria Bertani (LB)/DMSO 10% (Dimetilsulfóxido) foram semeadas em placas de petri contendo LB ágar suplementado com 50  $\mu$ g/ $\mu$ L de tetraciclina. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. Posteriormente uma colônia foi selecionada e inoculada em 5mL de LB líquido suplementado com 50  $\mu$ g/ $\mu$ L de tetraciclina incubada a 37 °C por 18 horas em agitação de 125 rpm. Uma alíquota de 0,5 mL da cultura foi t em 50mL de LB líquido suplementado com 50 $\mu$ g/ $\mu$ L de tetraciclina foi incubada a 37 °C e monitorada até atingir a fase de crescimento exponencial bacteriana, indicado pelo valor da absorbância entre 0,350 e 0,450 por espectrofotometria com filtro de 600 nm. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e ressuspendidas delicadamente em 0,5 volumes de solução de CaCl<sub>2</sub> a 50mM. Após 2 horas de incubação em gelo, as bactérias foram centrifugadas novamente e o sedimento foi ressuspenso em 0,8 volumes de tampão FSB (10 mM [pH 7,5] Acetato de potássio, 45mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 100mM KCl e 10% de glicerol). Para o armazenamento foi adicionado DMSO a 10% e a preparação distribuídas em alíquotas de 100  $\mu$ L, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C.

Posteriormente o mix de ligação contendo o cDNA HDV recombinante foi introduzido nas células competentes através de choque térmico, este procedimento recebe o nome de transformação. Para a transformação das células competentes foi utilizado 5  $\mu$ L do mix de ligação contendo o DNA recombinante e 50  $\mu$ L de TOP10F', posteriormente, incubado em gelo por 15 minutos, 42 °C por 1 minuto e 10 minutos novamente em gelo. Após a incubação foi adicionado 110  $\mu$ L de SOC médium [2,0g Bacto®-tryptone, 0,5g Bacto®-yeast extract, 1M NaCl, 1M KCl, 2M Mg<sup>2+</sup>, 2M glucose) e incubado por 2 horas a 37 °C em agitação de 215 rpm. Posteriormente foi semeado 20  $\mu$ L da solução de transformação em placas de petri com LB ágar suplementado com 100 ug/ $\mu$ L de ampicilina, 50 ug/ $\mu$ L de tetraciclina, 0,1 M de IPTG (isopropylthio- $\beta$ -galactoside) e 20 ug/ $\mu$ L de X-

gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) e incubar por 16 horas a 37 °C. Para o controle da transformação foi utilizado um plasmídeo circular pUC19.

A seleção das células recombinantes foi realizada através da técnica de triagem Blue/White, onde o princípio da técnica consiste seleção dos clones recombinantes cultivados na presença do X-gal. Células competentes transformadas com o cDNA HDV recombinante (plasmídeo + 135 pb HDV) cultivadas na presença de X-gal crescem em colônias com coloração branca. E células competentes transformadas somente com plasmídeo crescem em colônias azuis (MESSING et al., 1977).

Para a extração do cDNA HDV recombinante foram selecionadas colônias brancas e submetidas a extração plasmidial através do QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante utilizando o protocolo QIAprep Spin Miniprep usando uma Microcentrifuga. O cDNA HDV recombinantes extraído foi digerido com 15 U/ $\mu$ L de *EcoRI* (Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) e 15 U/ $\mu$ L de *BamHI* (Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) para confirmação em eletroforese em gel de agarose à 1,5%. E posteriormente o cDNA HDV recombinante foi linearizado com 15 U/ $\mu$ L de *EcoRI*, que constitui o calibrador padrão de cDNA HDV.

Para produção *in vitro* do transcrito de RNA HDV foi utilizado 10uL do cDNA HDV ligado ao plasmídeo linearizado e 40 unidades de Phage RNA polimerase de T7 (Promega®, USA) com volume de reação de 100uL, contendo no mix o tampão de otimização da transcrição 1X , 100mM de DTT, 40U/ $\mu$ L de ribonuclease Inibidor, 2nM de cada um dos quatro rNTP e 19U/ $\mu$ L de Phage RNA Polymerase incubados a 37°C por 2 horas, assim obtivemos o calibrador padrão de RNA HDV.

#### 4.6.3 Análise da pureza, integridade e quantificação dos calibradores padrão

A Pureza de ambos os calibradores padrão foram avaliadas em relação à contaminação com proteína através de espectrofotometria utilizando o NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, Delaware), medindo a proporção da densidade óptica por absorvância com os filtros  $A_{260}/A_{280}$ . Um valor entre 1,8-2,0 da relação  $A_{260}/A_{280}$  indica um calibrador padrão com um bom grau de pureza, ou seja, livre de proteínas e fenol. No entanto, nenhuma informação a respeito da integridade pode ser obtida a partir de uma leitura espectrofotométrica. Integridade foi avaliada por observação visual a partir de uma eletroforese em gel de agarose.

A concentração de ambos foi medida por espectrofotometria através do NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, Delaware) e expresso em ng/μL, que foi convertido em cópias/μL com a seguinte fórmula específica:  $([x\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}]/[\text{DNAbps} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} = y$  cópias/μL e  $([x\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}]/[\text{RNAbps} \times 350]) \times 6.022 \times 10^{23} = y$  cópias/uL (Qiagen, West Sussex, UK). Ambos os padrões HDV produzidos foram diluídos seriadamente para obtenção das curvas padrão, e posteriormente a curva padrão de RNA HDV foi convertida em cDNA.

#### 4.7 Desempenho analítico

##### 4.7.1 Sensibilidade analítica e intervalo dinâmico linear

O limite de detecção (LDD) e o intervalo dinâmico foi estabelecido pela produção de curva de regressão linear com ensaios *in vitro* HDV-qPCR de três repetições de uma diluição seriada de  $6\text{-log}_{10}$  ( $10^2$  à  $10^7$  cópias/reação) de ambos controles padrão (BUSTIN, 2009).

##### 4.7.2 Especificidade analítica

Para mostrar a especificidade analítica testamos 100 pacientes com infecção HDV/HBV (HBsAg, Anti-HBc total e Anti-HDV reagente por ELISA), 30 amostras de doadores de sangue, 5 amostras de soro de indivíduos cronicamente mono infectados com HCV e 5 amostras mono infectadas com HBV. Todas as amostras foram submetidas à HDV-qPCR para a determinação da carga viral.

##### 4.7.3 Eficiência da amplificação e linearidade HDV-qPCR

A linearidade da HDV-qPCR foi avaliada por meio de quatro corridas de uma diluição seriada de  $6\text{-log}_{10}$  de ambos controles padrão (BUSTIN, 2009). A eficiência foi calculada através da fórmula: Eficiência da Amplificação =  $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$  (LE GAL et al, 2005).

##### 4.7.4 Reprodutibilidade e Repetibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada através de testes intra-ensaios, por meio de quatro corridas de uma diluição seriada de  $6\text{-log}_{10}$  de ambos controles padrão. Para avaliar a repetibilidade nós realizamos os testes inter-ensaio, por meio de quatro corridas de 06 amostras em dias consecutivos (BUSTIN, 2009).

##### 4.7.5 Análise estatística

As análises estatísticas de ambos controles padrão, foram realizadas utilizando o software *GraphPad 5.0 Prism* (GraphPad Software, Inc. Califórnia, USA). Os dados não-paramétricos foram

comparados usando o teste de Mann-Whitney U, 2-tailed com um valor de  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo.

## 4.8 Genotipagem do HDV

### 4.8.1 HDV nested-PCR

Para a caracterização do genótipo do HDV foi utilizado uma Nested-PCR, contendo 10  $\mu\text{L}$  de cDNA em 40  $\mu\text{L}$  de PCR mix com 25 pmol de primers 853IU (5' -CGG ATG CCC AGG TCG GAC C- 3') e 1302OD (5' -GGA TTC ACC GAC AAG GAG AG- 3') descritos anteriormente em literatura (CASEY et al., 1993; ZHANG et al., 2006) que amplificam um fragmento de 406pb do genoma do HDV correspondente a uma porção do antígeno Delta, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl, 1X de tampão da enzima e 2,0/U $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, USA), na primeira PCR. E seguiu as seguintes condições no termociclador: 2min a 94 °C, 36 ciclos de 30s a 94 °C, 50s a 55 °C e 45s a 72 °C com um estágio final de extensão de 5 min a 72 °C. A nested-PCR foi realizada contendo 5  $\mu\text{L}$  do produto da primeira PCR e 45  $\mu\text{L}$  de PCR mix com 25 pmol de primers HDV-E nt) 5'-GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG-3' e HDV-A (nt) 5 -GAAGGAAGGCCCTCGAGAACAAGA-3', mantendo mesmas condições de ciclagem de temperatura (GOMES-GOUVÊA et al., 2008). O resultado das ampliações foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

### 4.8.2 Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Para a determinação do genótipo foi utilizada a técnica RFLP. Foram digeridos 15  $\mu\text{L}$  de *amplicons* no mix de digestão contendo 10U de *Sma*I (Invitrogen®, USA), 1x do tampão da enzima em volume final de 20 uL, posteriormente foi incubada a 30 °C, overnight. Também foram digerido 15  $\mu\text{L}$  de *amplicons* no mix de digestão contendo 10U de *Xho*I (Invitrogen®, USA), 1x do tampão da enzima em volume final de 20 uL e em seguida incubada a 37 °C, overnight. Os fragmentos resultantes da restrição serão analisados por eletroforese em gel de agarose 3% (tabela 2).

**Tabela 2.** Perfil genotípico da digestão com *Sma*I e *Xho*I para um fragmento de 406 pb correspondente ao HDAg.

Genótipo I	Tamanho do fragmento da restrição enzimática	
	SMA I (pb)	Xho I (pb)
	225+ 181	388+18

<b>Genótipo II</b>	<b>406 (Não digerido)</b>	<b>85+303+18</b>
<b>Genótipo III</b>	<b>306+135</b>	<b>24+382</b>

---

(FONTE: MIRSHAFIEE, ARCH IRANIAN MED, 2009. MODIFICADO)

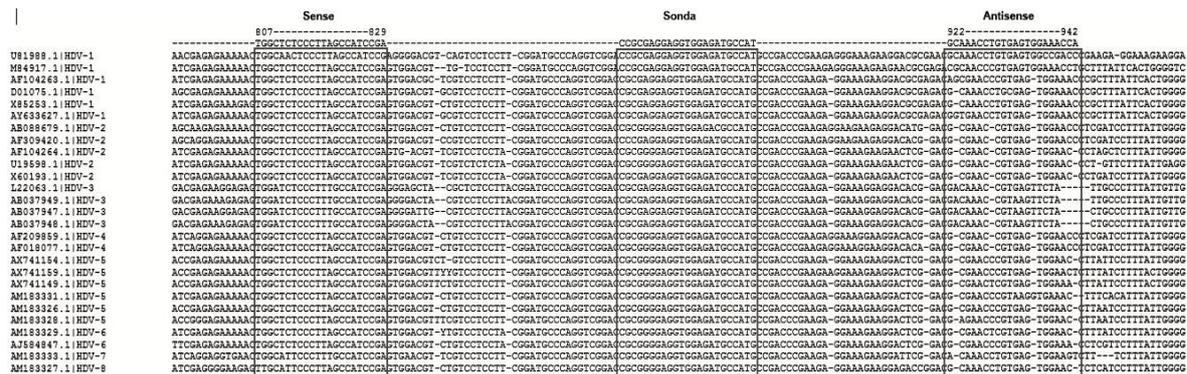
#### 4.8.3 Sequenciamento e análise filogenética

Foram selecionadas 12 amostras caracterizadas como HDV-3 e 4 HDV-1 por nested PCR-RFLP. Estas foram enviadas para sequenciamento no Laboratório Centro de Genomas®, com o objetivo de validar a nested PCR-RFLP. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* – MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Foram produzidas as sequências consenso e estas foram alinhadas com 241 sequências do HDV depositadas no *NCBI*. E para elucidar a linhagem evolutiva das sequências do HDV isoladas das amostras de soro utilizamos o método de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*) baseado no modelo de substituição de Hasegawa-Kishino-Yano (HASEGAWA et al., 1985) para gerar uma árvore filogenética. O bootstrap consenso da árvore foi inferido a partir de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

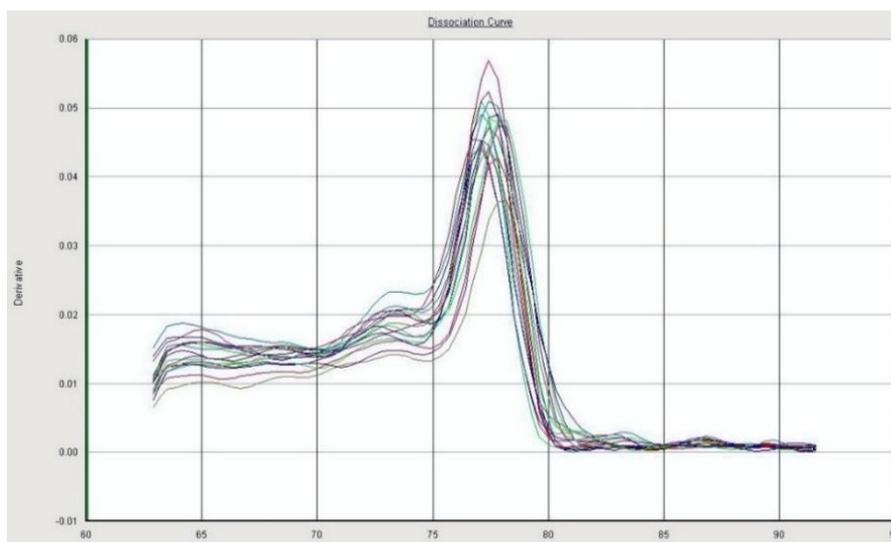
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise *in silico* dos primers e da sonda de hidrólise

A análise *in silico* dos primers e da sonda de hidrólise através de alinhamento múltiplo pelo Clustal W e o alinhamento local pelo BLAST demonstraram que os mesmos são altamente específicos para o genoma do HDV. Os primers e a sonda podem ligar-se em regiões conservadas entre os oito genótipos RNA-HDV atualmente isolados, com alta especificidade (figura 16).



**Figura 16.** Alinhamento múltiplo através do CLUSTAL W 2.1 das sequencias RNA-HDV retiradas do GenBank as sequencias escolhidas correspondem aos oito genótipos (HDV-1 a HDV-8). O primer sense demonstrou um score de 90 a 100, o primer antisense demonstrou um score de 95 a 77 e a sonda demonstrou um score de 95 a 100 entre as sequencias de RNA HDV alinhadas (*IDs das sequencias GenBank: U81988; M84917; AF104263; D01075; X85253; AY633627; AB088679; AF30942; AF104264; U19598; X60193; L22063; AB037949; AB037947; AB037948; AF209859; AF018077; AX741154; AX741159; AX741149; AM183331; AM183326; AM183328; AM183329; AJ584847; AM183333; AM183327*). (Fonte: BOTELHO-SOUZA, 2014, Journal of Virological Methods).



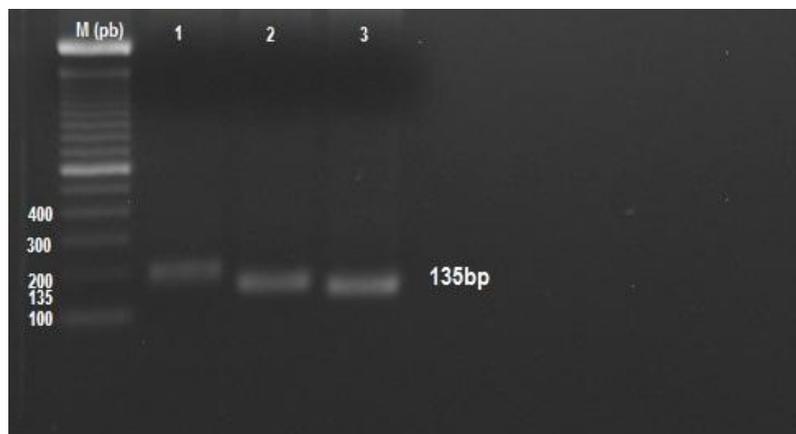
**Figura 17.** Curva de dissociação da PCR em tempo real utilizando o SYBR Green I. No ensaio de especificidade *in vitro* foi observado uma  $T_m$  de 77 °C, em média, para 15 amostras positivas para o RNA HDV.

O ensaio de especificidade *in vitro* através da análise da curva de dissociação gerou gráfico com um único pico agudo na  $T_m$  de 77 °C para as amostras positivas para RNA HDV (Figura 17), o que é sugestivo que uma ótima especificidade nos teste *in vitro* corroborando com as análises *in silico* por alinhamento local e múltiplo, BLAST e CLUSTAL W respectivamente.

## 5.2 Controle de qualidade da curva padrão

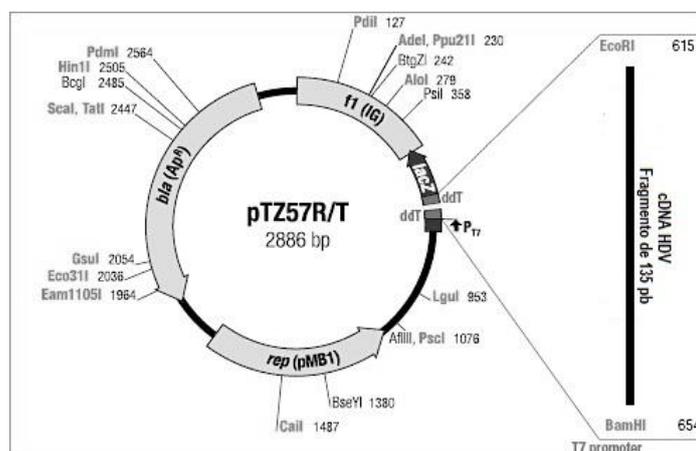
### 5.2.1 pureza, integridade e quantificação dos calibradores padrão

O RNA HDV foi amplificado a partir de 3 amostras de soro de pacientes anti-HDV e HBsAg reagentes através de uma RT-PCR para obtenção do fragmento de 135pb. A eletroforese em gel de agarose a 1,5% revelou a presença do fragmento esperado (figura 18).



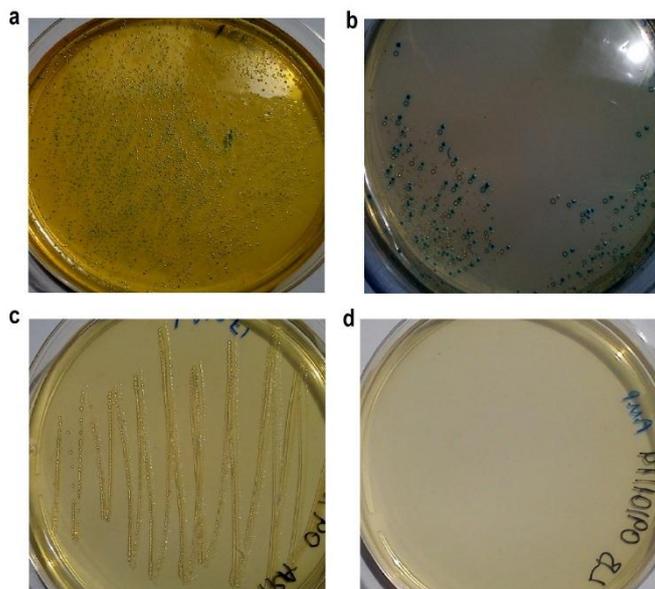
**Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da RT-PCR. A eletroforese mostrou bandas de amplificação de um fragmento de aproximadamente 135pb do HDV. M (pb): marcador de pares de base. Poços 1 a 3: amplicons de amostras de soro de pacientes.

Posteriormente, o amplicon 3 foi purificado utilizando a enzima ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA), em seguida o fragmento foi inserido no plasmídeo de clonagem pTZ57R/T (Thermo Scientific® Fermentas,) ligado com T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA) (figura 19).

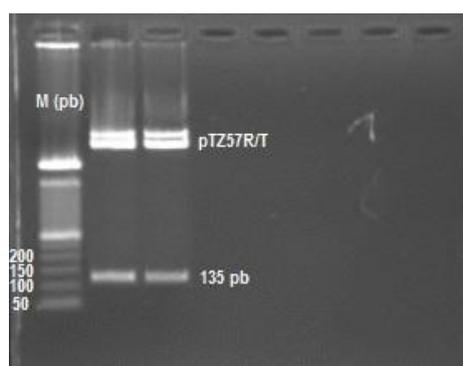


**Figura 19.** Ligação do inserto de 135 pb HDV ao pTZ57R/T para a construção do cDNA HDV recombinante.

As células competentes transformadas foram observadas em culturas de LB ágar suplementado com tetraciclina, ampicilina, IPTG e X-gal através da presença de colônias brancas (figura 20). A integridade do cDNA HDV recombinantes extraído a partir de colônias brancas foi demonstrada através de sua digestão enzimática e linearização visualizada em gel de agarose a 1,5% (figura 21).



**Figura 20.** Cultivo de células recombinantes. (a) Colônia azuis de células transformadas com o plasmídeo controle de transformação pUC19. (b) Nesta placa é observado colônias brancas e azuis correspondentes a colônias transformadas com cDNA HDV recombinante e colônias transformadas somente com o pTZ57R/T circular sem inserto, respectivamente.



**Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da digestão enzimática. As enzimas *EcoRI* e *BamHI* descaram o fragmento clonado de 135 pb do HDV.

Um cDNA HDV recombinante ligado em plasmídeo linearizado foi transcrito em RNA e demonstrou sua integridade através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (figura 22)



**Figura 22.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% do RNA HDV transcrito. Um RNA HDV foi sintetizado a partir do cDNA HDV ligado em plasmídeo linearizado.

Foi obtido o padrão de cDNA HDV ligado em plasmídeo linearizado concentrado à 44,1 ng/μL com um grau de pureza de 1,92  $A_{260}/A_{280}$ , segue o cálculo para a quantificação do padrão:

$$([44,1 \text{ ng/uL} \times 10^{-9})/[3021\text{bps} \times 660]) \times 6.022e^{23} = 1,3e^{10} \text{ cópias/uL}$$

Logo,

$$1,3e^{10} \text{ cópias/uL} \times 1000 = 1,3e^{13} \text{ cópias/mL}$$

Para o padrão de RNA HDV transcrito foi obtido uma pureza de 1,88  $A_{260}/A_{280}$  à uma concentração de 656,8 ng/μL, segue o cálculo para a quantificação do padrão:

$$([656,8 \text{ ng/uL} \times 10^{-9})/[135\text{bps} \times 350]) \times 6.022e^{23} = 8,3e^{12} \text{ cópias/uL}$$

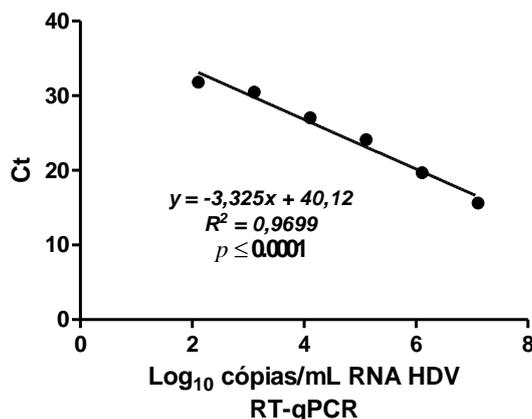
Logo,

$$8,3e^{12} \text{ cópias/uL} \times 1000 = 8,3e^{15} \text{ cópias/mL}$$

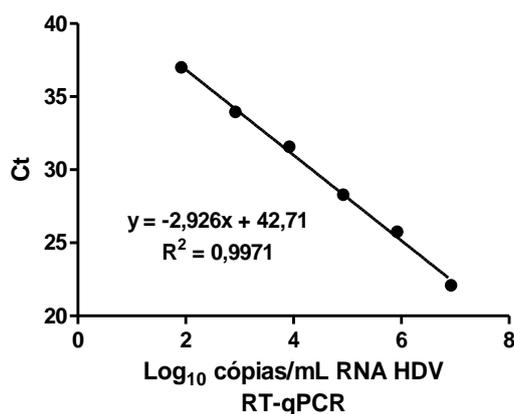
### 5.3 Desempenho analítico

#### 5.3.1 Sensibilidade analítica e intervalo dinâmico linear

O intervalo dinâmico linear aprovado nos ensaios *in vitro* na HDV-qPCR foram de  $1,3 \times 10^2$  a  $1,3 \times 10^7$  e  $8,3 \times 10^1$  a  $8,3 \times 10^6$  cópias/mL para o HDV padrão cDNA e padrão de RNA, respectivamente (Figuras. 18 e 19). O limite de detecção foi de  $1,3 \times 10^2$  ou 130 e  $8,3 \times 10^1$  ou 83 cópias/mL para o HDV padrão cDNA e padrão de RNA, respectivamente (figuras 23 e 24).



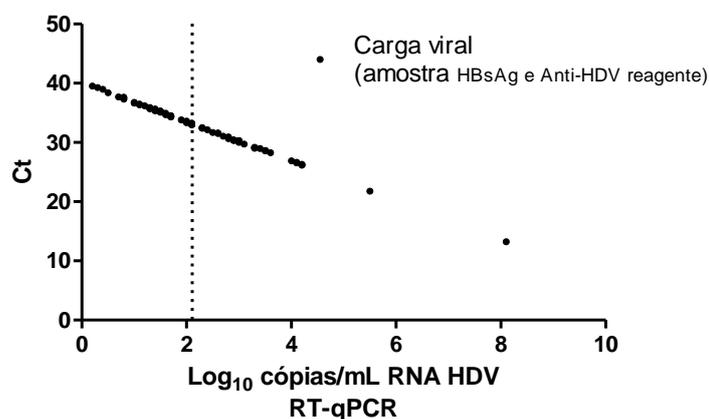
**Figura 23.** Curva de regressão linear do calibrador HDV padrão de cDNA. A curva de regressão linear demonstrou ser significativa ( $p \leq .0001$ ), slope de -3,325, correlação linear de  $R^2 = 0,96$  e gerou a seguinte fórmula para a determinação da carga viral:  $y = -3,325x + 40,12$ . (Fonte: BOTELHO-SOUZA, 2014, Journal of Virological Methods).



**Figura 24.** Curva de regressão linear do calibrador HDV padrão de RNA. A curva de regressão linear demonstrou ser significativa ( $p \leq .0001$ ) e slope de -2,926, correlação linear de  $R^2=0,99$  e gerou a seguinte fórmula para a determinação da carga viral:  $y = -2,926x + 42,71$  (Fonte: BOTELHO-SOUZA, 2014, Journal of Virological Methods).

### 5.3.2 Especificidade analítica in vitro

Das 100 amostras de soro HBsAg e Anti-HDV reagente submetidas a HDV-qPCR 54 foram positivas com carga viral maior ou igual ao limite de detecção e 46 foram consideradas negativas, pois estavam abaixo do limite de detecção do ensaio utilizando o calibrador HDV padrão de cDNA (figura 25). Todas as 30 amostras de doadores de sangue, 5 amostras de soro de indivíduos cronicamente monoinfectados com HCV e 5 amostras monoinfectadas com HBV foram negativas.



**Figura 25.** Carga viral ( $\text{Log}_{10}$  cópias/mL) das amostras de soro HBsAg e Anti-HDV reagente por ELISA. A linha tracejada representa o limite de detecção inferior do ensaio HDV-qPCR ( $2.11 \text{ Log}_{10}$  ou  $1.3 \times 10^2$  cópias/mL). Ao lado esquerdo da linha tracejada estão as 46 consideradas negativas utilizando o calibrador HDV padrão de cDNA, e ao lado direito da linha tracejada estão as 54 amostras positivas com carga viral maior ou igual ao limite de detecção inferior do ensaio HDV-qPCR. Para a determinação da carga viral das amostras de soro foi utilizado a equação da figura 23 (Fonte: BOTELHO-SOUZA, 2014, Journal of Virological Methods).

### 5.3.3 Eficiência da amplificação e linearidade HDV-qPCR

A linearidade da HDV-qPCR foi avaliada através da curva de regressão linear de cada corrida das diluições seriadas de  $6\text{-log}_{10}$  dos calibradores HDV padrão cDNA e RNA, onde foi encontrado uma forte correlação entre as diluições (coeficiente de correlação  $R^2 = 0.97$  e  $0.99$ ) de ambos os padrões (Tabelas 3 e 4). A eficiência de amplificação foi calculada a partir do slope de  $-3.325$  (99.8%) e de  $-2.92$  (119%) para os calibradores HDV padrão de cDNA e RNA, respectivamente.

**Tabela 3.** Avaliação do intra-ensaio de repetibilidade com o padrão de cDNA HDV através de 3 repetições de  $6\text{-log}_{10}$  diluições.

cDNA copies/mL	1ºEnsaio (Ct)	2ºEnsaio (Ct)	3ºEnsaio (Ct)	Média	DP(±)	CV (%)
$1.3 \times 10^7$	14,95	15,71	16,16	15,61	0,61	0,04
$1.3 \times 10^6$	18,92	19,81	20,32	19,68	0,71	0,04
$1.3 \times 10^5$	22,92	24,35	25,12	24,13	1,12	0,05
$1.3 \times 10^4$	26,55	27,09	27,47	27,04	0,46	0,02
$1.3 \times 10^3$	30,07	30,60	30,82	30,50	0,38	0,01
$1.3 \times 10^2$	31,52	32,04	31,87	31,81	0,27	0,01
<b>Slope</b>	-3,427	-3,336	-3,211	-3,325	0,07	
<b>Intercept</b>	39,95	40,31	40,10	40,12	0,27	
<b>Correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,98	0,97	0,96	0,97		

(Fonte: BOTELHO-SOUZA, 2014, Journal of Virological Methods)

**Tabela 4.** Avaliação do intra-ensaio de repetibilidade com o padrão de RNA HDV através de 3 repetições de  $6\text{-log}_{10}$  diluições.

cDNA cópias/mL	1ºEnsaio (Ct)	2ºEnsaio (Ct)	3ºEnsaio (Ct)	Média	DP(±)	CV (%)
$8.3 \times 10^6$	22,09	22,10	22,07	22,09	0,02	0,00
$8.3 \times 10^5$	25,76	25,51	26,00	25,76	0,25	0,01
$8.3 \times 10^4$	28,29	28,19	28,38	28,29	0,10	0,00
$8.3 \times 10^3$	31,57	31,50	31,63	31,57	0,07	0,00
$8.3 \times 10^2$	33,95	33,83	34,07	33,95	0,12	0,00
$8.3 \times 10^1$	37,00	37,35	36,65	37,00	0,35	0,01
<b>Slope</b>	-3,146	-2,9860	-2,867	-2,9260	0,14	
<b>Intercept</b>	41,66	42,95	42,47	42,36	0,65	
<b>Correlação (<math>R^2</math>)</b>	0,99	0,99	0,99	0,99		

(Fonte: BOTELHO-SOUZA, 2014, Journal of Virological Methods)

#### 5.3.4 Reprodutibilidade e Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através desvio padrão (DP) dos testes intra-ensaios, onde o desvio padrão variou de 0.27 a 0.71 e de 0.02 a 0.35 para os calibradores HDV padrão de cDNA e RNA, respectivamente (Tabelas 3 e 4). A reprodutibilidade do ensaio HDV-qPCR foi confirmada nos testes inter-ensaio, onde o RNA HDV foi quantificado em seis amostras de soro através de três corridas em dias consecutivos (tabela 5.). O ensaio HDV-qPCR é altamente capaz de determinar carga viral (usando a equação da Figura 23) de amostras de soro com uma baixa variabilidade entre as corridas, os ensaios apresentou um desvio padrão de  $1.1 \times 10^1$  a  $2.8 \times 10^2$  cópias/mL e coeficiente de variação (CV) de 0,05 a 0,18.

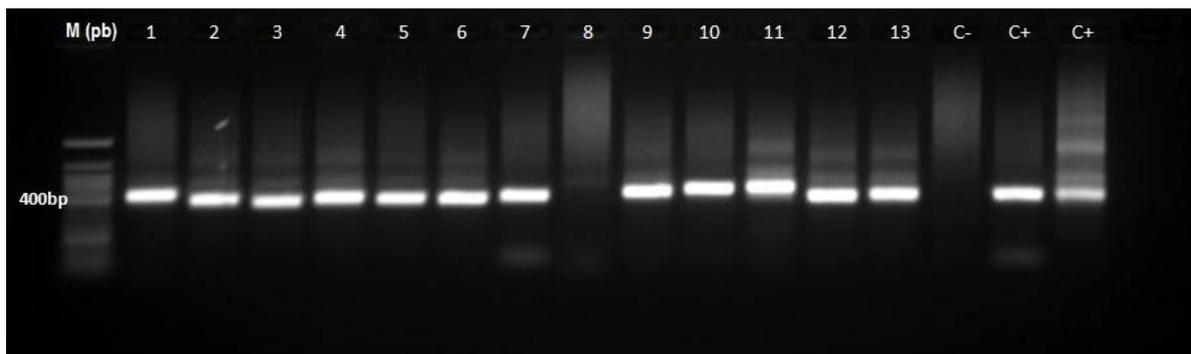
**Tabela 5.** Avaliação do inter-ensaio de reprodutibilidade do padrão de cDNA HDV através de 3 repetições de seis amostras.

Amostra	1º Ensaio (cópias/mL)	2º Ensaio (cópias/mL)	3º Ensaio (cópias/mL)	Média	DP(±)	CV (%)
1	$9,1 \times 10^2$	$8,3 \times 10^2$	$8,1 \times 10^2$	$8,5 \times 10^2$	$5,3 \times 10^1$	0,06
2	$1,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$6,2 \times 10^1$	0,05
3	$8,6 \times 10^2$	$7,6 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	0,18
4	$2,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,9 \times 10^1$	0,13
5	$1,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$	0,08
6	$1,9 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$2,8 \times 10^2$	0,17

## 5.4 Genotipagem

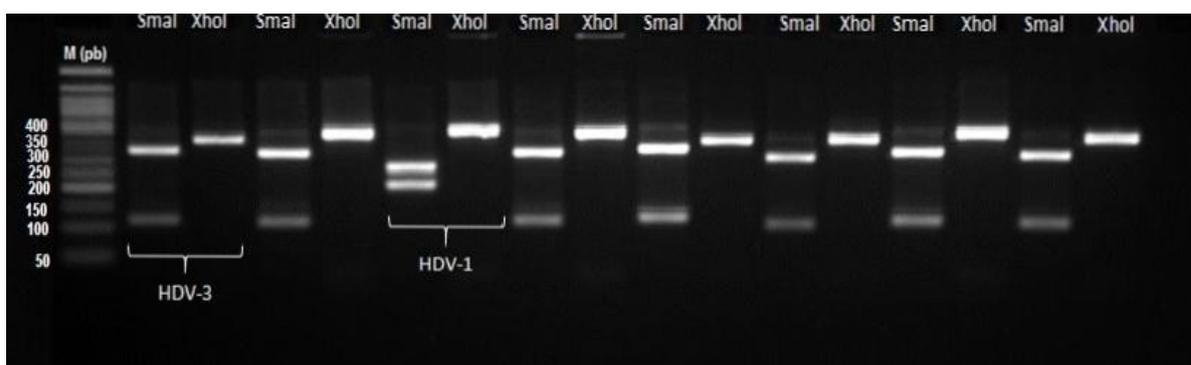
### 5.4.1 Nested PCR-RFLP

Das 100 amostras de soro HBsAg e Anti-HDV reagente submetidas a nested PCR-RFLP 52 foram positivas e 48 foram consideradas negativas (figura 26). Todas as 30 amostras de doadores de sangue, 5 amostras de soro de indivíduos cronicamente monoinfectados com HCV e 5 amostras monoinfectadas com HBV foram negativas.



**Figura 26.** Eletroforese de gel de Agarose a 1,5% apresentando o fragmento esperado de 405bp do HDV. As amostras estão numeradas de 1 a 13, a amostra 8 é negativa para RNA HDV. M (pb): marcador de pares de bases. C-: controle negativo, amostras sabidamente negativa para RNA HDV. C+: controle positivo, amostra sabidamente positiva para RNA HDV.

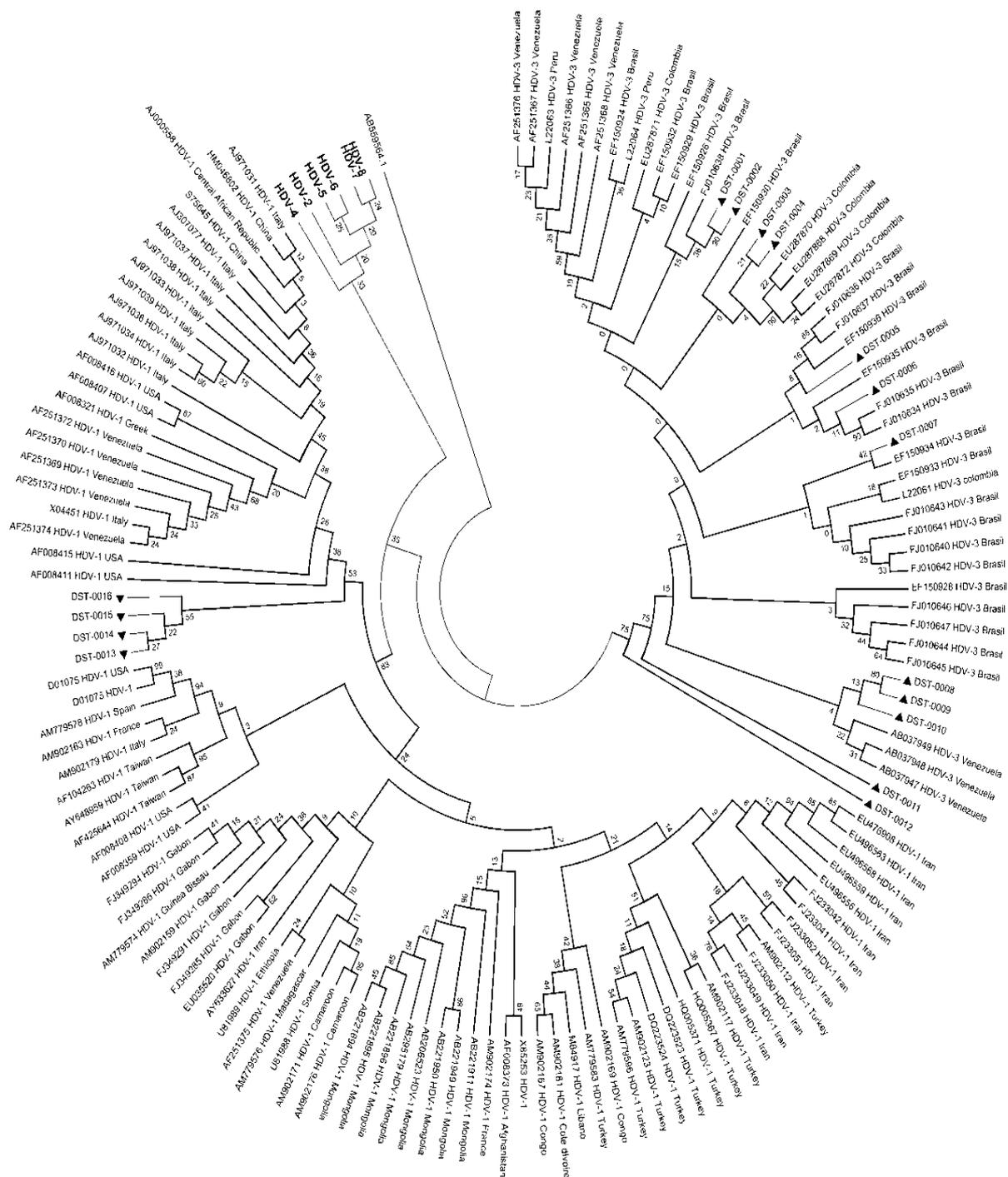
Das 52 amostras amplificadas na nested PCR e submetidas ao RFLP, 48 deram o perfil para o genótipo 3 (HDV-3) e 4 para o genótipo 1(HDV-1) (figura 27).



**Figura 27.** Eletroforese de gel de Agarose a 3% apresentando o RFLP dos amplicons da Nested PCR esperado de 405bp do HDV.

#### 5.4.2 Análise filogenética

O resultado da análise filogenética pelo MEGA5 gerou automaticamente uma árvore filogenética (figura 28) onde foi observado que das 16 amostras analisadas, as 12 sequências previamente caracterizadas como HDV-3 por PCR-RFLP também confirmaram-se por sequenciamento e análise filogenética. O mesmo aconteceu para as 4 amostras HDV-1. Todos os resultados de nested PCR-RFLP corroboraram com as análises por sequenciamento.



**Figura 28.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança. Os táxons marcados com um triângulo preto corresponde as sequencias do estudo alinhadas com outras sequencias depositadas no Genbank. As amostras denominadas DST-0001 a 0012 são correspondentes as sequencias HDV-3. As amostras DST-0013 a 0016 são correspondentes ao HDV-1.

## 6. DISCUSSÃO

A alta diversidade genética do HDV tem sido um problema para padronização de ensaios de PCR em tempo real produzidos *in house*, principalmente quando se utilizam técnicas baseadas em

sondas de hidrolises, pois o pequeno genoma combinado à alta diversidade genética do HDV dificultam a escolha de primers e sonda que anelem com eficiência em todos os genótipos virais (YAMASHIRO et al., 2004; LE GAL et al., 2005; SCHAPER et al., 2010; SHANG et al., 2012). No presente estudo foram desenhados primers e sonda com capacidade de detectar todos os genótipos do HDV (Figura 17), sem a necessidade de primers adicionais conforme descritos em outros estudos (LE GAL et al., 2005; SCHAPER et al., 2010). Yamashiro e colaboradores (2004) desenvolveu uma HDV-qPCR específica para a detecção dos genótipos 1, 2 e 4 do HDV. Le Gal e colaboradores (2005) propôs o desenho um primer adicional específico para a detecção do HDV-3 em casos em que há suspeita clínica da infecção pelo HDV-3, a origem geográfica dos pacientes e quando há a presença de anti-HDV IgM e na ausência do RNA HDV. Shaper e colaboradores (2010) utilizou uma HDV-qPCR com duas sondas simultaneamente da reação na tentativa de detectar todos os genótipos, porém isso pode aumentar os fatores de interferências numa qPCR. Os genótipos do HDV são distribuídos geograficamente pelo mundo. O HDV-3 não possui uma distribuição mundial pois está presente, restritamente, à região Amazônica. Isso é um problema para a detecção deste genótipo através de HDV RT-qPCRs padronizadas em outros lugares do mundo. O que explica a utilização de primers adicionais para detecção especialmente do HDV-3 (LE GAL et al., 2005; SCHAPER et al., 2010).

O desenho dos primers e a escolha cuidadosa da sequência alvo é essencial para assegurar uma amplificação específica e eficiente em uma qPCR. A sequência alvo deve ser única, de 75-200 pb de comprimento, com um teor de GC entre 50-60% e não deve conter estruturas secundárias. Recomenda-se que os primers devem conter de 50-60% de GC e uma temperatura de anelamento de 55-65 ° C. Comumente, para a HDV-qPCR têm se escolhido como alvo sequências conservadas da ribozima e HDAg-S (YAMASHIRO et al., 2004; LE GAL et al., 2005; KIESSLICH et al., 2009; MEDERACKE et al., 2010; SCHAPER et al., 2010; FERNS et al., 2012; SHANG et al., 2012). A presença de G ou C ao longo dos primers deve ser evitada, mas recomenda-se ter G ou C nas extremidades para favorecer a fase de extensão da PCR (TAYLOR et al., 2010). Existem uma série de programas disponíveis para ajudar a escolher os primers, sondas e sequências alvo. Por exemplo, Vector NTI software – Life technologies™ (LU & MORIYAMA, 2004), Primer3 - <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (KORESSAR & REMM, 2007), OLIGO 7 (Rychlik, 2007), PRIMEGENS (SRIVASTAVA & XU, 2007), MPprimer (SHEN et al., 2010), software miRprimer (BUSK, 2014), FastPCR software (KALENDAR et al., 2014).

A otimização da concentração dos primers na solução de PCR é importante, pois influência no resultado final de uma qPCR, visto que a baixa concentração induz a má polimerização e concentrações excessivas induzem ao aparecimento de produtos inespecíficos e formação de dímeros de primers (CHEN & JANES, 2002; PELT-VERKUIL et al., 2008). Então para avaliar a melhor concentração dos primers na RT-qPCR HDV foi aplicado o método de gradiente de concentração, na qual a concentração ideal de primers e sonda foram escolhidas. Outro ponto crítico para a otimização de uma qPCR é a escolha da temperatura de anelamento dos primers. Esta temperatura é determinada a partir da  $T_m$ , frequentemente temperatura de anelamento é selecionada de acordo com a  $T_m$  consensual entre os primers sendo diminuído 2 a 4°C (CHEN & JANES, 2002; PELT-VERKUIL et al., 2008; LORENZ, 2012).

No presente estudo foram desenhados primers e sonda capazes de amplificar uma sequência-alvo de 135 pb correspondente as sequências auto catalíticas da ribozima (CHAO et al., 1990). Os primers alinharam com sequências de RNA HDV isoladas e depositadas no GenBank com score de 90-100, 95-77 e 95-100% para os primer sense, antisense e sonda, respectivamente, o que corresponde a uma ótima especificidade *in silico*. Yamashiro e colaboradores (2004) produziram primers com score de 98% para o genótipo 1, 98% para o genótipo 2, e de 100% para o genótipo 4. Ferns (2012) e Shang e colaboradores (2012) demonstraram através de ensaios *in silico* ter produzido primers que reconhecem todos os genótipos do HDV. A especificidade e a otimização da concentração dos primers foram testadas *in vitro* através da análise da curva de dissociação de uma RT-qPCR utilizando o SYBR Green I (VOGTHERR et al., 1999; LIND et al., 2006; HUNG et al., 2011). Assim como *in silico*, foi confirmada e aprovada a especificidade e o ajuste da concentração *in vitro* dos primers, pois a RT-qPCR produziu curvas de dissociação com picos únicos e com pouca variação de  $T_m$ . Baseados nesses resultados podemos concluir que a HDV RT-PCR não produz primers dímeros e nem *amplicons* inespecíficos. Yamashiro (2004) e Shang (2012) utilizaram o SYBR Green I em suas respectivas HDV-qPCRs, no primeiro estudo na foi expresso a eficiência da reação e no segundo foi observado uma eficiência da curva padrão de 91,4% e a eficiência clínica de 93,2%.

A PCR em tempo real quantitativa é uma ferramenta eficientemente usada para pesquisa e diagnóstico, pois fornece um número absoluto de cópias para um alvo específico. No entanto, é necessário a produção de padrões confiáveis. Yamashiro e colaboradores (2004) escolheram uma sequência de RNA HDV transcrito de 477pb. Ferns (2012) também escolheram um padrão de RNA HDV transcrito, porém utilizaram a transcrição do genoma completo do HDV. A utilização de

padrões de RNAs transcritos mimetizam melhor o genoma selvagem do HDV, por isso podem expressar resultados mais próximos de uma amostra real. Também podem expressar a eficiência da transcrição reversa. No entanto possui as desvantagens de serem instáveis, fácil degradação e a possibilidade de formação de estruturas secundárias, tudo isso aliado ao tamanho da sequência escolhida pode diminuir a eficiência da HDV-qPCR. Outros autores como Le Gal (2005), Kiesslich (2009), Mederacke (2010), Shaper (2010), Shang (2012) e colaboradores optaram por utilizar padrões de cDNA HDV ligado em plasmídeo que requerem menos cuidados pré-analíticos em relação aos padrões de RNA. Ferns (2012) descreveu a utilização de carreadores de RNA por escolherem como padrão o genoma completo do HDV transcrito em RNA após clonagem, onde observaram uma eficiência de 93,8% porém um limite de detecção de 7000 cópias/mL. No presente estudo foram utilizadas medidas para garantir e controlar a qualidade na produção dos padrões para a HDV RT-qPCR. A especificidade e integridade dos *amplicons* de 135 pb do genoma do HDV produzidos na RT-PCR foi observada através de eletroforese em gel de agarose, esta constitui uma etapa importante de seleção de *amplicons* com tamanho e integridade desejados. Os *amplicons* selecionados precisam de um alto grau de pureza para evitar a inserção de sequências indesejadas ou de primers aos plasmídeo. Para tanto foi realizada a purificação dos *amplicons* através da enzima ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA).

Os *amplicons* purificados foram ligados em plasmídeo e clonados em células competentes. Para avaliar a clonagem foi utilizado a técnica de seleção de colônias recombinantes por inibição de crescimento através de antibióticos e por triagem Blue/White, também foi adicionado aos ensaios os controles de transformação, o pUC19, e de células semeadas em LB suplementado com tetraciclina e ampicilina para o controle de qualidade. Após a extração plasmidial o cDNA HDV recombinante ligado em plasmídeo foi avaliado quanto a sua integridade e pureza através da digestão enzimática e quantificação por espectrofotometria, no qual foi credenciado para ser utilizado como um padrão e também para ser usado como molde para transcrição do padrão de RNA HDV. A síntese e integridade do padrão de RNA HDV foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose. A pureza e quantificação foi mensurada por espectrofotometria o qual foi aprovado para ser usado como o padrão de RNA HDV.

A especificidade analítica da HDV RT-qPCR foi confirmada com ensaios *in vitro* onde as amostras de doadores de sangue, de indivíduos monoinfectados HCV e monoinfectados HBV foram negativas nos testes, demonstrando que o teste não produz resultados falso-positivo (especificidade *in vitro* de 100%). A análise da especificidade analítica avaliou a capacidade da HDV RT-qPCR de

detectar a sequência alvo apropriada em vez de outros alvos inespecíficos presentes nas amostras. A especificidade de diagnóstico foi mensurada através do percentual de indivíduos não infectados com o vírus da hepatite Delta identificados nos ensaios como negativo para o HDV.

Yamashiro e colaboradores utilizaram 48 amostras de pacientes anti-HDV e HBsAg reagentes, sendo 14 portadores assintomáticos, 20 crônicos com constantes anormalidades nos níveis de ALT, 14 tinham cirrose hepática. Kiesslich e colaboradores (2009) utilizaram 50 amostras anti-HDV e 100 amostras não reagentes para anti-HDV. Le Gal e colaboradores (2005) utilizaram um ensaio de especificidade com 26 amostras controle negativo, sendo 5 positivas para HBsAg e HBV-DNA, 6 positivas para HCV-RNA, 4 reagentes para anti-HAV IgM, 5 positivas para HIV-RNA, 1 amostra positiva para HEV-RNA e 5 amostras negativas para HBV, HCV, HAV, HEV e HIV. Kiesslich e colaboradores (2009) analisou a especificidade através de 50 amostras anti-HDV e 100 amostras sem HDV. Mederacke e colaboradores (2010) observou a especificidade analítica com 17 amostras positivas para o RNA HDV, 20 amostras de pacientes saudáveis, 20 positivas para DNA HBV, 20 amostras anti-HCV reagentes e 20 amostras anti-HIV reagentes. Shang e colaboradores (2012) utilizou 87 pacientes com anti-HDV (53 anti-HDV IgG positivos com HDV RNA detectável, 46 RNA HDV indetectável, 4 de amostras com HBV, 8 com HCV, HAV, HIV e 10 amostras de pacientes com causas não virais de doenças do fígado. Ferns (2012) testou a especificidade com 59 amostras anti-HDV reagentes, 5 com HBV, 5 com HCV, 5 com HAV e 5 com HIV. Em todos desses estudos observamos a utilização do modelo *in vitro* de ensaio de especificidade através de amostras contendo outros vírus além do HDV e apresentaram especificidade *in vitro* de 100% utilizando amostras controles negativos, estes resultados são semelhantes com obtidos neste estudo.

Na avaliação da sensibilidade da HDV RT-qPCR, das 100 amostras HBsAg e Anti-HDV total positivas utilizadas em nosso estudo, 54% foram positivas através do método HDV-qPCR. O diagnóstico sorológico da infecção pelo HDV revela-se complexo em decorrência da própria história natural da infecção. É importante considerar que o teste sorológico de ELISA usado na avaliação rotineira dos pacientes, constitui um diagnóstico indireto através da detecção de anticorpos IgM e/ou IgG contra o HDAg. A presença desses anticorpos podem não refletir a presença do RNA viral no soro destes indivíduos, pois cada paciente pode encontrar-se numa fase diferente da infecção (JARDI et al., 1994; WEDEMEYER, 2010). O estudo de Jardi e colaboradores (1994) demonstrou que a pesquisa no soro por anti-HDV IgM é menos específica para a infecção crônica pelo HDV do que a pesquisa de RNA HDV, quando comparados com o diagnóstico por detecção intra-hepática do HDAg. No nosso trabalho o método desenvolvido é capaz de detectar o HDV no soro do paciente

de modo direto, pois baseia-se na aferição do RNA HDV, o que pode explicar o fato de 46% amostras Anti-HDV total reagente serem negativas para presença de RNA HDV (LE GAL et al., 2005). Podemos pensar que este grupo de pacientes corresponde àqueles pacientes possivelmente superinfectados autolimitados que evoluíram através da resposta imune para o clareamento viral do HDV, ou pacientes que clarearam o vírus através de tratamento antiviral, ou ainda, pacientes com cargas virais abaixo do limite de detecção. Seja como for, o teste já orienta para exclusão de terapia antiviral ou para o acompanhamento desse grupo de pacientes. Comumente o diagnóstico laboratorial de rotina do HDV é realizado por métodos imunoenzimáticos, no entanto nos últimos anos os métodos moleculares de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) baseados na técnica *in house* de PCR em tempo real quantitativa tem se mostrado mais específicos para o diagnóstico de várias doenças (SALDANHA, 2001; SALDANHA, et al., 2005; BAYLIS, et al., 2008)

Segundo Bustin (2009) a sensibilidade analítica refere-se ao número mínimo de cópias do RNA HDV presente numa amostra que podem ser medidos com precisão pela RT-qPCR, ao passo que a sensibilidade clínica é a percentagem de indivíduos infectados com o HDV que o ensaio identifica como positivo. Comumente, a sensibilidade analítica é expressa como o limite de detecção da RT-qPCR, que é a concentração que pode ser detectada com certeza razoável (95% de probabilidade é comumente utilizado). Procedimentos experimentais incluem, geralmente os passos de processamento da amostra (isto é, a extração e transcrição reversa) no qual quando são considerados podem expressar valores de limite de detecção mais próximos da realidade de uma amostra biológica (BUSTIN, 2009). No presente estudo o limite de detecção e o intervalo dinâmico linear validados na HDV RT-qPCR ( $1.3 \times 10^2$  a  $1.3 \times 10^7$  e  $8.4 \times 10^1$  a  $8.4 \times 10^6$  cópias/mL) demonstrou uma sensibilidade analítica capaz detectar até 130 e 84 cópias/mL para o padrão cDNA e RNA HDV, respectivamente.

O menor limite de detecção publicado até o momento é de 75 cópias/mL (MEDERACKE et al., 2010) numa HDV-qPCR baseada em sonda de hidrólise e um padrão de cDNA do genoma completo do HDV ligado em plasmídeo, porém não é relatado a eficiência da HDV-qPCR. Os maiores limites de detecção publicados até o momento são de 1.000 cópias/mL de Le Gal e colaboradores (2005) no qual utilizaram um padrão de 865pb de cDNA HDV ligado em plasmídeo (93% de eficiência), Shaper e colaboradores também observou um limite de detecção de 1.000 cópias/mL utilizando um padrão do genoma completo de cDNA HDV ligado em plasmídeo (81% de eficiência), Shang e colaboradores (2012) apresentou um limite de detecção de 640 cópias/mL com um padrão de 768pb de cDNA HDV ligado em plasmídeo (91,4% de eficiência) e Ferns (2012)

observou um limite de detecção de 7.000 cópias/mL através de um padrão de transcrito do genoma completo de RNA HDV (93,8% de eficiência) (FERNS et al., 2012),

O coeficiente de correlação (Pearson) da nossa HDV RT-qPCR foi  $R^2 = 0,97$  e  $0,99$  demonstrando uma excelente linearidade das curvas de regressão linear produzidas. A eficiência do nosso ensaio HDV-qPCR utilizando o HDV padrão de cDNA é excelente, alcançando em média 99,8% (slope de -3.325). No entanto a mesma eficiência não foi atingida quando utilizamos o HDV padrão de RNA, mostrando um resultado insatisfatório em relação ao padrão de cDNA de 119% (slope de -2,926). Este último resultado de baixa eficiência pode ser explicado pelo fato da instabilidade natural do ácido ribonucleico (RNA), principalmente quando existe a necessidade de armazenamento. Em 2010, Dhanasekaran e colaboradores compararam a estabilidade durante o armazenamento de quatro tipos de padrões comumente usados; amplicons com e sem purificação e sequência alvo clonadas em plasmídeo circular e linearizado através da análise da variação do número de cópias, a eficiência da qPCR e o coeficiente de correlação da curva de regressão ( $R^2$ ). Verificou-se uma variação no números de cópias devido à degradação dos padrões durante um período de 14 dias durante o armazenamento á  $4^\circ\text{C}$  e  $-20^\circ\text{C}$ , o que afetou significativamente a eficiência da PCR. As sequências alvo clonados foram mais estáveis do que os *amplicons*, o que pode conduzir a uma grande variação nos resultados usando padrões construídos por diferentes metodologias (DHANASEKARAN et al., 2010).

Os testes de precisão a curto e a longo prazo, os chamados teste de repetibilidade e reprodutibilidade, foram realizados através do intra e inter-ensaio, respectivamente. A repetibilidade refere-se à precisão e robustez do ensaio utilizando as mesmas amostras repetidamente no mesmo ensaio. E pode ser expressa através do DP da variação dos valores de *Ct*. Alternativamente, pode ser usado o DP ou o CV para o número de cópias ou variação de concentração. CV não deve ser utilizado com os padrões (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008)

A reprodutibilidade de uma RT-qPCR refere-se à variação dos resultados da quantificação entre as execuções (ou ensaios), em dias ou entre laboratórios diferentes. E é geralmente expressa como o DP ou o CV do número de cópias. O valores de *Ct* gerados a partir de diferentes ensaios estão sujeitos a variação inerente nos inter-ensaio, portanto, não é apropriado relatar os valores de *Ct* nos testes inter-ensaios (HELLEMANS et al., 2007).

Os testes de repetibilidade mostrou que o teste de HDV-qPCR desenvolvido neste estudo, é preciso e confiável através do intra-ensaio ( $DP \pm 0,38$  e  $0,35$ ), para ambos os padrões (tabelas 1 e

2), e o teste de reprodutibilidade através do inter-ensaio (CV de 0,18 a 0,05) demonstrou baixa variação de resultados na quantificação viral no soro (tabela 3). Le Gal e colaboradores (2005) relatam um coeficiente de variação de 2,6% e 0,6% para as diluições do padrão  $10^3$  e  $10^9$  cópias/mL, respectivamente. Kiesslich e colaboradores (2009) observou um coeficiente de variação de 16% na concentração de  $10^6$  cópias/mL e 28% na concentração de  $10^2$  cópias/mL do padrão. Shang e colaboradores (2012) observou um coeficiente de variação de 2,87% para um controle com carga viral baixa (3.200 cópias/mL) e 2,03% para um controle com alta carga viral (2.500.000 cópias/mL).

Vários ensaios HDV RT-qPCR *in house* foram desenvolvidos com intervalo dinâmico linear, limite de detecção, eficiência, sondas de hidrólise, primers diferentes e utilizando calibradores padrão diferentes entre si, não existindo um consenso internacional para quantificação deste vírus (YAMASHIRO et al., 2004; LE GAL et al., 2005; KIESSLICH et al., 2009; MEDERACKE et al., 2010; SCHAPER et al., 2010; FERNS et al., 2012; SHANG et al., 2012).

A qPCR e RT-qPCR tornou-se a tecnologia de referência para a detecção e quantificação de ácidos nucleicos nas pesquisas, configuração de diagnóstico, investigação forense e biotecnologia. No entanto, as condições pré-analíticas mal sucedidas, ensaios mal desenhados e metodologias inadequadas análise de dados levam a resultados que são, na melhor das hipóteses, inconsistentes e, na pior, irrelevantes e até mesmo enganosos (BUSTIN, et al., 2013). Segundo Bustin (2010) existe uma lamentável falta de transparência dos protocolos em relação aos materiais e métodos de diversas publicações, principalmente aquelas com altos fatores de impacto. Isto representa um problema na integridade das literaturas científicas, com consequências graves não só para a pesquisa básica, mas implicações potencialmente desastrosas para o desenvolvimento de medicamentos e monitoramento da doença. Pensando nisso foi desenvolvido um conjunto de diretrizes que propõem um padrão como as informações mínimas para a publicação de experimentos de qPCR (*MIQE Guidelines*) (BUSTIN et al., 2009; BUSTIN et al., 2010; BUSTIN, 2010). Os *MIQE Guidelines* foram utilizados para o desenho metodológico do presente estudo. A implementação dessas diretrizes é um requisito importante para o desenvolvimento de uma tecnologia quantificação de ácidos nucleicos precisa e confiável robusta, como por exemplo a HDV RT-PCR (BUSTIN 2010).

Os resultados apresentados neste estudo foram validados cientificamente através de publicação em revista indexada na *Journal of Virological Methods* (BOTELHO-SOUZA et al., 2014)

(APÊNDICE A), Em Rondônia recentemente um estudo de desenvolvimento e validação de uma qPCR para detecção do HBV (SANTOS et al., 2014) (APÊNDICE B) possibilitará o estudo da interação entre os dois vírus durante a replicação e terapia.

A determinação de genótipos do HDV já é bem estabelecida através de sequenciamento e PCR-RFLP em literaturas anteriores demonstrando boa sensibilidade e utilidade (WU et al., 1995; WU et al., 1998; MIRSHAFIEE et al., 2009). Foi caracterizada uma prevalência de 92% do HDV-3 (48 amostras). A boa surpresa do estudo foi o isolamento do HDV-1 (prevalência de 8%, 4 amostras). Até o presente estudo havia uma certa desconfiança a respeito da presença do HDV-1 na região amazônica, mesmo já tendo sido descrito o isolamento a partir de uma única amostra de soro em 2006 por Paraná e colaboradores. Essa dúvida persistia pelo fato de que em estudos posteriores o HDV-1 não foi encontrado (GOMES-GOUVÊA et al., 2009; ALVARADO-MORA et al., 2010). Os resultados obtidos na nested PCR-RFLP foram avaliados através do sequenciamento de 16 amostras, sendo 12 HDV-3 e 4 HDV-1. Os 12 isolados HDV-3 se alinharam com sequências de HDV-3 do Brasil e do mundo e o mesmo aconteceu para o genótipo 1. Com isso podemos inferir que a nested PCR-RFLP foi validada através da comparação com o sequenciamento e análise filogenética, indicando a confiabilidade do ensaio para a determinação do genótipo de HDV isolados na região Amazônia. Este resultado nos dá autonomia em relação a genotipagem por sequenciamento, pois não existe uma plataforma de sequenciamento disponível no estado.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No presente estudo foi desenvolvido um sistema de HDV-qPCR e nested PCR-RFLP capaz de quantificar e genotipar o HDV RNA através de amostras de soro de pacientes portadores do HDV, que serve de ferramenta para um diagnóstico rápido, preciso e confiável para o acompanhamento antiviral dos pacientes na região da Amazônia Ocidental. Com estes resultados se abrem enormes possibilidades de novos estudos clínicos de eficácia da terapêutica antiviral empregada nos pacientes portadores de hepatite Delta, assim como no entendimento da cinética viral e dos papéis dos genótipos do HDV concomitante com o HBV que nos permita entender como estes dois vírus interagem em diferentes momentos da infecção e, especialmente, durante o tratamento.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Avaliar a especificidade analítica in vitro com amostras contendo HDV-2, HDV-4, HDV-5, HDV-6, HDV-7 e HDV-8;

- Avaliar o desempenho analítico e estabilidade utilizando os padrões de cDNA e RNA HDV liofilizado;
- Avaliar o desempenho analítico e estabilidade utilizando os padrões de cDNA e RNA HDV encapsulado em nanopartículas biodegradáveis.

## 9. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic acids research* 1997, **25**(17):3389-3402.

ALVARADO-MORA MV, ROMANO CM, GOMES-GOUVEA MS, GUTIERREZ MF, CARRILHO FJ, PINHO JR: **Dynamics of hepatitis D (Delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America.** *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2011, **11**(6):1462-1468.

ALVES C, FREITAS N, CUNHA C: **Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis Delta virus antigen.** *Virology* 2008, **370**(1):12-21.

BARRERA A, GUERRA B, NOTVALL L, LANFORD RE: **Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition.** *Journal of virology* 2005, **79**(15):9786-9798.

BARROS LM, GOMES-GOUVEA MS, PINHO JR, ALVARADO-MORA MV, DOS SANTOS A, MENDES-CORREA MC, CALDAS AJ, SOUSA MT, SANTOS MD, FERREIRA AS: **Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves?** *Virus research* 2011, **160**(1-2):333-339.

BAYLIS SA, HEATH AB, CHUDY M, PISANI G, KLOTZ A, KERBY S, GERLICH W: **An international collaborative study to establish the 2nd World Health Organization International Standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification technology-based assays.** *Vox sanguinis* 2008, **94**(4):358-362.

BEEN MD, Perrotta AT, Rosenstein SP: **Secondary structure of the self-cleaving RNA of hepatitis Delta virus: applications to catalytic RNA design.** *Biochemistry* 1992, **31**(47):11843-11852.

BEEN MD: **HDV ribozymes.** *Current topics in microbiology and immunology* 2006, **307**:47-65.

BENSABATH G, HADLER SC, SOARES MC, FIELDS H, DIAS LB, POPPER H, MAYNARD JE: **Hepatitis Delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1987a, **258**(4):479-483.

BENSABATH G, HADLER SC, SOARES MC, FIELDS H, MAYNARD JE: **Epidemiologic and serologic studies of acute viral hepatitis in Brazil's Amazon Basin.** *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1987b, **21**(1):16-27.

BONINO F, HEERMANN KH, RIZZETTO M, GERLICH WH: **Hepatitis Delta virus: protein composition of Delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope.** *Journal of virology* 1986, **58**(3):945-950.

BONINO F, RECCHIA S, PONZETTO A, FILIPPONE B, PALLA M, ZANETTI AR, FERRONI P: **A solid-phase enzyme immunoassay (EIA) for detection of HBeAg and anti-HBe.** *Journal of immunological methods* 1980, **33**(2):195-200.

BOTELHO-SOUZA LF, DOS SANTOS AO, BORZACOV LM, HONDA ER, VILLALOBOS-SALCEDO JM, VIEIRA DS: **Development of a reverse transcription quantitative real-time PCR-based system for rapid detection and quantitation of hepatitis Delta virus in the western Amazon region of Brazil.** *Journal of virological methods* 2014, **197**:19-24.

BRANCH AD, BENENFELD BJ, BAROUDY BM, WELLS FV, GERIN JL, ROBERTSON HD: **An ultraviolet-sensitive RNA structural element in a viroid-like domain of the hepatitis Delta virus.** *Science* 1989, **243**(4891):649-652.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. **Boletim epidemiológico hepatites virais.** 3º ano, Brasília-DF, 2012.

BRICHLER S, LE GAL F, BUTT A, CHEVRET S, GORDIEN E: **Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis Delta virus viremia.** *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2013, **11**(6):734-740.

BUSK PK: **A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR.** *BMC bioinformatics* 2014, **15**(1):29.

BUSTIN SA, BEAULIEU JF, HUGGETT J, JAGGI R, KIBENGE FS, OLSVIK PA, PENNING LC, TOEGEL S: **MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments.** *BMC molecular biology* 2010, **11**:74.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON J, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY G *ET AL*: **The need for transparency and good practices in the qPCR literature.** *Nature methods* 2013, **10**(11):1063-1067.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL *ET AL*: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clinical chemistry* 2009, **55**(4):611-622.

BUSTIN SA: **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *Journal of molecular endocrinology* 2000, **25**(2):169-193.

BUSTIN SA: **Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics.** *Expert review of molecular diagnostics* 2010, **10**(6):713-715.

BUTI M, ESTEBAN R, ROGGENDORF M, FERNANDEZ J, JARDI R, RASHOFER R, ALLENDE H, GENESCA J, ESTEBAN JI, GUARDIA J: **Hepatitis D virus RNA in acute Delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection.** *Hepatology* 1988, **8**(5):1125-1129.

BUTI M, HOMS M, RODRIGUEZ-FRIAS F, FUNALLERAS G, JARDI R, SAULEDA S, TABERNERO D, SCHAPER M, ESTEBAN R: **Clinical outcome of acute and chronic hepatitis Delta over time: a long-term follow-up study.** *Journal of viral hepatitis* 2011, **18**(6):434-442.

BUTI M, JARDI R, ALLENDE H, COTRINA M, RODRIGUEZ F, VILADOMIU L, ESTEBAN R, GUARDIA J: **Chronic Delta hepatitis: is the prognosis worse when associated with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infections?** *Journal of medical virology* 1996, **49**(1):66-69

BUTI M, LOPEZ-TALAVERA JC, ALLENDE H, JARDI R, ESTEBAN R, GUARDIA J: **Serological diagnosis of chronic Delta infection: correlation between serological markers and hepatitis Delta virus RNA in hepatic tissue.** *Progress in clinical and biological research* 1993, **382**:319-323.

CANESE MG, RIZZETTO M, ARICO S, CRIVELLI O, ZANETTI AR, MACCHIORLATTI E, PONZETTO A, LEONE L, MOLLO F, VERME G: **An ultrastructural and immunohistochemical study on the Delta antigen associated with the hepatitis B virus.** *The Journal of pathology* 1979, **128**(4):169-175.

CASEY JL, BERGMANN KF, BROWN TL, GERIN JL: **Determinants of RNA editing in hepatitis Delta virus.** *Progress in clinical and biological research* 1993a, **382**:5-11.

CASEY JL, BROWN TL, COLAN EJ, WIGNALL FS, GERIN JL: **A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993b, **90**(19):9016-9020.

CASEY JL: **Control of ADAR1 editing of hepatitis Delta virus RNAs.** *Current topics in microbiology and immunology* 2012, **353**:123-143.

CHANG J, NIE X, CHANG HE, HAN Z, TAYLOR J: **Transcription of hepatitis Delta virus RNA by RNA polymerase II.** *Journal of virology* 2008, **82**(3):1118-1127.

CHANG MF, BAKER SC, SOE LH, KAMAHORA T, KECK JG, MAKINO S, GOVINDARAJAN S, LAI MM: **Human hepatitis Delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity.** *Journal of virology* 1988, **62**(7):2403-2410.

CHAO M, HSIEH SY, TAYLOR J: **Role of two forms of hepatitis Delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication.** *Journal of virology* 1990, **64**(10):5066-5069.

CHAO M, WANG TC, LEE SE: **Detection of hepatitis Delta virus recombinants in cultured cells co-transfected with cloned genotypes I and IIb DNA sequences.** *Journal of virological methods* 2006, **137**(2):252-258.

CHAO YC, CHANG MF, GUST I, LAI MM: **Sequence conservation and divergence of hepatitis Delta virus RNA.** *Virology* 1990, **178**(2):384-392.

CHEN BY, JANES HW, CHEN S: **Computer programs for PCR primer design and analysis.** *Methods in molecular biology* 2002, **192**:19-29.

CHEN PJ, KALPANA G, GOLDBERG J, MASON W, WERNER B, GERIN J, TAYLOR J: **Structure and replication of the genome of the hepatitis Delta virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, **83**(22):8774-8778.

DEEPAK S, KOTTAPALLI K, RAKWAL R, OROS G, RANGAPPA K, IWAHASHI H, MASUO Y, AGRAWAL G: **Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes.** *Current genomics* 2007, **8**(4):234-251.

DENY P: **Hepatitis Delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades?** *Current topics in microbiology and immunology* 2006, **307**:151-171.

DHANASEKARAN S, DOHERTY TM, KENNETH J, GROUP TBTS: **Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification.** *Journal of immunological methods* 2010, **354**(1-2):34-39.

EIRAS, M., DARÒS, J.A., FLORES, R. & KITAJIMA, E.W. **Viróides e virusóides: relíquias do mundo de RNA.** *Fitopatologia Brasileira* 31:229-246. 2006

ENGELKE M, MILLS K, SEITZ S, SIMON P, GRIPON P, SCHNOLZER M, URBAN S: **Characterization of a hepatitis B and hepatitis Delta virus receptor binding site.** *Hepatology* 2006, **43**(4):750-760.

FARCI P, NIRO GA: **Clinical features of hepatitis D.** *Seminars in liver disease* 2012, **32**(3):228-236.

FARCI P: **Delta hepatitis: an update.** *Journal of hepatology* 2003, **39** Suppl 1:S212-219.

FERNS RB, NASTOULI E, GARSON JA: **Quantitation of hepatitis Delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard.** *Journal of virological methods* 2012, **179**(1):189-194.

FERRE-D'AMARE AR, ZHOU K, DOUDNA JA: **Crystal structure of a hepatitis Delta virus ribozyme.** *Nature* 1998, **395**(6702):567-574.

FLORES R, GRUBB D, ELLEUCH A, NOHALES MA, DELGADO S, GAGO S: **Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis Delta virus: variations on a theme.** *RNA biology* 2011, **8**(2):200-206.

FU TB, TAYLOR J: **The RNAs of hepatitis Delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates.** *Journal of virology* 1993, **67**(12):6965-6972.

GLENN JS, WATSON JA, HAVEL CM, WHITE JM: **Identification of a prenylation site in Delta virus large antigen.** *Science* 1992, **256**(5061):1331-1333.

GLENN JS, WHITE JM: **trans-dominant inhibition of human hepatitis Delta virus genome replication.** *Journal of virology* 1991, **65**(5):2357-2361.

GOMES-GOUVEA MS, PEREIRA SOARES MDO C, GUEDES DE CARVALHO MELLO IM, BRITO EM, PEREIRA MOIA LDE J, BENSABATH G, NUNES HM, CARRILHO FJ, PINHO JR: **Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin.** *Acta tropica* 2008, **106**(3):149-155.

GOMES-GOUVEA MS, SOARES MC, BENSABATH G, DE CARVALHO-MELLO IM, BRITO EM, SOUZA OS, QUEIROZ AT, CARRILHO FJ, PINHO JR: **Hepatitis B virus and hepatitis Delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region.** *The Journal of general virology* 2009, **90**(Pt 11):2638-2643.

GRECO-STEWART VS, SCHISSEL E, PELCHAT M: **The hepatitis Delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III.** *Virology* 2009, **386**(1):12-15.

HASEGAWA M, KISHINO H, YANO T: **Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA.** *Journal of molecular evolution* 1985, **22**(2):160-174.

HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM: **Real time quantitative PCR.** *Genome research* 1996, **6**(10):986-994.

HELLEMANS J, MORTIER G, DE PAEPE A, SPELEMAN F, VANDESOMPELE J: **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome biology* 2007, **8**(2):R19.

HIGHLEYMAN L: **Hepatitis Delta Increases the Risk of Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in People with Hepatitis B 2009.** Disponível em: <[http://www.hivandhepatitis.com/hep\\_b/news/2009/022409\\_b.html](http://www.hivandhepatitis.com/hep_b/news/2009/022409_b.html)>, publicado em 24.02.09. Acessado dia 04 de Novembro de 2010 às 13h:00min.

HUGHES SA, WEDEMEYER H, HARRISON PM: **Hepatitis Delta virus.** *Lancet* 2011, **378**(9785):73-85.

HUNG CC, LIN SY, LIN SP, CHEN CP, CHEN LY, LEE CN, SU YN: **Quantitative and qualitative analyses of the SNRPN gene using real-time PCR with melting curve analysis.** *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2011, **13**(6):609-613.

HWANG SB, LAI MM: **Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large Delta antigen and hepatitis B virus surface antigen.** *Journal of virology* 1993, **67**(12):7659-7662.

IMAZEKI F, OMATA M, OHTO M: **Complete nucleotide sequence of hepatitis Delta virus RNA in Japan.** *Nucleic acids research* 1991, **19**(19):5439.

ISHMAEL FT, STELLATO C: **Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician.** *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2008, **101**(4):437-443.

IVANIUSHINA V, RADJEF N, ALEXEEVA M, GAULT E, SEMENOV S, SALHI M, KISELEV O, DENY P: **Hepatitis Delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia.** *The Journal of general virology* 2001, **82**(Pt 11):2709-2718.

JARDI R, BUTI M, RODRIGUEZ F, COTRINA M, ALLENDE H, ESTEBAN R, GUARDIA J: **Comparative analysis of serological markers of chronic Delta infection: HDV-RNA, serum HDAg and anti-HD IgM.** *Journal of virological methods* 1994, **50**(1-3):59-66.

JOHNSON G, NOLAN T, BUSTIN SA: **Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE.** *Methods in molecular biology* 2013, **943**:1-16.

KIESSLICH D, CRISPIM MA, SANTOS C, FERREIRA FDE L, FRAIJI NA, KOMNINAKIS SV, DIAZ RS: **Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis Delta virus.** *The Journal of infectious diseases* 2009, **199**(11):1608-1611.

KOLMODIN LA, BIRCH DE: **Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice.** *Methods in molecular biology* 2002, **192**:3-18.

KORESSAAR T, REMM M: **Enhancements and modifications of primer design program Primer3.** *Bioinformatics* 2007, **23**(10):1289-1291.

KOS A, DIJKEMA R, ARNBERG AC, VAN DER MEIDE PH, SCHELLEKENS H: **The hepatitis Delta (Delta) virus possesses a circular RNA.** *Nature* 1986, **323**(6088):558-560.

KUBISTA M, ANDRADE JM, BENGTTSSON M, FOROOTAN A, JONAK J, LIND K, SINDELKA R, SJOBACK R, SJOGREEN B, STROMBOM L ET AL: **The real-time polymerase chain reaction.** *Molecular aspects of medicine* 2006, **27**(2-3):95-125.

KUO MY, GOLDBERG J, COATES L, MASON W, GERIN J, TAYLOR J: **Molecular cloning of hepatitis Delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications.** *Journal of virology* 1988, **62**(6):1855-1861.

LAI MM: **Molecular biologic and pathogenetic analysis of hepatitis Delta virus.** *Journal of hepatology* 1995, **22**(1 Suppl):127-131.

LAI MM: **RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis Delta virus.** *Journal of virology* 2005, **79**(13):7951-7958.

LE GAL F, GAULT E, RIPALUT MP, SERPAGGI J, TRINCHET JC, GORDIEN E, DENY P: **Eighth major clade for hepatitis Delta virus.** *Emerging infectious diseases* 2006, **12**(9):1447-1450.

LE GAL F, GORDIEN E, AFFOLABI D, HANSLIK T, ALLOUI C, DENY P, GAULT E: **Quantification of hepatitis Delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients.** *Journal of clinical microbiology* 2005, **43**(5):2363-2369.

LEE CZ, CHEN PJ, LAI MM, CHEN DS: **Isoprenylation of large hepatitis Delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis Delta virus assembly.** *Virology* 1994, **199**(1):169-175.

LI YJ, MACNAUGHTON T, GAO L, LAI MM: **RNA-templated replication of hepatitis Delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies.** *Journal of virology* 2006, **80**(13):6478-6486.

LI YJ, STALLCUP MR, LAI MM: **Hepatitis Delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication.** *Journal of virology* 2004, **78**(23):13325-13334.

LIND K, STAHLBERG A, ZORIC N, KUBISTA M: **Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis.** *BioTechniques* 2006, **40**(3):315-319.

LOENEN WA, DRYDEN DT, RALEIGH EA, WILSON GG, MURRAY NE: **Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes.** *Nucleic acids research* 2014, **42**(1):3-19.

LORENZ TC: **Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies.** *Journal of visualized experiments : JoVE* 2012(63):e3998.

LU G, MORIYAMA EN: **Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite.** *Briefings in bioinformatics* 2004, **5**(4):378-388.

MAKINO S, CHANG MF, SHIEH CK, KAMAHORA T, VANNIER DM, GOVINDARAJAN S, LAI MM: **Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis Delta (Delta) virus RNA.** *Nature* 1987, **329**(6137):343-346.

MAKUWA M, MINTSA-NDONG A, SOUQUIERE S, NKOGHE D, LEROY EM, KAZANJI M: **Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis Delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa.** *Journal of clinical microbiology* 2009, **47**(7):2265-2268.

MEDERACKE I, BREMER B, HEIDRICH B, KIRSCHNER J, DETERDING K, BOCK T, WURSTHORN K, MANNS MP, WEDEMEYER H: **Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics.** *Journal of clinical microbiology* 2010, **48**(6):2022-2029.

MESSING J, GRONENBORN B, MULLER-HILL B, HANS HOPSCHEIDER P: **Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindIII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form *in vitro*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, **74**(9):3642-3646.

MIRSHAFIEE H, MAHMOODIAN-SHOOSHTARI M, SHARIFI Z, HOSSEINI SM: **Genotype analysis of hepatitis Delta virus from hepatitis B surface antigen-positive patients using PCR-RFLP in Tehran, Iran.** *Archives of Iranian medicine* 2009, **12**(3):238-243.

MODAHL LE, MACNAUGHTON TB, ZHU N, JOHNSON DL, LAI MM: **RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis Delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases.** *Molecular and cellular biology* 2000, **20**(16):6030-6039.

MU JJ, TSAY YG, JUAN LJ, FU TF, HUANG WH, CHEN DS, CHEN PJ: **The small Delta antigen of hepatitis Delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis.** *Virology* 2004, **319**(1):60-70.

MU JJ, WU HL, CHIANG BL, CHANG RP, CHEN DS, CHEN PJ: **Characterization of the phosphorylated forms and the phosphorylated residues of hepatitis Delta virus Delta antigens.** *Journal of virology* 1999, **73**(12):10540-10545.

NATHANS D, SMITH HO: **Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules.** *Annual review of biochemistry* 1975, **44**:273-293.

NIRO GA, SMEDILE A, ANDRIULLI A, RIZZETTO M, GERIN JL, CASEY JL: **The predominance of hepatitis Delta virus genotype I among chronically infected Italian patients.** *Hepatology* 1997, **25**(3):728-734.

NIRO GA, SMEDILE A, IPPOLITO AM, CIANCIO A, FONTANA R, OLIVERO A, VALVANO MR, ABATE ML, GIOFFREDA D, CAVIGLIA GP ET AL: **Outcome of chronic Delta hepatitis in Italy: a long-term cohort study.** *Journal of hepatology* 2010, **53**(5):834-840.

NOVAIS CM, PIRES-ALVES M: **PCR em tempo real.** *Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* Edição nº 33, junho/dezembro de 2004.

OLIVEIRA TMS. Dissertação: **PCR em tempo real: métodos e aplicações.** Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia. 2010.

PANG X, LEE B, CHUI L, PREIKSAITIS JK, MONROE SS: **Evaluation and validation of real-time reverse transcription-pcr assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus.** *Journal of clinical microbiology* 2004, **42**(10):4679-4685.

PARANA R, KAY A, MOLINET F, VIANA S, SILVA LK, SALCEDO JM, TAVARES-NETO J, LOBATO C, RIOS-LEITE M, MATTEONI L *ET AL*: **HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: A preliminary report.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2006, **75**(3):475-479.

PASCARELLA S, NEGRO F: **Hepatitis D virus: an update.** *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2011, **31**(1):7-21.

PELT-VERKUIL EV, BELKUM AV, HAYS JP: **Principles and technical aspects of PCR amplification.** Dordrecht: Springer; 2008.

PURCELL RH, RIZZETTO M, GERIN JL: **Hepatitis Delta virus infection of the liver.** *Seminars in liver disease* 1984, **4**(4):340-346.

RADJEF N, GORDIEN E, IVANIUSHINA V, GAULT E, ANAIS P, DRUGAN T, TRINCHET JC, ROULOT D, TAMBY M, MILINKOVITCH MC *ET AL*: **Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis Delta virus, suggesting a Deltavirus genus of at least seven major clades.** *Journal of virology* 2004, **78**(5):2537-2544.

RAMIA S, EL-ZAATARI M, SHARARA AI, RAMLAWI F, FARHAT B: **Current prevalence of hepatitis Delta virus (HDV) infection and the range of HDV genotypes in Lebanon.** *Epidemiology and infection* 2007, **135**(6):959-962.

RIZZETTO M, CANESE MG, ARICO S, CRIVELLI O, TREPO C, BONINO F, VERME G: **Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (Delta/anti-Delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers.** *Gut* 1977, **18**(12):997-1003.

RIZZETTO M, CANESE MG, GERIN JL, LONDON WT, SLY DL, PURCELL RH: **Transmission of the hepatitis B virus-associated Delta antigen to chimpanzees.** *The Journal of infectious diseases* 1980d, **141**(5):590-602.

RIZZETTO M, HOYER B, CANESE MG, SHIH JW, PURCELL RH, GERIN JL: **Delta Agent: association of Delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of Delta-infected chimpanzees.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980ba, **77**(10):6124-6128.

RIZZETTO M, PONZETTO A, FORZANI I: **Hepatitis Delta virus as a global health problem.** *Vaccine* 1990, **8** Suppl:S10-14; discussion S21-13.

RIZZETTO M, PURCELL RH, GERIN JL: **Epidemiology of HBV-associated Delta agent: geographical distribution of anti-Delta and prevalence in polytransfused HBsAg carriers.** *Lancet* 1980c, **1**(8180):1215-1218.

RIZZETTO M, SHIH JW, GERIN JL: **The hepatitis B virus-associated Delta antigen: isolation from liver, development of solid-phase radioimmunoassays for Delta antigen and anti-Delta and partial characterization of Delta antigen.** *Journal of immunology* 1980ab, **125**(1):318-324.

RIZZETTO M, SHIH JW, GOCKE DJ, PURCELL RH, VERME G, GERIN JL: **Incidence and significance of antibodies to Delta antigen in hepatitis B virus infection.** *Lancet* 1979, **2**(8150):986-990.

RIZZETTO M, VERME G: **Delta hepatitis--present status.** *Journal of hepatology* 1985, **1**(2):187-193.

ROGGENDORF M: **Perspectives for a vaccine against hepatitis Delta virus.** *Seminars in liver disease* 2012, **32**(3):256-261.

ROMEO R, DEL NINNO E, RUMI M, RUSSO A, SANGIOVANNI A, DE FRANCHIS R, RONCHI G, COLOMBO M: **A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2009, **136**(5):1629-1638.

RUTLEDGE RG, COTE C: **Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves.** *Nucleic acids research* 2003, **31**(16):e93.

RYCHLIK W: **OLIGO 7 primer analysis software**. *Methods in molecular biology* 2007, **402**:35-60.

SAKUGAWA H, NAKASONE H, NAKAYOSHI T, KAWAKAMI Y, MIYAZATO S, KINJO F, SAITO A, MA SP, HOTTA H, KINOSHITA M: **Hepatitis Delta virus genotype 1b predominates in an endemic area, Okinawa, Japan**. *Journal of medical virology* 1999, **58**(4):366-372.

SALDANHA J, GERLICH W, LELIE N, DAWSON P, HEERMANN K, HEATH A, GROUP WHOCS: **An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques**. *Vox sanguinis* 2001, **80**(1):63-71.

SALDANHA J, HEATH A, ABERHAM C, ALBRECHT J, GENTILI G, GESSNER M, PISANI G: **World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays**. *Vox sanguinis* 2005, **88**(3):202-204.

SALEHI-ASHTIANI K, LUPTAK A, LITOVCHICK A, SZOSTAK JW: **A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene**. *Science* 2006, **313**(5794):1788-1792.

SANTOS AO, BOTELHO-SOUZA LF, BORZACOV LM, VILLALOBOS-SALCEDO JM, VIEIRA DS: **Development of cost-effective real-time PCR test: to detect a wide range of HBV DNA concentrations in the western amazon region of Brazil**. *Virology journal* 2014, **11**(1):16.

SANTOS CF, SAKAI VT, MACHADO MA, SCHIPPERS DN, GREENE AS: **Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry**. *Journal of applied oral science : revista FOB* 2004, **12**(1):1-11.

SARACCO G, ROSINA F, BRUNETTO MR, AMOROSO P, CAREDDA F, FARCI P, PIANTINO P, BONINO F, RIZZETTO M: **Rapidly progressive HBsAg-positive hepatitis in Italy. The role of hepatitis Delta virus infection**. *Journal of hepatology* 1987, **5**(3):274-281.

SCHAPER M, RODRIGUEZ-FRIAS F, JARDI R, TABERNERO D, HOMS M, RUIZ G, QUER J, ESTEBAN R, BUTI M: **Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis Delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D**. *Journal of hepatology* 2010, **52**(5):658-664.

SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ: **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method**. *Nature protocols* 2008, **3**(6):1101-1108.

SHAKIL AO, HADZIYANNIS S, HOOFNAGLE JH, DI BISCEGLIE AM, GERIN JL, CASEY JL: **Geographic distribution and genetic variability of hepatitis Delta virus genotype I**. *Virology* 1997, **234**(1):160-167.

SHANG D, HUGHES SA, HORNER M, BRUCE MJ, DONG Y, CAREY I, SUDDLE AR, AGARWAL K, HARRISON PM, ATKINS M: **Development and validation of an efficient in-house real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the quantitative detection of serum hepatitis Delta virus RNA in a diverse South London population**. *Journal of virological methods* 2012, **184**(1-2):55-62.

SHARMEEN L, KUO MY, DINTER-GOTTLIEB G, TAYLOR J: **Antigenomic RNA of human hepatitis Delta virus can undergo self-cleavage**. *Journal of virology* 1988, **62**(8):2674-2679.

SHEN Z, QU W, WANG W, LU Y, WU Y, LI Z, HANG X, WANG X, ZHAO D, ZHANG C: **MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design**. *BMC bioinformatics* 2010, **11**:143.

SHEU GT: **Initiation of hepatitis Delta virus (HDV) replication: HDV RNA encoding the large Delta antigen cannot replicate**. *The Journal of general virology* 2002, **83**(Pt 10):2507-2513.

SHEU SY, CHEN KL, LEE YW, LO SJ: **No intermolecular interaction between the large hepatitis Delta antigens is required for the secretion with hepatitis B surface antigen: a model of empty HDV particle**. *Virology* 1996, **218**(1):275-278.

SMEDILE A, FARCI P, VERME G, CAREDDA F, CARGNEL A, CAPORASO N, DENTICO P, TREPO C, OPOLON P, GIMSON A *ET AL*: **Influence of Delta infection on severity of hepatitis B.** *Lancet* 1982, **2**(8305):945-947.

SMEDILE A, NIRO MG, RIZZETTO M: **Detection of serum HDV RNA by RT-PCR.** *Methods in molecular medicine* 2004, **95**:85-93.

SRIVASTAVA GP, XU D: **Genome-scale probe and primer design with PRIMEGENS.** *Methods in molecular biology* 2007, **402**:159-176.

SU CW, HUANG YH, HUO TI, SHIH HH, SHEEN IJ, CHEN SW, LEE PC, LEE SD, WU JC: **Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients.** *Gastroenterology* 2006, **130**(6):1625-1635.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Molecular biology and evolution* 2011, **28**(10):2731-2739.

TAVANEZ JP, CUNHA C, SILVA MC, DAVID E, MONJARDINO J, CARMO-FONSECA M: **Hepatitis Delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm.** *Rna* 2002, **8**(5):637-646.

TAYLOR JM: **Hepatitis Delta virus.** *Virology* 2006b, **344**(1):71-76.

TAYLOR JM: **Structure and replication of hepatitis Delta virus RNA.** *Current topics in microbiology and immunology* 2006a, **307**:1-23.

TAYLOR S, WAKEM M, DIJKMAN G, ALSARRAJ M, NGUYEN M: **A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines.** *Methods* 2010, **50**(4):S1-5.

TAYLOR SC, MRKUSICH EM: **The State of RT-Quantitative PCR: Firsthand Observations of Implementation of Minimum Information for the Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE).** *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2014, **24**(1):46-52.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic acids research* 1994, **22**(22):4673-4680.

VALONES MA, GUIMARAES RL, BRANDAO LA, DE SOUZA PR, DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO A, CROVELA S: **Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review.** *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 2009, **40**(1):1-11.

VIANA S, PARANA R, MOREIRA RC, COMPRI AP, MACEDO V: **High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2005, **73**(4):808-814.

VOGTHERR M, KIRCHNER R, ZULEEG T, LIMMER S: **Dimerization of double-stranded RNA possessing a 3'-overhanging single-stranded end.** *Journal of biomolecular structure & dynamics* 1999, **17**(2):355-365.

WANG KS, CHOO QL, WEINER AJ, OU JH, NAJARIAN RC, THAYER RM, MULLENBACH GT, DENNISTON KJ, GERIN JL, HOUGHTON M: **Structure, sequence and expression of the hepatitis Delta (Delta) viral genome.** *Nature* 1986, **323**(6088):508-514.

WANG TC, CHAO M: **Molecular cloning and expression of the hepatitis Delta virus genotype IIb genome.** *Biochemical and biophysical research communications* 2003, **303**(1):357-363.

WANG TC, CHAO M: **RNA recombination of hepatitis Delta virus in natural mixed-genotype infection and transfected cultured cells.** *Journal of virology* 2005, **79**(4):2221-2229.

WATANABE H, NAGAYAMA K, ENOMOTO N, CHINZEI R, YAMASHIRO T, IZUMI N, YATSUHASHI H, NAKANO T, ROBERTSON BH, NAKASONE H *ET AL*: **Chronic hepatitis Delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease.** *The Journal of general virology* 2003, **84**(Pt 12):3275-3289

WEDEMEYER H: **Hepatitis d revival.** *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2011, **31 Suppl 1**:140-144.

WU HN, LAI MM: **Reversible cleavage and ligation of hepatitis Delta virus RNA.** *Science* 1989, **243**(4891):652-654.

WU HN, LIN YJ, LIN FP, MAKINO S, CHANG MF, LAI MM: **Human hepatitis Delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, **86**(6):1831-1835.

WU JC, CHIANG TY, SHEEN IJ: **Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis.** *The Journal of general virology* 1998, **79** ( Pt 5):1105-1113.

WU JC, CHOO KB, CHEN CM, CHEN TZ, HUO TI, LEE SD: **Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D.** *Lancet* 1995, **346**(8980):939-941.

XIA YP, YEH CT, OU JH, LAI MM: **Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis Delta antigen: nuclear transport as a protein complex.** *Journal of virology* 1992, **66**(2):914-921.

YAMASHIRO T, NAGAYAMA K, ENOMOTO N, WATANABE H, MIYAGI T, NAKASONE H, SAKUGAWA H, WATANABE M: **Quantitation of the level of hepatitis Delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease.** *The Journal of infectious diseases* 2004, **189**(7):1151-1157.

ZHANG YY, TSEGA E, HANSSON BG: **Phylogenetic analysis of hepatitis D viruses indicating a new genotype I subgroup among African isolates.** *Journal of clinical microbiology* 1996, **34**(12):3023-3030.

















