UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Avaliação dos testes e algoritmos empregados na triagem de
doadores de sangue para o vírus da hepatite C**

Angela Maria Egydio de Carvalho Barreto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Kioko Takei

São Paulo
2004

Angela Maria Egydio de Carvalho Barreto

**Avaliação dos testes e algoritmos empregados na triagem de
doadores de sangue para o vírus da hepatite C**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Kioko Takei
Orientadora/presidente

DR. JOÃO RENATO REBELO PINHO
1º. examinador

PROF. DRA. AURILIDE JÚSE VAZ
2º. examinador

São Paulo, 08 de 12, de 2004

À

*Profa Dra. Kioko Takei, que com
toda sua capacidade e paciência
incentivou-me na busca de
minha carreira científica, hoje,
minha orientadora, sempre
amiga, todo o meu respeito e
gratidão.*

Aos meus pais

Flavio Egidio de Oliveira Carvalho "in memoriam", cujo exemplo de vida e trabalho, trilharam até hoje meu caminho.

Violeta Plaza Egidio, que devido sua doença não pôde me acompanhar nesta jornada, mas seu amor e dedicação anteriores continuam sendo o alento da minha vida.

Ao meu esposo

Cesar Augusto Cortese Barreto

Aos meus filhos

Rodrigo Egydio Barreto

Ana Carolina Egydio Barreto

Tiago Egydio Barreto

Obrigada por toda paciência, carinho, ajuda e incentivo, na realização deste trabalho.

A minha irmã

Sonia Maria Egydio de Carvalho

Ao meu irmão

Newton Egydio de Carvalho

Obrigada pelos cuidados com nossa mãe

Meus agradecimentos:

A Dra. Nanci Alves Salles, chefe da Divisão de Sorologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo pelo seu apoio incondicional, sem o qual este trabalho não seria possível.

A Dra. Leda Bassit, que muito me incentivou e mesmo distante, foi muito presente, com o envio dos principais artigos científicos que muito contribuíram para elaboração deste trabalho.

A Dra. Ester Cerdeira Sabino, chefe do Departamento de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo que disponibilizou seu laboratório e todo o material para esta pesquisa, e muito me apoiou.

Ao Prof. Dr Dalton de Alencar Fisher Chamone, presidente da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, pela permissão de realizar este trabalho na Instituição.

Ao Prof. Dr. Pedro Enrique Dorlhiac-Llacer pela aprovação junto à comissão científica para realização deste trabalho

A Dra. Cláudia Cortese Barreto, pela revisão e correção do português de todo o trabalho.

A Márcia Cortese Barreto pela revisão e correção das Referências Bibliográficas.

Ao meu filho Rodrigo Egydio Barreto, pela realização dos dados estatísticos deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Diagnóstico da Sorologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo pelo trabalho em equipe, pela colaboração e organização do laboratório, requisitos essenciais para que os dados daí coletados sirvam de base para um trabalho científico. A todos vocês o meu muito obrigado, Maria Aparecida de Oliveira Bellesá, Denise de Amorim, Heide Baida, Marcia Zanella Gracia, Fátima Regina Iorillo Garcia, Marina Angela Favrin, Ana Maria Solange do Val Ramos, Maria de Lourdes P dos Santos, Maria Cristina de Sales Amancio da Silva, Andréa Cristiane Campos Silva Santos.

Aos funcionários da Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, pela colaboração e auxílio importantes, principalmente para a Anna Shoko Nishiya e Cláudia Cortese Barreto que muito me ajudaram para realização e compreensão das técnicas moleculares.

A todos os funcionários da do departamento de Sorologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, principalmente da Triagem Sorológica cujo trabalho de alta qualidade me permitiu utilizar os dados para realização deste trabalho, e por todo o apoio em tudo o que precisei.

Aos funcionários Roberta Soares da Silva e Marcos Masaharu Kawakami pela grande ajuda na realização das tabelas e gráficos.

A Sueli da Silva Aquino, secretaria da Divisão de Sorologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, pelo incentivo e prontidão por tudo que precisei.

A Evelize Cobo pela amizade e pelo empenho para me disponibilizar os kits da Roche.

Ao meu sobrinho Newton Egidio de Carvalho Filho, pelo ajuda e profissionalismo no conserto do meu computador em momentos tão impróprios.

A Elza Mitsuko Kurita, Emico Akita Abe, Mércia Y. Nakamura pela força e amizade durante a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ALT	alanina-aminotransferase
Anti-HBc	anticorpo contra o capsídeo do vírus da Hepatite B
Anti-HCV	anticorpo contra o vírus da Hepatite C
bDNA	<i>branched DNA-based signal amplification</i>
cDNA	DNA complementar
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CHC	carcinoma hepatocelular
CO	<i>cut-off</i>
DEPC	dietil pirocarbonato
DMF	dimetil-formamida
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	densidade óptica
DTT	dithiothreitol
E	envelope
ELISA	ensaio imuno enzimático de fase sólida
ELISA-R	ELISA realizado no retorno do doador de sangue
ELISA-T	ELISA realizado na triagem dos doadores de sangue
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gp	glicoproteína
HAV	vírus da hepatite A
HBc	antígeno core da hepatite B
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HCC	hepatocarcinoma celular
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPT	hepatite pós-transfusional
HVR	região hiper variável
IB	<i>immunoblot</i>

IC	intervalo de confiança
IFN	interferon
IND	indeterminado
IgG	imunoglobulina G
IR	índice de reatividade
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ISDR	região de determinação de sensibilidade ao interferon
LIA®	<i>Line Immune Assay</i>
LiPA®	<i>Line Probe Assay</i>
NANBH	hepatite não A não B
NC	não codificadora
nt	nucleotídeos
NEG	negativo
NOB	neutralização de ligação
NS	não estrutural
NTP	nucleotídeo trifosfatado
ORF	fase de leitura aberta
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	proteína
pb	pares de base
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PKR	proteína kinase
POS	positivo
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RFLP	"restriction fragment length polymorphism"
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	transcriptase reversa
RS	resposta sustentada
SOD	superóxido dismutase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMA	Transcrição Mediada por Amplificação

TMB	tetra-metil- benzidina
TNFR	fator de necrose tumoral
μM	micromolar
UTR	região não traduzida
WHO	Organização Mundial da Saúde

RESUMO

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é obtido através de testes de triagem para anti-HCV pelo ELISA e para confirmar os positivos, por teste suplementar mais específico, o *immunoblot* (IB). A infecção ativa é determinada pelas técnicas moleculares como por exemplo a PCR. Os testes sorológicos são métodos indiretos, baseados na detecção de anticorpos específicos, estando portanto, sujeito a vários fatores que limitam a sua eficiência diagnóstica, podendo gerar resultados inespecíficos.

Um dos objetivos deste trabalho foi o de avaliar a eficiência diagnóstica dos testes para o diagnóstico da infecção pelo HCV, em condições de rotina diagnóstica, em um grande número de amostras de doadores de sangue e analisar o custo benefício de três diferentes algoritmos, recentemente propostos pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (EUA).

Foram estudadas 692 amostras de soros provenientes de doadores de sangue, sendo 522 positivas e 170 inconclusivas pelo ELISA de triagem (ELISA-T) realizado no momento da doação. Esses doadores retornaram à Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo para a coleta da segunda amostra de sangue para confirmação dos resultados obtidos na doação. Em todas as amostras de retorno foram realizadas ELISA (ELISA-R) e a PCR, o IB somente nas positivas ou indeterminadas no ELISA-R.

A concordância global de resultados entre ELISA-T e ELISA-R foi de 64,5%, sendo 77,6% (405/522) entre os positivos e 24,1% (41/170) entre os inconclusivos. Em amostras positivas nos dois ELISAs, o IB foi positivo (aqui denominadas de sorologicamente positivas) em 69,6% (282/405) e PCR em 61,2% (248/405). Entre as 282 amostras sorologicamente positivas, viremia foi detectada em 87,6% (247/282). A ausência de viremia em 12,4% (37/282) dessas amostras pode representar amostras de indivíduos que tiveram a infecção no passado e que eliminaram espontaneamente o HCV.

A avaliação de bandas individuais no IB mostrou a alta frequência das bandas do core (C1C2 e C3C4). Entretanto sua distribuição entre as amostras de doadores virêmicos e não virêmicos foi bastante semelhante.

A intensidade da reação, expressa como graduação da coloração das bandas no IB, demonstrou que C1C2 e NS3 fortemente reativas eram as mais associadas à positividade no IB e na PCR e a banda NS4 somente com a PCR.

A análise dos resultados do teste de ELISA anti-HCV de doadores de sangue indicou que a relação DO/CO, aqui denominada de índice de reatividade (IR), poderia ser utilizada como preditivo de positividade no teste suplementar. O IR de todas as amostras foram estratificados em 6 grupos sendo o $IR \geq 6$ o que melhor correlacionou-se com a positividade no IB (IR de corte).

Os três algoritmos para o diagnóstico da infecção pelo HCV, propostos pelo CDC foram avaliados, sendo dois novos (**a** e **b**) e o outro, o algoritmo convencional (**c**). **a**) Resultados de ELISA com $IR \geq 6,0$ é considerado positivo sem a necessidade de teste suplementar. Para amostras $IR < 6,0$, de preferência o IB, seria realizado; **b**) Teste molecular (**NAT**) deve ser feito para todas as amostras positivas no teste de triagem, seguido de IB naquelas negativas no NAT; **c**) **IB** realizado para todas as amostras positivas na triagem.

Esses algoritmos foram aplicados em todas as amostras, com resultados muito semelhantes entre si: 287, 287 e 285 positivos, respectivamente para **a**, **b** e **c**. Um total de 283 amostras foi positivo nos três algoritmos e quatro, com resultados divergentes, foram analisadas separadamente. A análise do custo benefício mostrou que o algoritmo **a** é o mais econômico e prático podendo ser recomendado para os laboratórios com condições econômicas limitadas; o **b** é o mais completo para fins de decisão médica, fornecendo informações precoces sobre a presença ou a ausência da viremia; o **c** é importante para determinar o *status* imunológico e para a população de baixa prevalência da infecção pelo HCV.

O custo estimado dos três algoritmos baseou-se na tabela de 2004 da Associação Médica Brasileira. Esses custos mostraram ser o algoritmo **a**, 40% mais econômico e o **b**, 18,2% mais oneroso do que o **c**. Os algoritmos **a** e **c** foram complementados pela realização da PCR, nas amostras indeterminadas provenientes desses algoritmos. Duas amostras resultaram em PCR positivas, as mesmas já consideradas positivas inicialmente pelo algoritmo **b**. Os três algoritmos estudados, puderam ser validados para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCV, podendo a escolha depender do interesse clínico ou da prevalência dessa infecção na população.

ABSTRACT

Evaluation of anti-HCV and HCV RNA tests and analysis of algorithm for blood donors screening

The diagnosis of hepatitis C (HCV) infection is usually undertaken stepwise by screening with ELISA and confirming the positive results in screening with a more specific assay, the *immunoblot* (IB). Active infection by hepatitis C virus should be confirmed by molecular techniques such as PCR. Serological tests are indirect methods based on specific antibody detection. Therefore, they may be influenced by many factors which limit their diagnostic efficiency, producing false-positive results.

The aim of this work was to evaluate the real diagnostic efficiency of anti-HCV screening tests, in routine condition, in a large serum sampling, and to analyze the cost-benefit of three different algorithms recently proposed by the Center for Diseases Control and Prevention.

692 serum samples were studied. The samples consisted of 522 sera from blood donors, positive in ELISA, with the sample collected by the time of donation (ELISA-T), and of 170 inconclusive sera. Those donors returned to Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo to have a second sample of blood collected to confirm the former results. ELISA-R and PCR were carried out in all second samples and all the positive and inconclusive samples were submitted to IB.

The global concordance of results between ELISA-T and ELISA-R was 64,5%, in that 77,6%(405/522) were obtained among the positives results and 24,1% (41/170) among inconclusive. For samples positive in both ELISAs, IB was positive (serologically positive) in 69,6% (282/405) and PCR in 61,2% (248/405). Among 282 serologically positive samples, viremia was detected in 87,6% (247/282) and it was absent in 12,4% (37/282) of the sera, which could represent samples from individuals who were infected by HCV in the past and who have spontaneously cleared the virus.

Evaluation of each antigenic band of IB showed high frequency of core (C1C2 and C3C4). Their distribution among viremic and non-viremic donors was similar. The reaction intensity, expressed by the color score of the bands, demonstrated that the strongly reactive bands of C1C2 and NS3 were associated with positiveness in IB and PCR and of NS4 only with PCR positive.

Analysis of anti-HCV ELISA results from blood donors indicated that the signal-to-cut-off ratio (DO/CO), named as reactive index (IR) in this study, could be

used to predict supplemental test positive results for anti-HCV. IR from all samples was classified in 6 groups, being $IR \geq 6$, the index better correlated with positive on IB (cut-off IR).

The CDC has recently proposed three algorithms for HCV diagnosis, in which two were new (**a** and **b**) and one was a conventional algorithm (**c**). **a**) screening-test-positive samples with $IR \geq 6,0$ can be reported as anti-HCV positive without supplemental testing. $IR < 6,0$ should have reflex supplemental testing performed, preferably IB; **b**) reflex supplemental testing in all specimens screening-test-positive by performing NAT followed by IB for specimens with NAT negative results; **c**) reflex supplemental testing (IB) in all specimens screening-test-positive. These algorithms were applied to all samples and resulted in very similar positive results: 287, 287 and 285, respectively for **a**, **b** and **c**. A total of 283 samples were positive in three algorithms. Four samples showed divergent results and were analyzed separately.

Cost-benefit — The algorithm **a** is the most economical and practical and it could be recommended for laboratory with limited conditions and for population with a high prevalence of HCV infection; **b** is the most complete for medical decision providing early information about the presence or absence of viremia; **c** is suitable for determining immune status and for HCV infection low prevalence population. The cost of the three algorithms was estimated based on the 2004 Brazilian Medical Association Table. These costs were 40% lower than **c** for algorithm **a**, and 18,2% higher for **b**.

The algorithm **a** and **c** were complemented by performing PCR to solve indeterminate results. This complementary test detected two samples PCR positive which were already positive by algorithm **b**. Therefore we could validate those algorithms for HCV infection laboratory diagnosis. Laboratories and blood banks may choose the algorithm depending on the clinical interest or on the prevalence of HCV infection in the population.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Histórico	2
1.2 Transmissão do HCV	3
1.3 Epidemiologia do HCV	4
1.4 História natural da infecção pelo HCV	6
1.5 Aspectos clínicos	7
1.5.1 Infecção aguda	7
1.5.2 Infecção crônica	8
1.5.3 Manifestações extra-hepáticas	9
1.6 Patogênese	10
1.7 Características e constituição genômica	10
1.7.1 Ciclo de vida do HCV	11
1.7.2 Aspectos virológicos	12
1.7.3 Organização genômica do HCV	12
1.7.4 Proteínas do HCV	15
1.7.4.1 Proteínas estruturais	15
1.7.4.2 Proteínas não estruturais	17
1.8 Heterogeneidade genômica	20
1.8.1 Genótipos	21
1.9 Aspectos imunológicos	22
1.10 Diagnóstico Laboratorial	23
1.10.1 Diagnóstico sorológico	23
1.10.1.1 Testes de triagem	24
1.10.1.2 Testes suplementares	26
1.10.2 Diagnóstico molecular	27
1.10.2.1 Diagnóstico molecular qualitativo	28
1.10.2.2 Diagnóstico molecular quantitativo	30
1.11 Genotipagem do HCV	31
1.12 Detecção do Ag do core do HCV pela técnica de ELISA	31
1.13 Algoritmos	32
1.14 Tratamento	33
1.15 Perspectivas de vacina	34

2. Objetivos	37
3. Material e métodos	39
3.1 Casuística	40
3.1.1 Coleta e armazenamento da amostra	40
3.1.2 Comitê de ética	41
3.2 Métodos	41
3.2.1 Testes sorológicos utilizados para anti-HCV	41
3.2.1.1 ELISA	41
3.2.1.2 Teste suplementar de <i>immunoblot</i> para anti-HCV	42
3.2.2 Testes moleculares	44
3.2.2.1 Reação em cadeia da polimerase	44
3.3 Análise do desempenho diagnóstico dos testes para anti-HCV	49
3.4 Estudos dos algoritmos no diagnóstico laboratorial da pelo HCV	49
3.4.1 Índice de reatividade	49
3.4.2 Algoritmos propostos pelo CDC	50
3.4.3 Análise do custo estimado dos três algoritmos	50
3.5 Análise estatística	51
4. Resultados	52
4.1 Reprodutibilidade dos resultados dos ELISAs	54
4.1.1 Análise das amostras com resultados positivos/inconclusivos	54
4.1.2 Valor preditivo de resultados do ELISA-T e ELISA-r	55
4.1.3 Análise dos resultados positivos no ELISA-T	55
4.1.4 Análise dos resultados inconclusivos no ELISA-T	56
4.2 Associação das diferentes bandas reativas no IB do HCV	56
4.2.1 Frequência das bandas no grupo de amostragem	56
4.2.2 Intensidade de cor e a positividade ao IB e PCR	57
4.3 Avaliação dos resultados do IB anti HCV	58
4.4 Associação entre o índice de reatividade do ELISA, IB e PCR	59
4.5 Aplicação, análise e custo estimado dos três algoritmos	59
4.6 Custo-benefício dos três algoritmos	62
5. Discussão	65

6. Conclusões	79
7. Referências bibliográficas	82
8. Anexos	108

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - HISTÓRICO

Após a descoberta do vírus da hepatite B (HBV), em 1965 (BLUMBERG *et al.*, 1965) e a introdução do teste sorológico para a detecção do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em doadores de sangue, as hepatites pós transfusionais (HPT) diminuíram drasticamente. Entretanto, novos casos de hepatites eram relatados entre os receptores de sangue, não havendo associação dos mesmos com o vírus da hepatite A (HAV) ou com o HBV. Tais quadros clínicos ficaram conhecidos com a denominação de hepatite não A não B (HNANB).

A existência de um agente viral associado a HNANB foi reconhecida, experimentalmente, por ALTER¹ *et al.*, (1978) que inoculando chimpanzés com plasma ou soro de pacientes com HPT NANB verificou que os mesmos reproduziam alterações bioquímicas e histológicas compatíveis com a HNANB.

No ano de 1989, CHOO *et al.* e KUO *et al.*, pesquisadores da empresa Chiron Corporation (EUA), em colaboração com o Centro de Controle Doenças e Prevenção (CDC, EUA), obtiveram uma proteína através da fusão do ácido nucleico extraído do plasma de um chimpanzé que foi infectado com um plasma de um paciente com HPT. Esta foi utilizada para a produção de um banco genômico de DNA complementar (cDNA).

Uma análise da sequência específica do genoma do vírus da HNANB identificou o clone 5-1-1, obtido da região não estrutural 4 (NS4), iniciando-se assim, uma série de eventos que levaram ao conhecimento completo de todo o genoma deste vírus, que passou a ser denominado de vírus da hepatite C (HCV).

A partir da fusão deste clone específico, com proteínas obtidas de regiões contíguas a ele, como, por exemplo, a fração da região não estrutural 3 (NS3), dando origem à proteína c100-3, tornou-se possível à padronização de testes sorológicos (ALTER¹, 1992). Estes avanços contribuíram para estabelecer o diagnóstico, epidemiologia, a história natural da infecção, o estudo dos candidatos às vacinas, o tratamento e monitoramento da hepatite C.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular mostrou um notável avanço e foi o mais importante, se não, o único meio de estudo

deste vírus que, sem um sistema de cultura adequado, faz desta metodologia a principal ferramenta para quase todas as etapas de estudo.

Muitas pesquisas têm sido realizadas depois da descoberta do HCV e hoje está claro que uma elevada proporção de indivíduos infectados evolui para um quadro clínico crônico com alta morbidade e mortalidade, representando um grande desafio à saúde pública mundial.

1.2 – TRANSMISSÃO DO HCV

A transmissão do HCV pode ocorrer por várias vias, sendo a principal, a parenteral.

A transmissão através de transfusão de sangue e derivados e pelo transplante de órgãos teve uma diminuição acentuada após a introdução dos testes anti-HCV mais sensíveis, em meados de 1992. O risco de se contrair esta hepatite decaiu de 1: 5.000 para 1:103.000 (VOGT *et al.*, 1999). A transmissão do HCV para receptores de concentrado de plaquetas tem sido, também, relatada (SCHÜTTLER *et al.*, 2000).

Espera-se que seja observada uma redução marcante desta doença no Brasil, quando a técnica de detecção de ácidos nucleicos (NAT) for introduzida nos bancos de sangue, visando determinar a presença do HCV nas amostras negativas na triagem sorológica (BRASIL, portaria nº112/GM de 29/01/2004, do Ministério da Saúde, 2004).

A janela sorológica de aproximadamente 70 dias ficaria reduzida para 15 a 20 dias pela técnica do NAT (MULLER-BREITKREUTZ *et al.*, 1999). Uma pesquisa realizada nos EUA determinou um risco de transmissão do HCV por transfusão sangüínea de 1:263.000 quando o NAT foi realizado em *pool* de soros de doadores negativos para anti-HCV (STRAMER *et al.*, 2000).

Outro estudo, conduzido no Japão, mostrou que o NAT deveria ser realizado em amostras individuais, já que a transmissão da infecção pode ser induzida em chimpanzé, com quantidades mínimas do inóculo, de aproximadamente 20 cópias de RNA do HCV (KATAYAMA *et al.*, 2004).

Outros fatores como o *status* imunológico do receptor, o volume do inóculo e a concentração de partículas do HCV podem influenciar na infectividade das transfusões (NÜBLING *et al.*, 2002).

Os anticorpos anti-HCV foram detectados nos soros de 85% dos pacientes com hepatite pós-transfusional (HPT), em 60 a 80% dos hemofílicos que receberam derivados do sangue e em 50 a 70% dos viciados em drogas ilícitas endovenosas (ZUCKERMAN, 1989). A transmissão do HCV foi ainda observada em usuários de outras drogas, como a cocaína intranasal e maconha, em todos os grupos étnicos raciais estudados por ALTER² *et al.*, em 1999 e notou-se um aumento na prevalência da infecção paralelamente ao aumento do número de vezes que a droga foi utilizada.

A transmissão sexual sem proteção parece não ser muito eficiente, mesmo em população de alta prosmicuidade, como prostitutas e homossexuais, mas é facilitada, na co-infecção com o HIV, mesmo em indivíduos sem fatores de risco (WRIGHT *et al.*, 1994).

A transmissão vertical, também é de baixo risco (<6%), a não ser quando a mãe está infectada pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), principalmente naquelas com altos níveis de viremia (WRIGHT *et al.*, 1994). O HCV não tem sido encontrado no leite materno (MANZINI *et al.*, 1995).

Acidentes com materiais perfuro-cortantes, em profissionais da saúde, têm sido relatados com taxa de transmissão de 0,7% (CDC, 1998) assim como de transmissão nosocomial durante procedimentos de diálise, colonoscopia, endoscopias e cirurgias (GUNSON *et al.*, 2003).

Existe uma parcela importante da população, cuja via de transmissão não foi possível ser confirmada. Entretanto, algumas vias possíveis podem ser sugeridas como o compartilhamento de objetos pessoais e a transmissão pela saliva, pois o HCV já foi isolado deste material (CDC, 1998).

1.3 – EPIDEMIOLOGIA DO HCV

As hepatites virais são conhecidas desde há muito tempo. Estima-se que a prevalência mundial esteja em torno de 3 a 5%, sendo que, aproximadamente, 400 milhões de pessoas estão infectadas com o HBV e, 170 milhões, com o HCV (SZABÓ *et al.*, 2003).

Na população dos EUA foram observadas uma prevalência de 1,8% de indivíduos com reatividade para os anticorpos contra o HCV, por ELISA de segunda

geração, equivalente a, aproximadamente, quatro milhões de pessoas, sendo 74% virêmicos (ALTER² *et al.*, 1999).

Estudos epidemiológicos com doadores de sangue e pacientes com hepatite C revelaram que 75 a 85 % dos indivíduos infectados não resolvem a infecção tornando-se crônicos (ALTER¹ *et al.*, 1997; ALTER¹ *et al.*, 1998).

Segundo estimativa do Ministério da Saúde, entre um e dois milhões de brasileiros estão cronicamente infectados pelo HCV e apenas 5.000 deles estão sob tratamento (BRASIL, portaria n.1407/GM de 01/08/2002).

Apesar da dificuldade de se estimar a prevalência da infecção pelo HCV, no Brasil observou-se um grande declínio da mesma, a partir de 1989, quando alguns serviços de banco de sangue passaram a utilizar marcadores indiretos, entre os quais, dosagem da alanina aminotransferase (ALT) e a pesquisa de anticorpos contra o antígeno do core do vírus da hepatite B (anti-HBc). Este procedimento diminuiu as HPT em aproximadamente 50% (ALQUÉZAR, 1995; ALTER¹ *et al.*, 1989a). A partir de 1993, ambos os testes passaram a ser de realização obrigatória para a triagem de doadores de sangue, conforme as normas técnicas do Ministério da Saúde (BRASIL, portaria 1376 de 19/11/1993, Ministério da Saúde).

No Brasil, a soroprevalência do HCV é variada entre doadores de sangue, de acordo com as regiões investigadas. Em São Paulo, na Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP), em um estudo realizado em 2001, a prevalência sorológica estimada, após realização do teste suplementar, foi de 0,21% e a taxa de descarte sorológico anual de 0,7% (SALLES *et al.*, 2003). Na população geral de São Paulo, FOCCACIA *et al.*, (1998) encontraram uma prevalência de anti-HCV de 1,4%, sendo a distribuição similar entre homens e mulheres.

Os genótipos do HCV apresentam diferenças regionais na sua distribuição e a prevalência varia de uma área geográfica para outra. Essa distribuição geográfica e a diversidade dos genótipos podem indicar a origem histórica do HCV. A presença de numerosos subtipos de cada genótipo do HCV nas várias regiões do mundo, como ocorre na África e no sudeste da Ásia, sugere que o HCV tenha sido endêmico por um longo tempo naquelas regiões (ZEIN, 2000).

MARTINS *et al.* (1998) em um estudo no Brasil, entre doadores de sangue das diferentes regiões, observou uma maior frequência dos genótipos 1b e 3a na região nordeste, 1a e 3a na região oeste, 1b e 1a no sudeste.

Um estudo mais recente no Brasil das várias regiões sobre a distribuição dos genótipos, realizado entre pacientes com hepatite C crônica, encontrou uma frequência de 64,9% para o genótipo 1, 4,6% para o genótipo 2, 30,2% para o genótipo 3, 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5. O genótipo 1 foi o mais freqüente em todas as regiões, sendo maior na região Norte e menor na região Sul do país. Observou-se uma maior prevalência do genótipo 2 na região Centro Oeste e do genótipo 3 na região Sul (Campiotto *et al.*, 2005).

Segundo BASSIT *et al.* (1999) a distribuição de genótipos do HCV em infectados na cidade de São Paulo, foi de 1b (38%), 3a (32%) e 1a (18%) entre os doadores de sangue e de 1b (34%), 3a (31%) e 1a (21%) entre pacientes com hepatite C crônica.

Os genótipos 1a e 1b são os mais freqüentes nos EUA e também na Europa (ZEIN, 2000). No Japão, o genótipo 1b é o responsável por, pelo menos, 73% dos casos de infecção pelo HCV (TAKADA *et al.*, 1993). Os genótipos 2a e 2b são os mais comumente encontrados na América do Norte, Europa e Japão, e o genótipo 2c no norte da Itália. O genótipo 3a é particularmente prevalente em usuários de drogas endovenosas, na Europa e nos EUA (PAWLOTSKY *et al.*, 1995a). O genótipo 4 é o mais prevalente na região norte e centro-oeste da África (ABDULKARIM *et al.*, 1998; CHAMBERLAIN *et al.*, 1997) e genótipos 5 e 6 estão confinados ao sul da África e Hong Kong, respectivamente (CHA *et al.*, 1992; SIMMONDS *et al.*, 1993). Os genótipos 7, 8 e 9 foram identificados somente em pacientes vietnamitas (TOKITA *et al.*, 1994) e os genótipos 10 e 11 em pacientes da Indonésia (TOKITA *et al.*, 1996).

1.4 - HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HCV

Desde o descobrimento dos agentes virais que causavam infecção conhecida como hepatite tipo A e hepatite tipo B, a hepatite causada por um outro agente viral, a não-A, não-B (HNANB) foi reconhecida por exclusão (DIENSTAG, 1983).

A falta de um animal suscetível de pequeno porte e de um sistema robusto de cultura celular para propagação do agente causal das hepatites virais HNANB, não permitiu conhecer o ciclo de replicação do vírus, que foi deduzido de outras flaviviroses (CERNY *et al.*, 1999; HOOFNAGLE, 2002) e também dificultou o entendimento desta infecção. Após o reconhecimento desse agente como hepatite

tipo C, a sua associação com cirrose e HCC foi também confirmada por vários estudos (ALTER¹ *et al.*, 2000; KIYOSAWA *et al.*, 1990; COLOMBO *et al.*, 1989).

O determinante mais importante para a infecção tornar-se crônica parece ser devido ao aparecimento da *quasispécies*, que se trata de uma população complexa que consegue evadir do ataque imune resultando na persistência do vírus. Este processo é natural do HCV assim como de outros RNA vírus (ALTER¹ *et al.*, 2000). Além disso, verificou-se que nos soros humanos havia anticorpos neutralizantes para HCV, mas que eles eram altamente cepa específicos e não protegiam contra as outras variantes virais (FARCI *et al.*, 1992). FARCI *et al.*, (2000a) demonstraram que a extensão da diversidade viral pode prever se a infecção vai ser resolvida ou tornar-se crônica, medindo o número de variantes na cepa (complexidade) e o número e a extensão das substituições diferentes do ácido nucléico (diversidade) que ocorrem durante as primeiras dezesseis semanas.

Aproximadamente 15 a 20% dos indivíduos infectados pelo HCV têm recuperação espontânea, geralmente dentro do primeiro ano da infecção. Esta taxa de recuperação foi baseada na ausência do RNA do HCV em amostras sequenciais e normalização dos níveis de ALT (ALTER¹, 1989b; ALTER¹ *et al.*, 2000; CONRY-CANTILENA *et al.*, 1996).

A história natural da infecção pelo HCV é influenciada quando o paciente é co-infectado pelo HIV, onde níveis elevados de replicação do HCV são observados logo após a soroconversão do HIV o que resulta na aceleração da progressão da doença hepática (PUOTI, 2003).

1.5 - ASPECTOS CLÍNICOS

1.5.1 - Infecção aguda

Depois da exposição do indivíduo ao vírus, o RNA do HCV pode ser detectado no sangue, pelas técnicas moleculares, em aproximadamente 15 dias após início da infecção (FARCI *et al.*, 1991; THIMME *et al.*, 2001). Os níveis de viremia elevam-se rapidamente, nas primeiras semanas e depois de forma gradual, até alcançarem níveis plasmáticos em torno de 10^5 a 10^7 UI/mL, antes mesmo do pico de elevação da ALT no soro e do início dos sintomas.

A dosagem da ALT apresenta alteração após 2 a 3 semanas de exposição ao

vírus, alcançando níveis maiores que 10 vezes o limite normal superior (HOOFNAGLE, 2002).

Cerca de um terço dos adultos desenvolvem sintomas clínicos e icterícia, em torno de 3 a 12 semanas de infecção (ALTER¹ *et al.*, 1995a, THIMME *et al.*, 2001). A infecção aguda é autolimitada, os sintomas permanecem por várias semanas e desaparecem com a diminuição dos níveis de ALT.

Nesta fase, somente 50% a 70% dos pacientes são detectados por meio de anticorpos contra o HCV pelas técnicas imunoenzimáticas (ELISA) chegando a 90% em 3 meses. Portanto, durante a chamada janela sorológica ou período pré-soroconversão, um resultado sorológico negativo não exclui a possibilidade de infecção pelo HCV (HOOFNAGLE, 2002).

A infecção aguda pode ser severa, mas, raramente, é fulminante. Apesar da maioria dos infectados serem assintomáticos, as manifestações clínicas mais comuns são: fadiga, anorexia e icterícia (NIH, 2002).

1.5.2 - Infecção crônica

A infecção crônica pelo HCV normalmente é assintomática, apresentando-se, na maioria das vezes, como forma clínica moderada e silenciosa dificultando o controle e facilitando a disseminação do vírus na comunidade. Quando sintomática, pode ocorrer fadiga, com prostração extrema que é tipicamente intermitente (HOOFNAGLE, 1997), a qualquer hora do dia, sendo mais comum pela manhã, além de náuseas, inapetência e dor na região do fígado (HOOFNAGLE, 2002).

Situações pertinentes ao hospedeiro, tais como o tempo de infecção, o sexo, idade, o estado de imunossupressão também contribuem para elevar ou diminuir o risco de evolução para piora clínica. Assim, têm uma maior probabilidade de evoluírem formas mais graves da doença indivíduos do sexo masculino e/ou co-infectados pelo HIV ou HBV, assim como a ingestão de álcool na quantidade de 30 g/dia para homens e 20 g/dia para mulheres (NIH, 2002; ALTER¹ *et al.*, 2000).

Dos indivíduos que evoluem para as formas crônicas, cerca de 20 a 30% desenvolvem quadro de cirrose hepática, após um período de 20 anos de contágio e, em cerca de 2 a 5% ao ano, é verificada a presença do carcinoma hepatocelular (HCC) (DEV *et al.*, 2002). Nos EUA a infecção por HCV é responsável por 30% dos transplantes de fígado (PESSOA *et al.*, 1998).

Durante a evolução da fase aguda para a crônica, os níveis de ALT e do RNA do HCV são marcadamente flutuantes (ALTER² *et al.*, 1992; LARGHI *et al.*, 2002) e, em alguns pacientes, ocorrem períodos durante os quais o RNA do HCV é indetectável e a dosagem da ALT apresenta-se normal (HOOFNAGLE, 2002). Este padrão indica que uma única amostra negativa para RNA do HCV com valor normal de ALT na fase de convalescença não significa a resolução da infecção, necessitando para tanto, um período de acompanhamento de 6 a 12 meses (HOOFNAGLE, 2002).

A persistência do RNA do HCV por mais de seis meses após a infecção caracteriza a infecção crônica (SEEFF, 1998). Nesta fase o RNA viral atinge altos níveis plasmáticos (NIH, 2002).

Nos indivíduos que resolvem a infecção, a sorologia positiva é o único marcador detectável e permanece reagente mesmo na ausência da viremia.

1.5.3 - Manifestações extra-hepáticas

Na infecção pelo HCV, os imunocomplexos têm sido demonstrados em diferentes estruturas vasculares. Estes depósitos podem resultar da interação de frações antigênicas do vírus com os seus anticorpos específicos na circulação, ou ainda, serem decorrentes de um possível envolvimento do mecanismo auto-imune, que propiciaria a formação dos auto-anticorpos (AGNELLO, 1998).

A infecção pelo HCV pode estar associada a manifestações ou síndromes extra-hepáticas de origem imunológica tais como, as reumáticas, a cerato-conjuntivite, o líquen plano, a glomerulonefrite membrano-proliferativa, os linfomas e crioglobulinemia mista essencial (NIH, 2002).

As crioglobulinemias têm sido detectadas no soro de 19 a 57% dos pacientes com hepatite C crônica, aumentando com a severidade histológica do fígado e avanço da doença (LIAKINA *et al.*, 2002).

Outros distúrbios, como a depressão, têm sido associados à infecção pelo HCV em 20 a 30 % dos casos (NIH, 2002).

1.6 - PATOGÊNESE

Nos indivíduos infectados pelo HCV, a viremia persistente está acompanhada de vários graus de inflamação hepática e fibrose. Estudos recentes estimam que mais de 50% dos hepatócitos estejam infectados com o vírus (AGNELLO *et al.*, 1998).

A presença de linfócitos dentro do parênquima hepático tem sido interpretada como evidência de dano imune mediado, como no caso da infecção pelo HBV (CHISARI, 1992). Contudo, recentes estudos da infecção aguda, em chimpanzés e em humanos, têm sugerido que o controle imune mediado da replicação viral pode ser possível. O clareamento do vírus, na infecção transitória, foi associado com o desenvolvimento e persistência de resposta vírus-específica por linfócitos T-citotóxico (COOPER *et al.*, 1999; TAKAKI, *et al.*, 2000) e células T-auxiliar (Th) (LECHNER *et al.*, 2000). A fraca resposta do linfócito T-citotóxico em pessoas com infecção crônica pelo HCV parece ser insuficiente para conter a viremia e a evolução genética do vírus, mas suficiente para causar dano colateral através da produção de citocinas inflamatórias no fígado. (KOZIEL *et al.*, 1995; NAPOLI *et al.*, 1996).

A resposta de células Th parece ser crítica, pois, a perda destas células tem sido associada com a re-emergência da viremia (GERLACH *et al.*, 1999). Nas pessoas que resolveram a infecção foi observada uma menor diversidade genética o que provavelmente teria propiciado uma resposta imune mais eficiente (FARCI *et al.*, 2000b).

1.7 – CARACTERÍSTICAS E CONSTITUIÇÃO GENÔMICA

O HCV é um membro da família *Flaviviridae* (RICE, 1996). Dentro desta família, os vírus estão associados a zoonoses e doenças que acometem humanos e são classificados em, pelo menos, três diferentes gêneros: *Pestivirus* (vírus da diarreia bovina e da febre suína), *Flavivirus* (vírus da dengue e da febre amarela) que são, os que se relacionam com as mais importantes doenças transmitidas por artrópodes e atualmente, o gênero *Hepacivirus* cujo único membro é o HCV (BUKH *et al.*, 1997; LINNEN *et al.*, 1996; SIMONS *et al.*, 1995).

O vírus da Hepatite (HCV) é constituído por um RNA de fita simples, positivo, cujo *virion* apresenta-se em formato esférico de 55 a 65nm de diâmetro e envoltório lipídico de aproximadamente 7nm de espessura. A estrutura do nucleocapsídeo

(core), observada através de microscopia imunoeletrônica, mostrou-se, também, sob a forma de partícula esférica com um diâmetro de 33 a 40 nm, com aspecto de um hexaedro (ISHIDA *et al.*, 2001).

1.7.1 - Ciclo de vida do HCV

Devido à incapacidade de crescimento em cultura celular, as etapas iniciais do ciclo de vida, tais como os receptores virais, entrada na célula e liberação do material genético no citoplasma da célula hospedeira, não foram ainda totalmente caracterizados. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) e o CD81 têm sido propostos como potenciais receptores para o HCV (LOCARNINI *et al.*, 2002). A replicação viral hipotética está representada na **figura 1**.

FIGURA 1 - Ciclo de vida hipotético do HCV (Adaptado de LOCARNINI, 2002)

O vírus penetra na célula e o seu material genético é liberado no citoplasma. A molécula de RNA *sense* positiva é inicialmente traduzida para proteínas estruturais e não estruturais. Após a tradução da poliproteína processada, ocorre a replicação viral, seguida de montagem da partícula, empacotamento e saída do vírus da célula infectada.

1.7.2 - Aspectos virológicos

Embora tenha sido sugerido que o sítio de replicação extra-hepático do HCV sejam as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), presume-se que o HCV seja produzido principalmente no fígado (LERAT *et al.*, 1996).

Por analogia com outros membros da família *Flaviviridae* (CHAMBERS *et al.*, 1990), supõe-se que a replicação ocorra no citoplasma dos hepatócitos ou das células mononucleares, via síntese da cadeia negativa do RNA do HCV usada como molde para a síntese de novas cadeias positivas de RNA. As cadeias *sense* são utilizadas como RNA mensageiros (RNAm) sintetizando proteínas virais, ou como RNA genômicos que irão originar novas partículas infectantes do HCV. A síntese de ambas as cadeias de RNA, positiva e negativa é, presumidamente, realizada pela RNA *sense* polimerase dependente de RNA, codificada pelo gene 5B não estrutural do genoma do HCV. Acredita-se que as outras proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4 e NS5A) desempenhem um importante papel na replicação do HCV, assim como representem um alvo potencial para terapia antiviral (MAJOR *et al.*, 1997; PAWLLOTSKY *et al.* 1998).

A persistência da infecção parece depender da rápida replicação viral e sua propagação célula a célula, devida à falta de uma resposta imune adequada aos antígenos do HCV. A taxa de produção viral na hepatite C é em média de 10^{10} a 10^{12} *virions*/dia. Há também um rápido *turn-over* do vírus, no plasma, predizendo uma meia vida de 2 a 3 horas (NEUMANN *et al.*, 1998; NEUMANN *et al.*, 2000).

Como os *Flavivirus* e *Pestivirus*, o RNA genômico do HCV não se replica por meios de um DNA intermediário, portanto, a cronicidade da infecção não pode ser explicada supondo-se uma latência através da integração do genoma viral com o do hospedeiro.

1.7.3 – Organização genômica do HCV

O genoma do HCV é constituído por uma fita simples de RNA, com polaridade positiva, contendo; aproximadamente, 9.500 nucleotídeos.

A região codificante do genoma viral compõe-se de uma fase de leitura aberta (ORF) que é traduzida em uma poliproteína precursora de, aproximadamente, 3.000 aminoácidos (aa) (CHOO *et al.*, 1989; KATO, 1990; CHOO *et al.*, 1991;

TAKAMIZAWA *et al.*, 1991), sendo também utilizada como molde para replicação do RNA viral. A partir do segmento N-terminal da poliproteína são processadas as proteínas estruturais do nucleocapsídeo, as proteínas do envelope viral (E1 e E2) e a p7.

As proteínas não estruturais (NS) são processadas a partir da porção C-terminal e são chamadas de NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A (proteases) e NS5B (RNA polimerase dependente de RNA) (MILLER *et al.* 1990; CHOO *et al.* 1991; HIJIKATA *et al.* 1991; HOUGHTON *et al.* 1991; GRAKOUÏ *et al.*, 1993). O genoma viral está representado na **figura 2**.

FIGURA 2 – Representação esquemática do genoma do HCV com as regiões não traduzidas (UTR), estruturais e não estruturais (NS) e as proteínas utilizadas como antígenos nos testes sorológicos (Adaptado de KLETER, 1995).

1.7.4 - Proteínas do HCV

Há duas regiões não traduzidas (UTR) na porção 5' e 3' terminal do genoma viral, que são importantes para o controle da tradução e da transcrição do seu RNA. A 5'UTR é constituído de 340 nucleotídeos e é altamente conservada entre as diferentes cepas do HCV e portanto a região de escolha para produção dos *primers* utilizados na técnica de PCR (VAN DOORN *et al.*, 1994). Codifica também um sítio de entrada ribossomal interno (IRES) responsável pelo início da tradução. A 3'UTR contém uma cauda de ribonucleotídeos *poli U* seguida de uma região de 98-100 nucleotídeos e parece ter uma ação importante no início da síntese, na estabilidade e no empacotamento do RNA (LOCARNINI, 2002).

1.7.4.1 - Proteínas estruturais

Core

A proteína do core (p21) é multifuncional, com potencial oncogênico, tem um papel importante na patologia do HCV (SUZUKI *et al.*, 1999) e está localizado na extremidade N-terminal da poliproteína do vírus. Esta é clivada por meio de peptidases do hospedeiro e a sua sequência de aminoácidos apresenta-se conservada o que a torna facilmente reconhecida pelos linfócitos B, caracterizando a sua alta imunogenicidade. Os epítomos conservados são utilizados na obtenção de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos para detecção de anti-HCV em soros de pacientes infectados. Nos testes sorológicos, tanto de triagem como suplementares, a proteína recombinante c-22-3r constitui o antígeno de segunda geração. Nos de terceira geração, essa proteína foi substituída por c22p, um peptídeo sintético que contém 4 epítomos (PAWLOTSKY *et al.*, 1995b).

BAIN *et al.* (2004), , descreveram a síntese, *in vitro*, de uma proteína proveniente da região do core que permite uma forma alternativa de leitura aberta e foi chamada de proteína F ou ARFP (alternative reading frame protein). Este trabalho demonstrou a presença de resposta imune mediada por células T dirigida para este novo antígeno. A proteína F induz a formação de anticorpos específicos em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV e estes anticorpos parecem não ser

afetados pela heterogeneidade na sua seqüência (KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2004).

E1 e E2

O genoma do HCV codifica duas glicoproteínas do envelope, E1 (gp31) e E2 (gp70) que são, provavelmente, as responsáveis pelas ligações e pela entrada do vírus nas células “alvo”.

As proteínas E1 e E2 foram encontradas sob a forma hetero-oligomérica, associadas ao core e a NS2 (LO *et al.*, 1996). Apresentam alta variabilidade genética, constituindo a principal causa do escape do vírus à resposta imune do hospedeiro.

Na E2, duas regiões altamente variáveis são encontradas e denominadas de regiões hipervariáveis 1 (HVR1) e 2 (HVR2). Na HVR1, especialmente no aminoácido 27, ocorrem mutações, provavelmente, devido à pressão seletiva do sistema imune, produzindo vários tipos de antígenos que auxiliam na evasão do sistema imunológico (MAERTENS *et al.*, 1997), favorecendo a evolução para cronicidade. A variabilidade da gp70 pode alterar sua conformação e imunogenicidade, sendo um fator a ser considerado na produção de vacinas (HOUGHTON *et al.*, 1991; OMATA *et al.*, 1994; VAN DOORN, 1994; RICE *et al.*, 1996). Em chimpanzés, a imunização com as glicoproteínas E1 e E2 induziram anticorpos específicos anti-E2 capazes de neutralizar a ligação de E2 sobre as células susceptíveis. Estas moléculas são comumente conhecidas como anticorpos com atividade neutralizante de ligações (NOB). Embora avaliar a replicação e a infecção pelo HCV, tenha sido prejudicada pela pouca eficiência do mesmo em ser cultivado em cultura de células, altos títulos de anticorpos NOB têm sido observados e parecem estar relacionados à resolução natural da infecção crônica pelo HCV (ISHII *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 1999).

Proteína p7

A p7 faz parte da porção C terminal de E2. Em um estudo recente foi demonstrado que a p7 é uma proteína, encontrada ao longo da membrana no retículo endoplasmático (RE) com dois domínios de transmembranas (TMDs), ligados por um *loop* citoplasmático. Essa proteína apresenta características similares

ao grupo de proteínas chamadas de *viroporins* (GRIFFIN *et al.*, 2003), cuja característica é formar um canal iônico que pode ser importante para a formação do vírus ou para a sua saída da célula. *In vitro*, demonstrou-se que a p7 pode formar canais iônicos em membranas lipídicas artificiais sugerindo, que ela seja responsável pelo transporte de íons do RE para o citoplasma das células do hospedeiro. Este transporte pode ser bloqueado por um inibidor de canal iônico, conhecido como amantadina (GRIFFIN *et al.*, 2003; BERG *et al.*, 2003). Tal inibição pode ter um efeito benéfico no tratamento do HCV, podendo ser um alvo para o desenvolvimento de drogas antivirais (BERG *et al.*, 2003). Foi demonstrado também que a p7 é essencial para a infectividade do HCV e que contém importantes seqüências genótipo-específicas que interagem com seqüências de outras regiões genômicas (SAKAI *et al.*, 2003).

1.7.4.2 - Proteínas não estruturais

As proteínas não estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, estão localizadas na porção carboxiterminal da poliproteína e estão envolvidas no ciclo de maturação e na replicação viral (CHOO *et al.*, 1991; HOUGHTON *et al.*, 1991; MAERTENS *et al.*, 1997).

NS2

A NS2 é uma proteína de transmembrana de 23kDa, localizada entre os aminoácidos 810 ao 1026. A porção terminal da proteína NS2 é mediada por uma protease viral localizada em grande parte nessa região e em parte na porção N-terminal da NS3. A protease NS2-3 tem sido considerada como uma metaloprotease devido a sua atividade enzimática ser estimulada por cloreto de zinco (ZnCl₂) e inibida por etileno diamino tetracético (EDTA) (HIJIKATA *et al.*, 1993). As proteínas não estruturais NS2-NS5B são responsáveis pelo processamento e pela replicação da proteína viral (SUZUKI *et al.*, 1999).

NS3

A NS3 é uma proteína de 70-KDa que se liga ao 3' final do genoma do HCV e regula a replicação do RNA viral (SHIMIZU *et al.*, 1996). Sua porção aminoterminal tem função de serina-protease e a carboxiterminal, contém NTPase e RNA-helicase. As helicases são responsáveis pelo desenrolamento do RNA de cadeia dupla durante o processo de replicação viral (RICE *et al.*, 1996). Estudos mostram que a formação de complexos estáveis de NS3 e NS4A é necessária à atividade da protease. A clivagem interna da proteína NS3 pela ação da protease produz proteínas de 49-kDa (NS3a) e 23-kDa (NS3b) (SHOJI *et al.*, 1998) (SUZUKI *et al.*, 1999).

Nos testes sorológicos de terceira geração, a proteína recombinante do NS3, a c33c com modificação conformacional foi adicionada em lugar do c33cr que era usada nos testes de segunda geração. Esse antígeno, assim como o antígeno do core, é bastante conservado entre os diferentes genótipos do HCV. Assim, em regiões onde a prevalência do genótipo diferente do 1 é alta, essa característica torna-se muito importante, já que os testes anti-HCV utilizam antígenos do genótipo 1, permitindo assim, detecção de todos os tipos de HCV com sensibilidades similares.

O antígeno do NS3 é conformacional, sendo difícil de se expressar em pequenos peptídeos sintéticos (PEREBOEVA *et al.*, 2000), motivo pelo qual os antígenos utilizados nos testes sorológicos são recombinantes.

NS4A e NS4B

A proteína NS4A de 8kDa consiste de 54 aminoácidos e age como um cofator para serina protease NS3. A NS4A também está associada a NS5A, e representa um importante papel na hiperfosforilação da NS5A. A NS4B é uma proteína hidrofóbica de 26-kDa com função desconhecida. Essas proteínas são constituídas de antígenos altamente imunogênicos.

A fração antigênica C100, obtida através da clonagem, é a mais empregada em testes sorológicos e foi utilizada nos testes de primeira geração para detecção de anti-HCV (VAN DOORN, 1994).

Nos testes sorológicos de terceira geração, os antígenos recombinantes 5.1.1r e c100-3r foram substituídos por peptídeos sintéticos contendo epítomos 5.1.1p e c100p, melhorando substancialmente a sensibilidade dos testes.

Contudo, a região NS4 apresenta grande variabilidade genômica entre os genótipos. Assim, entre o genótipo 1 e o 2, a homologia da região codificadora do c100 é de apenas 75 a 77%. Isso explica a diferença na reatividade quando o HCV do paciente é diferente de 1a, que é o genótipo do antígeno utilizado nos testes sorológicos. Nos testes de primeira e segunda geração esses epítomos prejudicavam a sensibilidade dos testes, pois, se apresentavam de forma truncada faltando 4 aminoácidos. Posteriormente esses 4 aminoácidos foram incluídos nos epítomos da proteína c100 do antígeno codificado pelo NS4 (PAWLITSKY *et al.*, 1995b), melhorando a sensibilidade desse antígeno.

NS5A

A NS5A é uma proteína que se apresenta sob a forma fosforilada de 56-kDa (p56) e hiperfosforilada de 58 kDa (p58) (KANEKO *et al.*, 1994). Estas proteínas fosforiladas regulam as interações proteína-proteína e proteína-ácido nucleico. A região entre os aa 2209 e 2248, chamada de região de determinação de sensibilidade ao IFN (ISDR), está implicada na modulação da resposta antiviral mediada pelo IFN, do hospedeiro (ENOMOTO *et al.*, 1995). A ISDR inibe a cadeia dupla de RNA celular ativado pela proteína kinase R (PKR) (GALE *et al.*, 1998) que é efetivo na atividade antiviral do IFN.

Mais recentemente tem sido sugerido que a região variável de NS5A, a V3, parece estar associada com diferenças na resposta ao tratamento (VUILLERMOZ *et al.*, 2004). Um outro estudo na Europa mostrou que o domínio V3 externo a ISDR tem também trocas de aminoácidos que estão envolvidas na resistência ao interferon. Puderam concluir que a ISDR não é preditivo para o sucesso do tratamento mas sugere que o domínio V3 tenha maior variabilidade em respondedores do que nos não respondedores (VEILLON *et al.*, 2004).

A região mais antigênica da estrutura primária da NS5A, localizada entre os aminoácidos 2212 e 2313 é também altamente variável. Esta variabilidade na sequência desta proteína tem um impacto nas propriedades antigênicas das regiões

imunodominantes de NS5A, principalmente no desenvolvimento de testes para detecção eficiente de anti-HCV nas amostras de soro (DOU, *et al.*, 2002).

NS5B

A NS5B é uma fosfoproteína de 65-kDa, associada à membrana, contendo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e sua sequência é altamente conservada entre as diferentes cepas do HCV.

A NS5B expressa em células de insetos mostrou atividade RdRp dependente de *primer* (iniciador), a qual é capaz de copiar o RNA completo do HCV transcrito, *in vitro*, sem adição de outras proteínas do HCV, sendo portanto, essencial na replicação viral (ISHII *et al.*, 1999; SUZUKI *et al.*, 1999).

A NS5B sintetiza a molécula intermediária de RNA negativa e a utiliza como molde para a síntese da fita simples de RNA positiva (HOUGHTON *et al.*, 1991). A falta de habilidade da RdRp em revisar sua sequência resulta numa grande número de mutações.

Nos testes sorológicos, a proteína recombinante da NS5 só foi introduzida naqueles de terceira geração. Na literatura estudos têm comprovado a baixa especificidade desse antígeno, incluindo-se a reação cruzada com citomegalovírus (SUSLOV *et al.*, 2002).

1.8 – HETEROGENEIDADE GENÔMICA

O genoma do HCV é altamente heterogêneo (DUSHEIKO *et al.*, 1994; BUKH *et al.*, 1995; SIMMONDS, 1995). Como nos casos de outros vírus RNA a taxa de mutação do HCV é estimada em $1,92 \times 10^{-3}$ substituições de base por sítio no genoma/ano (OGATA *et al.*, 1991). As mudanças de nucleotídeos ocorrem exclusivamente por substituições de bases e estão distribuídas irregularmente em toda a extensão do genoma do HCV (OGATA *et al.*, 1991). Parte da região 5' terminal, incluindo-se a região 5' não-codificante é a mais conservada e as regiões E1, E2, NS4 e NS5a são mais variáveis (OKAMOTO *et al.*, 1992; BUKH *et al.*, 1993), sendo uma pequena região N-terminal no gene E2 considerada uma região hipervariável 1 (HVR1) (WEINER *et al.*, 1991; HIJIKATA *et al.*, 1991). Os genes NS2, NS3, e NS5B são menos variáveis do que E1, E2, NS4 e NS5A.

1.8.1 - Genótipos

Com base na sequência de nucleotídeos, o estudo desta heterogeneidade resultou na classificação do HCV em 6 genótipos principais.

Estes são identificados com algarismos arábicos, de acordo com a ordem em que foram sendo descobertos e nomeados como "tipo". Alguns tipos possuem sequências estritamente relacionadas e são classificados como subtipos, identificados por letras minúsculas (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 3b, etc.).

Recentemente, novos genótipos têm sido descritos e denominados de tipos 7, 8, 9, 10 e 11. O número de genótipos está em desacordo com o número preconizado em consenso, por isso, alguns pesquisadores têm proposto que os genótipos de 7 a 9 e 11 sejam considerados como variantes do mesmo grupo e classificados como subtipos do genótipo 6 e o 10 como subtipo do genótipo 3 (MIZOKAMI *et al.*, 1996).

Os diferentes genótipos são resultantes do acúmulo de mutações que ocorrem na evolução viral. Entre os diferentes genótipos a similaridade da região não estrutural do HCV é inferior a 68% e de 77 a 80% entre os diferentes subtipos de um mesmo genótipo (MAERTENS *et al.*, 1997). Os principais tipos e subtipos estão representados na árvore filogenética, **figura 3**.

A composição da *quasispecies* do HCV refere-se a variabilidade genética dentro do indivíduo infectado, como resultado de nova infecção com população viral heterogênea e acúmulo de mutações durante o curso da infecção (FORNS *et al.*, 1999).

FIGURA 3 - Árvore filogenética representando os 6 principais genótipos do HCV e seus subtipos (SIMMONDS *et al.*, 1996).

1.9 - ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

As proteínas do HCV, que são expressas na superfície das células infectadas, estimulam o sistema imune do hospedeiro que, através do reconhecimento imune de células T, estimulam a produção de anticorpos, induzem a destruição dos hepatócitos infectados e o desenvolvimento da hepatite (SZABÓ *et al.*, 2003).

O papel dos anticorpos na infecção pelo HCV não significa proteção, imunidade ou defesa efetiva, como ocorre em outras doenças virais, embora a presença dos anticorpos seja à base do diagnóstico no acompanhamento laboratorial (BURIONI *et al.*, 2003).

Os anticorpos anti-HCV podem tornar-se indetectáveis após a infecção ser controlada, definindo um fenômeno chamado de sororreversão. A sororreversão pode ser completa ou parcial. A completa é definida como a perda total de anticorpos específicos detectáveis, como por exemplo, uma mudança de resultado positivo para negativo no ELISA anti-HCV. A sororreversão parcial é caracterizada pelo desaparecimento ou diminuição de um ou vários, mas não de todos os anticorpos contra os antígenos do HCV. Esta sororreversão tem sido relatada em pacientes hemodialisados (SIMON *et al.*, 1994), em imunodeficientes (LEFRÈRE *et al.*, 1997) e em indivíduos imunocompetentes, depois de resposta completa à terapia com interferon- α (POIGNET *et al.*, 1995).

No contexto da infecção autolimitada, a possibilidade e a frequência de sororreversão permanecem indeterminadas e controversas. Estes achados tem sérias implicações na investigação de transfusões, nos casos em que há suspeita do doador de sangue ter transmitido HCV através de uma doação passada. (LEFRÈRE *et al.*, 2004).

1.10 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.10.1 - Diagnóstico sorológico

O diagnóstico da hepatite C é geralmente casual, já que a maioria dos indivíduos infectados apresenta a forma crônica e assintomática da doença. Assim, os testes de triagem sorológica e a detecção molecular do HCV constituem recursos mais importantes na identificação dos mesmos.

Desde 1990, quando os testes de triagem para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C foram licenciados e comercializados, surgiram várias versões de ensaios com o intuito de torná-los mais sensíveis e específicos. Apesar disso, os testes de ELISA utilizados para a triagem de anti-HCV apresentam sérias limitações devido à alta frequência de resultados inespecíficos.

Para a triagem sorológica em bancos de sangue, procura-se utilizar testes com elevada sensibilidade devido à janela imunológica e como consequência, pode resultar em uma parcela de resultados falsos-positivos. A melhora da triagem sorológica de doadores de sangue como também da seleção de doadores pôde ser observada na FPS/HSP, pela diminuição da taxa de descarte de bolsas. Essa foi verificada desde a introdução dos testes anti-HCV como mostra **tabela 1** (SALLES *et al.*, 2003).

TABELA 1: Taxa de descarte sorológico anual para HCV na Fundação Pró-sangue/ Hemocentro de São Paulo, Brasil, 1991 a 2001^a

Teste	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
HCV ^b	1,8	1,9	1,5	1,6	1,2	1,6	0,9	1,0	0,9	0,7	0,7

Ref. – SALLES *et al.*, 2003

^a taxas expressas em porcentagens

^b Início em julho de 1991

O RNA do HCV é detectável após a primeira semana de infecção. O pico da alanina aminotransferase (ALT) é observado em média oito semanas após o início da infecção, época em que os anticorpos contra o antígeno do core tornam-se detectáveis (**figura 4**).

FIGURA 4 – Evolução dos marcadores da hepatite C (Adaptação de KLETER, 1995).

Legenda:

RNA HCV = ácido ribonucleico do vírus da hepatite C

ALT = alanina aminotransferase

■ = PCR negativo

■ = PCR positivo

1.10.1.1 - Testes de triagem

A detecção de anticorpos constitui a forma mais prática de triagem. A reação imunoenzimática, a mais empregada, utiliza antígenos recombinados e peptídeos sintéticos. A vantagem de se usar os testes imunoenzimáticos é a praticidade, com possibilidade de automação e custo relativamente baixo.

Uma vez positivos ou inconclusivos nestes testes, o teste suplementar deve ser realizado por *immunoblots* que, fornecendo a positividade individual para cada antígeno utilizado nas tiras de suporte sólido, confere maior especificidade à reação. Entretanto, recentemente, as técnicas moleculares têm sido preferidas como teste

suplementar, resultando em novo algoritmo cuja confirmação é feita por testes como por exemplo a PCR.

Kits diagnósticos comerciais

O primeiro ELISA (ELISA-1 ou de primeira geração), desenvolvido em 1990, teve como antígeno, somente uma proteína recombinante (C100-3) derivada, por clonagem, do gene NS4. Este teste, por utilizar um único antígeno, demonstrou baixa sensibilidade, em torno de 70 a 80% em regiões de alta prevalência para o HCV e uma baixa especificidade, principalmente, em população de baixo risco, onde se observou um valor preditivo positivo de 30-50% (GRETCH, 1997). Alguns autores têm relatado uma ocorrência de até 70% de resultados falsos-positivos em amostras de doadores de sangue (RICHTER, 2002; GRETCH, 1997).

Uma das causas da inespecificidade decorre das reações cruzadas com superóxido dismutase (SOD), empregada no processo de clonagem da proteína. Com a baixa sensibilidade dos testes de primeira geração e a soroconversão tardia, de cerca de 2 a 4 meses após a infecção, em pacientes imunocompetentes e de 6-12 meses em pacientes imunodeficientes (VAN DER POEL *et al.*, 1994), a ocorrência de transmissão do HCV através do sangue ainda se mantinha alta.

Em 1992, surgiu o ensaio de segunda geração (ELISA-2) que utilizou as proteínas C22-3 da região do core, C33c da região NS3 e C200 das regiões NS3 e NS4 do genoma viral. A sensibilidade e a especificidade foram aumentadas, além da redução do período de janela sorológica para cerca de 88 dias (NEVILLE *et al.*, 1997). Em populações de alta prevalência para o HCV, o ELISA-2 permitiu detectar de 88 a 95% dos indivíduos com evidência da infecção pelo HCV por técnicas moleculares (GRETCH, 1997). Mesmo em populações de baixa prevalência, tais como doadores de sangue, houve uma redução da incidência de hepatite C pós-transfusional (GRETCH, 1997). Esta melhora da sensibilidade e os valores preditivo dos testes estão dispostos na **tabela 2**.

TABELA 2: Sensibilidade e valor preditivo para as várias gerações de ELISA para anti-HCV.

Testes	Sensibilidade*(%)	Valor preditivo positivo (%)	
		População de baixa prevalência	População de alta prevalência
ELISA-1	70-80	30-50	70-85
ELISA-2	92-95	50-61	88-95
ELISA-3	97	25	Não realizado

*Dados baseados em achados clínicos e detecção do RNA pela PCR comparados coM RIBA (GRETCH, 1997).

Posteriormente em 1994, foi desenvolvido o teste de terceira geração (ELISA-3) que acrescentou ao teste anterior, a proteína NS5 e também a utilização da proteína do NS3 reconfigurada, ou seja, quimicamente modificada para aumento da reatividade e conseqüentemente, para aumentar a sua sensibilidade. Entretanto, os testes de terceira geração não apresentaram grandes diferenças na sensibilidade em relação aos de segunda geração, mas houve uma pequena diminuição da janela sorológica para aproximadamente 66 dias (NEVILLE *et al.*, 1997).

A diversidade dos antígenos e as metodologias de ensaio imunoenzimático empregadas em *kits* comerciais, no entanto, dificulta a interpretação dos seus resultados, com variações importantes no desempenho diagnóstico, tais como na sensibilidade, na especificidade, na duração da janela sorológica, nas diferenças de reatividade dependente do tipo do HCV e em outras limitações inerentes aos testes sorológicos.

1.10.1.2 - Testes suplementares

Teste de *Immunoblot*

O teste de *immunoblot* (IB) é um ensaio qualitativo utilizado para detectar anticorpos específicos para cada fração antigênica do HCV, separadamente, no soro ou plasma e foi desenvolvido para ajudar a resolver o problema dos resultados falsos-positivos que poderiam ser gerados num ELISA. Assim, os IB também foram

desenvolvidos como sendo de primeira (IB-1), segunda (IB-2) e de terceira (IB-3) geração, com os mesmos antígenos utilizados no ELISA das respectivas gerações.

No IB de segunda geração, 93% dos resultados positivos pelo ELISA, em população de alta prevalência, eram confirmados pelo IB e menos de 1% eram IB negativos. Estes dados indicam que em população de alto risco, com os testes de triagem positivos, a realização do IB poderia ser dispensada (GRETCH, 1997).

Entretanto, na população de baixa prevalência como no caso de doadores de sangue, isso não é verdadeiro sendo verificado um grande número de resultados falsos-positivos quando se empregam testes de alta sensibilidade.

Nos testes de terceira geração, a substituição de alguns antígenos recombinados por peptídeos sintéticos resultou em uma importante melhora na sensibilidade e especificidade do teste, com uma redução de resultados indeterminados.

As novas versões do IB, tal como o anti-HCV LIATek® (HCV III – Organon Teknika, Holanda), incluem também antígenos recombinantes e sintéticos provenientes das regiões mais conservadas do genoma viral de outros genótipos, entre os quais os tipos 2 e 3, além do 1. Estes antígenos, dispostos de forma linear ou em bandas sobre uma fita de nitrocelulose, são oriundos do core (4 epítomos), NS4 (3 epítomos), NS5 (3 epítomos) e E2NS1 (BOSSI *et al.*, 2004).

Apesar da melhora dos antígenos utilizados, o IB anti-HCV apresenta, ainda, uma menor sensibilidade em relação aos testes de ELISA (PAWLOSTSKY *et al.*, 1998) além de também não apresentar especificidade ótima. Ambos os testes de triagem e suplementar podem ter resultados falsos-positivos em hipergamaglobulinemias, hepatites auto-imunes e falsos-negativos em hipogamaglobulinemias, em condições de imunossupressão, entre outros (FABRIZI *et al.*, 2002; LAUER *et al.*, 2001).

1.10.2 - Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular da infecção pelo HCV é baseado na detecção do RNA do HCV e na sua quantificação, através de técnicas de biologia molecular padronizadas *in house* ou *kits* comerciais.

Para detecção do RNA viral, a reação em cadeia da polimerase (PCR), qualitativa ou quantitativa é a mais empregada e é considerada hoje a técnica mais

adequada na caracterização do estado de infecção pelo HCV, possibilitando a determinação da viremia, muito precocemente, ainda na fase de janela imunológica e também no acompanhamento à terapêutica.

Um estudo com indivíduos cujas amostras foram submetidas ao NAT e apresentaram resultados negativos e que positivaram durante o seguimento, demonstrou que o período de pré-soroconversão foi em média de 61 dias (BUSCH, 2001). Este período é bastante semelhante ao achado por KLEINMAN *et al.*, (2000) que estudaram o período em que os indivíduos positivos para NAT permaneceram negativos para os anticorpos.

Estudos prospectivos relatados mostraram raros casos de doadores com prolongada janela sorológica de mais de um ano, contribuindo assim para aumentar o risco de transmissão transfusional do HCV. Assim, indivíduos virêmicos e soronegativos têm sido denominados de portadores imunosilenciosos (PEOPLES *et al.*, 2000; STRAMER *et al.*, 2000).

As técnicas moleculares normalmente se baseiam na extração do material genético, na transcrição reversa do RNA para DNA complementar (cDNA) e posterior obtenção de DNA dupla fita, amplificação deste DNA que passa a ser utilizado como um molde e sua detecção.

Numerosos fatores contribuem na variabilidade do ensaio da PCR, principalmente a PCR *in house*, incluindo-se manuseio das amostras, desenho adequado dos *primers*, presença de inibidores das enzimas envolvidas no processo, variações nas reações bioquímicas envolvendo enzimas e sensibilidade dos sistemas de detecção pós-amplificação. Assim, a capacidade de detecção da PCR *in house* pode variar entre laboratórios sendo, em geral, ao redor de 100 a 1000 cópias/mL (GRETCH, 1997).

O teste de procedência comercial que tem aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) tanto para o método qualitativo manual, como o semi-automático, possuem um limite de detecção de 50 a 100 UI/mL.

1.10.2.1 - Diagnóstico molecular qualitativo

Os métodos qualitativos detectam a presença do RNA viral, mas, não podem determinar a carga viral. Eles são baseados na amplificação do alvo, como a PCR,

que utiliza 3 temperaturas e uma enzima termoestável, uma DNA polimerase RNA dependente.

O custo da PCR é bastante elevado, mas tende a se tornar cada vez mais acessível quanto maior for o consumo destes reagentes no mercado.

Mais recentemente foi desenvolvido o método de amplificação mediada por transcrição (TMA), que é uma reação isotérmica e utiliza duas enzimas a transcriptase reversa e a T7-RNA polimerase. Esta metodologia não tem ainda a aprovação do FDA, embora já seja comercializada e o limite de detecção é de 5 a 10 UI/mL.

A especificidade da PCR para a detecção do RNA HCV é superior a 98%. Um ensaio qualitativo confirma a replicação ativa do HCV, mas o teste negativo não exclui a viremia e pode refletir um declínio abaixo do nível de detecção do ensaio (NIH, 2002).

No Brasil, o *kit* qualitativo disponível comercialmente é produzido pela Roche Diagnostics do Brasil e é conhecido como *AMPLICOR Hepatitis C Vírus (HCV) Test, version 2.0*.

Com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção, a técnica de PCR tem sofrido algumas adaptações, como, por exemplo, a dupla amplificação (*Nested-PCR*) de parte do genoma viral, que permite fazer a amplificação secundária de um fragmento genômico, ainda menor, da região conservada 5' NC, tornando possível detectar quantidades de 100 cópias de RNA do HCV/mL ou valores até menores quando se trabalha com soro, mesmo *in house* (GARSON *et al.*, 1990).

Os ensaios qualitativos são mais sensíveis na detecção do RNA do HCV do que os métodos quantitativos (CAREY, 2003). Assim, podem também ser utilizados para diagnóstico do HCV, no período de janela imunológica onde os anticorpos ainda não são detectados ou também na fase aguda, no início dos sintomas, quando apenas 50 a 70 % dos pacientes possuem níveis detectáveis de anticorpos (FARCI *et al.*, 1991).

Na fase crônica, o teste para RNA do HCV pode distinguir pacientes com replicação viral daqueles sem a viremia, ambos sorologicamente positivos, podendo, porém, ser os últimos, os de memória sorológica em casos de infecção resolvida (PAWLITSKY *et al.*, 1998). Já, nos pacientes hemodialisados ou

imunossuprimidos com suspeita de infecção pelo HCV, mesmo com os testes para anticorpos negativos, a pesquisa do RNA do HCV deve ser feita (CAREY, 2003).

Crianças nascidas de mães positivas para o anti-HCV, podem carrear anticorpos maternos por um período de até um ano, como consequência da transferência passiva de anticorpos da mãe para o filho; assim, o diagnóstico do recém-nascido é baseado na detecção do RNA do HCV.

Em caso de exposição accidental, o HCV pode ser detectado no soro dentro de poucos dias ou semanas após o acidente com sangue infectado. Nestes casos, a terapia antiviral é recomendada depois do diagnóstico de hepatite aguda ser confirmado (PAWLOTSKY, 2002).

1.10.2.2 - Diagnóstico molecular quantitativo

Um dos métodos quantitativos que pode ser utilizado é o de amplificação de sinal, chamado de *branched-DNA* (Branched DNA-based signal amplification – bDNA), onde o genoma viral é primeiramente hibridado com sondas específicas de captura e o híbrido é amplificado para detecção e mensuração.

Outro método quantitativo comercial é o *AMPLICOR HCV MONITOR Test, version 2.0*, capaz de detectar de 600 UI/mL até 850.000 UI/mL (ou 1620 cp/mL até 2.295.000 cp/mL), conforme padronização nos EUA e introduzido no *kit* Roche (CAREY, 2003).

Os testes quantitativos para a detecção do RNA têm sido utilizados para avaliar e monitorar o tratamento com os antivirais para hepatite C, permitindo adequar a dose destas drogas e a duração do tratamento. Os métodos sorológicos não se adequam para a avaliação terapêutica, pois, em curto espaço de tempo, os títulos de anticorpos não se alteram.

Mais recentemente, novas técnicas de detecção/quantificação do RNA do HCV têm sido descritas ou comercializadas, como a técnica de *Real-Time PCR* (PCR em tempo real), que se baseia na detecção da síntese do *amplicon* em tempo real, ou seja, durante o processo de amplificação, permitindo deduzir a quantidade original do genoma viral na amostra (HIGUCHI *et al.*, 1993). Essa técnica é, teoricamente, mais sensível, evita a contaminação e possui maior amplitude na faixa de detecção (PAWLOTSKY, 2002).

Recentemente, para que o resultado da quantificação pudesse ser comparável, independente da metodologia utilizada, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu padrões internacionais para padronização da unidade de quantificação do RNA do HCV, em unidades internacionais por mL (UI/mL) (SALDANHA *et al.*, 1999; SALDANHA *et al.*, 2000).

1.11 - Genotipagem do HCV

A PCR permite, ainda, que se realize a genotipagem do HCV que avalia a possibilidade de coinfeções ou ainda de reinfecções por cepas virais diferentes; esta situação é um achado freqüente nos hemofílicos. Pode-se caracterizar o genoma viral classificando-o em diferentes genótipos e subtipos do HCV pelas técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), de seqüenciamento genômico e o método comercial LiPA[®] (Line Probe Assay - Innogenetics, Bélgica) (PAWLOTSKY, 2002), sendo este baseado na hibridação dos produtos amplificados da região 5' UTR com sondas genótipo-específicas (STUYVER *et al.*, 1993). A limitação desta técnica está na classificação incorreta dos genótipos 7, 8 e 9 que aparecem como genótipo 1b e 1 (incapazes de subtipar), porque possuem uma região homóloga de nucleotídeos na 5'UTR (DEV *et al.*, 2002).

1.12 - DETECÇÃO DO ANTÍGENO DO CORE DO HCV POR TÉCNICA DE ELISA

Na Alemanha, a liberação de componentes sanguíneos está regulamentada nos padrões internacionais preconizados pela OMS que define o uso do NAT para a detecção molecular do HCV, com uma sensibilidade mínima de 5.000 UI/mL para o teste individual (SALDANHA *et al.*, 1999).

Em estudos realizados com o NAT para o HCV na população de doadores, em mini-pools, mas, dentro da sensibilidade exigida de 5.000 UI/mL, comparado com o teste para detecção do antígeno do core do HCV por técnica de ELISA (cAgHCV) com sensibilidade equivalente a 100.000 UI/mL, a diferença de detecção foi estimada em, aproximadamente, dois dias (46,7 horas) entre eles. Já, quando comparado o NAT HCV com sensibilidade de 50 UI/mL com o teste de ELISA para cAgHCV, esta diferença aumentou para 5 dias (118,5 horas).

A precocidade na detecção desses dois testes, após a infecção, foi também confirmada por meio de cálculos feitos para a detecção do cAgHCV com painéis de soros obtidos na fase de janela imunológica. Devido à facilidade de padronização e de automação dos testes de ELISA cAgHCV, este pode ser uma alternativa eficiente em países que, por razões econômicas, não possam utilizar a técnica de NAT para o HCV na triagem desta infecção, principalmente durante a fase de janela imunológica (NÜBLING *et. al.*, 2002). Com isso, futuramente, novos algoritmos possivelmente serão propostos para a detecção do HCV na triagem de doadores de sangue.

1.13 - ALGORITMOS

O CDC recomenda que pessoas com anti-HCV positivo sejam consideradas como evidência sorológica para o HCV somente depois que o teste de triagem for confirmado por um teste sorológico mais específico.

Devido à falta de um teste *gold standard*, a falta de padronização na interpretação dos testes suplementares, o alto custo dos mesmos e dos testes moleculares, o CDC em 2003, propôs dois novos algoritmos, além do aqui chamado de convencional, que realiza o *immunoblot* (IB) nas amostras onde o teste de ELISA foi positivo ou inconclusivo.

Um dos algoritmos baseia-se no grau de reatividade dos anticorpos no ELISA, traduzido pela razão entre a densidade ótica da amostra (DO) e a densidade ótica correspondente ao *cut-off* (CO), neste trabalho denominado de índice de reatividade (IR), para então se obter um IR de corte. As amostras seriam consideradas positivas quando o IR obtido fosse maior do que o IR de corte, tendo-se que confirmar apenas, as amostras abaixo deste valor. O IR de corte deve ser estabelecido para cada laboratório dentro das condições de sua rotina, para aquele reagente e para a população atendida.

O segundo algoritmo consiste na utilização de um teste molecular (PCR) nas amostras com teste de triagem positivo ou inconclusivo. Nas amostras cujos resultados da PCR forem negativas, o IB deve ser realizado.

A vantagem destes algoritmos alternativos é de serem mais econômico ou fornecer um diagnóstico mais completo informando também sobre a presença ou

não da viremia (CDC, 2003). Assim, a escolha de um ou outro algoritmo depende do objetivo da realização do diagnóstico.

1.14 - TRATAMENTO

Atualmente, o tratamento para hepatite crônica C está baseado na combinação de interferon alfa peguilado (IFN- α -PEG), IFN- α -2a peguilado ou IFN- α -2b peguilado e Ribavirina, sendo que o tratamento de referência emprega doses semanais de IFN- α peguilado e doses diárias de Ribavirina. As técnicas moleculares são úteis no seguimento de todas as fases do tratamento (PAWLOTSKY, 2002). A quantificação dos níveis de RNA viral é um dos parâmetros utilizado para verificar a reposta virológica sustentada (clareamento do RNA do HCV por 24 semanas, depois de retirada do tratamento), a qual é o ponto final da terapia (MANNS *et al.*, 2001).

Tem sido sugerido que pacientes infectados com genótipo 1, apresentam uma pior resposta ao tratamento com interferon do que aqueles infectados com genótipo 2 e 3 (NEUMANN *et al.*, 2000).

Diversos fatores do hospedeiro podem influenciar no resultado do tratamento, tais como a cinética da redução da carga viral com a terapia com IFN, as *quasispecies* virais e as mutações na região NS5A, sendo o genótipo e a carga viral pré-tratamento os mais preditivos na resposta terapêutica (DEV *et al.*, 2002).

Estudos recentes matemáticos mostraram que a resposta viral precoce, definida como a diminuição de 2 log na carga viral nas primeiras 12 a 24 horas de tratamento, é preditivo de resposta virológica sustentada (RVS) e pode ser usada para monitorar o tratamento (NEUMANN *et al.*, 2000).

Um estudo recente mostrou haver diferenças entre os HCV de diferentes regiões e que a raça pode influenciar na resposta a monoterapia com interferon, onde foi observada uma menor resposta ao tratamento em americanos de origem africana do que em brancos, embora a magnitude deste efeito possa ser diminuída com a terapia combinada (DEV *et al.*, 2002; McHUTCHISON *et al.*, 2000).

No Brasil, através da portaria nº 863, de 4 de novembro de 2002, da Secretaria de Assistência à Saúde, foi estabelecido um protocolo clínico com diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite crônica pelo vírus C. Este protocolo determina critérios de inclusão/exclusão de pacientes no tratamento,

critérios de diagnóstico, esquema terapêutico, mecanismos de acompanhamento e avaliação deste tratamento.

1.15 - PERSPECTIVAS DE PRODUÇÃO DE VACINAS

Apesar do conhecimento sobre o HCV, por mais de uma década, pouco progresso foi verificado no desenvolvimento de uma vacina (ABRIGNANI *et al.*, 1999; FORNS *et al.*, 2000). Os maiores obstáculos são a falta de um sistema de cultura adequada para a propagação do vírus e de um modelo animal de pequeno porte.

Estudos recentes tem demonstrado que a filogenia do *Tupaia belangeri*, está estritamente relacionada com a dos primatas e esta espécie pode ser infectada pelo HCV in vivo (XIE *et al.*, 1998). Os hepatócitos do *Tupaia belangeri* podem representar um novo modelo de cultura celular para o estudo das importantes etapas do ciclo de vida viral, incluindo a avaliação funcional do CD81 como receptor celular do HCV, a existência de outros receptores e também a neutralização viral (ZHAO *et al.*, 2002).

Recentemente, um sistema de replicação para o HCV foi desenvolvido, ou seja, a replicação subgenômica quimérica, que consiste de um sítio de entrada ribossomal interna de uma região não estrutural do genoma, fundido com um gene selecionado e um promotor potente (LOHMANN *et al.*, 1999). Este sistema de replicação reproduz o HCV, em níveis moderadamente altos, em culturas de células, mas não produz vírions intactos ou partículas infecciosas (BLIGHT *et al.*, 2000). No entanto, este sistema permite estudar a replicação do HCV de um modo rápido para a seleção de agentes antivirais. Modelos de animais de pequeno porte foram desenvolvidos, incluindo animais quiméricos, transplantados com hepatócitos humanos (ILAN *et al.*, 2002; MERCER *et al.*, 2001).

Outro obstáculo para a vacina é a alta heterogeneidade do vírus, fazendo supor que se deveria desenvolver uma vacina para cada genótipo, além da resposta de anticorpos aos antígenos recombinantes ser pobre em humanos.

Um fato ainda mais relevante é que a imunidade do HCV não é completa e permite a reinfecção, depois de recuperada da infecção, como resultado da exposição a cepas diferentes do vírus ou as mesmas cepas (FARCI *et al.*, 1992; LAI *et al.*, 1994; MEHTA *et al.*, 2002).

Estes fatos mostram que o desenvolvimento de uma vacina requer um avanço fundamental na imunologia. No presente momento, o controle da hepatite C requer medidas de Saúde Pública (ROBERTSON *et al.*, 1998) e disponibilidade de tratamento a todos os indivíduos infectados que possuam indicação para tal (LIANG *et al.*, 2000).

JUSTIFICATIVA

Os testes sorológicos disponíveis para a detecção do HCV (3ª e 4ª gerações) apesar de apresentarem sensíveis melhoras na sensibilidade e especificidade quando comparados aos de 1ª geração, ainda têm muitas limitações. Por não se dispor de antígenos virais, já que o HCV não é cultivável, em meios artificiais *in vitro*, todos os antígenos são obtidos por recombinação do DNA ou através de síntese química. Assim, não se pode afirmar que a probabilidade de obtenção de antígenos mais reativos do que os até agora conhecidos tenham sido esgotadas.

Como consequência, os resultados falsos-positivos, falsos-negativos e inconclusivos são, ainda, bastante freqüentes. A especificidade e a sensibilidade relatadas na literatura nem sempre são obtidas quando se aplica o teste nas condições de rotina e o teste, sendo de procedência estrangeira e padronizado com o uso do antígeno do HCV do genótipo 1, pode não apresentar a mesma eficiência quando aplicado em diferentes populações, principalmente quando a prevalência de genótipos diferentes de 1 é alta. Isto implica em aumento de descarte de bolsas de sangue por resultados falsos-positivos e ainda, aumento do risco de transmissão transfusional do HCV e dificulta a obtenção de dados de prevalência verdadeira.

Um estudo de grande porte nas condições reais utilizando-se de reagentes de procedência comercial, com subsídios nos testes suplementares e moleculares seria de grande interesse para conhecer a verdadeira capacidade diagnóstica da infecção pelo HCV quando aplicado “em campo”, ou seja, em laboratórios ou bancos de sangue que prestam serviços diretamente à população. Esta avaliação poderá refletir as várias condições a que está sujeita uma rotina diagnóstica.

O critério de interpretação dos resultados laboratoriais, com preferência cada vez maior dos testes moleculares, como testes suplementares em substituição ao IB, leva também a necessidade de analisar novos algoritmos que incluam esta

metodologia, assim como o de estudar algum algoritmo alternativo mais econômico e rápido para os laboratórios de recursos mais limitados.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliação dos resultados dos testes de triagem para o diagnóstico da infecção pelo HCV, nas condições reais de uso, em duas amostras do mesmo doador de sangue, com subsídios nos testes suplementar e molecular. Avaliação do desempenho diagnóstico e do custo-benefício de diferentes algoritmos.

Objetivos Específicos

1. Avaliação da concordância dos resultados do ELISA de triagem (ELISA-T) anti-HCV com o do ELISA obtido na amostra de retorno do doador (ELISA-R) e análise dos resultados sorológicos com base nos resultados de teste suplementar e molecular (*Immunoblot* e PCR).
2. Análise das frações antigênicas individuais do *Immunoblot* em relação à sua frequência, intensidade de reação com a positividade no IB e na PCR.
3. Avaliação de dois diferentes critérios para interpretação dos resultados do IB.
4. Determinação do índice de reatividade do ELISA-R que fornece melhor correlação com a positividade no IB.
5. Avaliação de dois novos algoritmos propostos para HCV, comparando-se com o algoritmo convencional quanto à concordância dos resultados obtidos nos três algoritmos, o desempenho diagnóstico e a estimativa de custo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Diagnóstico Sorológico e de Biologia Molecular da Divisão de Sorologia da Fundação Pró Sangue/Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP).

3.1 - CASUÍSTICA

Este estudo contemplou 692 soros provenientes de doadores de sangue da FPS/HSP que retornaram em nossos serviços no período de setembro de 1997 a dezembro de 1998 para a confirmação dos resultados de anti-HCV positivos ou inconclusivos obtidos no momento da triagem sorológica. Assim, foram analisados os resultados obtidos pelo anti-HCV (Empresa Brasileira de Biotecnologia – EMBRABIO- Brasil), pelo *Immunoblot* (IB) (Organon Teknika, Holanda), ambos de terceira geração e pela PCR *in house*.

Esta segunda amostra foi dividida em duas alíquotas; em uma delas foi realizado o ELISA e o *Immunoblot* e a outra armazenada na soroteca do setor de Biologia Molecular à temperatura de -20°C . Nesta alíquota, foi realizada a PCR das 692 amostras analisadas e os resultados dos testes sorológicos foram obtidos do banco de dados e do cadastro dos doadores da FPS/HSP.

A população de doadores de sangue em estudo foi constituída, em sua grande maioria, por parentes ou amigos de pacientes que utilizaram os serviços oferecidos pelo complexo Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Conforme a legislação vigente na época, todos os doadores de sangue estavam incluídos na faixa etária de 18 a 60 anos e no ato da doação, assinaram um documento no qual autorizavam o uso do seu sangue para fins de pesquisa.

3.1.1 - Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletados na ocasião do retorno do doador 20mL de sangue total em 2 tubos do tipo “Vacuntainer”, sem anticoagulante, identificados com código de barras.

Após a coleta, as amostras foram enviadas para a Divisão de Sorologia, onde foram separadas, após a centrifugação a 1.600 g por 15 minutos, em duas alíquotas

de soro, sendo uma delas destinada à sorologia de rotina e, posteriormente, estocada a -20°C no Laboratório de Diagnóstico; a outra foi armazenada a -20°C e mantida no Setor de Biologia Molecular.

3.1.2 - Comitê de Ética

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (CEPFCF) em 24/06/2003, protocolo 204 e pelo comitê da FPS/HSP em 22/04/2003 sob o número de projeto 08/2003.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Testes sorológicos para anti-HCV

3.2.1.1 - ELISA

O ELISA realizado no ato da doação, ou seja, na triagem sorológica, foi denominado neste estudo, como **ELISA-T** e, quando realizado na amostra colhida no retorno do doador, de **ELISA-R**.

Os resultados dos testes de triagem anti-HCV, armazenados no banco de dados da FPS/HSP foram obtidos utilizando-se *kit* de terceira geração (ELISA 3.0) para a detecção de anticorpos anti-HCV, comercialmente disponível no mercado: o HBK 425- Hemobio® HCV ELISA 3ª geração (EMBRABIO, Brasil). Este teste detecta anticorpos contra as proteínas antigênicas recombinantes NS3 e NS5 e os peptídeos sintéticos correspondentes aos genes do core e NS4.

O teste foi realizado segundo instrução do fabricante: cada amostra de soro foi diluída a 1:20 em tampão de diluição e adicionada em cavidades de microplacas de poliestireno, previamente sensibilizadas com os antígenos acima citados. Após incubação por 60 minutos a 37°C e cinco lavagens com PBS -Tween 20, adicionou-se 200µL de anticorpo anti-IgG humano, conjugado com peroxidase, diluído a 1:100 em PBS. Após nova etapa de incubação por 60 minutos a 37°C e lavagens sucessivas, foram adicionados 200µL da solução cromógena (tetrametilbenzidina – TMB– e dimetilsulfóxido –DMSO–), diluída a 1:100 em tampão fosfato contendo solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido cítrico. A placa foi incubada por 30

minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente e a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A intensidade de coloração foi lida em espectrofotômetro, utilizando filtro duplo para espectros de 450/630 nm.

O limiar de reatividade de *cut-off* (CO) para o *kit* Hemobio[®] foi obtido da seguinte forma:

CO = somatória da média dos controles negativos (CN) e da média dos controles positivos (CP), divididos por cinco.

As amostras foram consideradas positivas quando os valores de densidade óptica (DO) divididos pelo CO eram maiores ou iguais a 1,1, inconclusivas, entre 0,9 e 1,1 e abaixo de 0,9, negativas. No manual de instrução do fabricante, a amostra seria positiva com valor igual ou maior que do *cut-off*. Por padronização interna do laboratório, foi acrescentada uma taxa de 10% acima e abaixo do valor de corte e as amostras deste intervalo, foram consideradas como inconclusivas.

3.2.1.2 - Teste suplementar de *Immunoblot* para anti-HCV

Os resultados de testes *Immunoblot* (IB) realizados nos soros dos doadores que foram previamente reagentes ou inconclusivos pelo ELISA e armazenados no cadastro de doadores, foram obtidos pelos *kits* LiaTek[®] HCV III de 3ª geração (Organon Teknika, Holanda). O LiaTek[®] detecta anticorpos IgG específicos para o HCV, dirigido contra as proteínas do genoma viral. É constituído de fitas de nitrocelulose, onde estão dispostas as frações proteicas das regiões genômicas do core1, core2, E2NS1, NS3, NS4 (A e B) e NS5A, assim como os controles de IgG de baixo, médio e alto nível, que determinam o *score* de intensidade da banda e estreptavidina para garantir a especificidade da reação (**figura 5**). Resumidamente, cada amostra de soro foi diluída a 1:100 em solução tampão contendo azida sódica 1g/L como conservante, em volume final de 1000µL. Os soros foram incubados com as tiras de nitrocelulose e diluente de amostra, nas canaletas das bandejas que acompanham o *kit*. Após incubação, sob agitação, entre 14 a 18 horas e três lavagens com tampão fosfato (diluído conforme instrução do fabricante), adicionou-se 1000µL de conjugado anti-IgG humana, diluído a 1:100 em tampão fosfato e marcado com fosfatase alcalina. Após incubação, sob agitação, por 30 minutos, e lavagens sucessivas, foi adicionado 1000µL do substrato bromo-cloro-indol-fosfato

em dimetilformamida (BCIP) diluído a 1:100 em tampão Tris-NaCl. As amostras foram incubadas, ao abrigo da luz, sob agitação e à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após remoção do substrato, a reação foi bloqueada pela adição de 1000 μ L de ácido sulfúrico 0,1M, por 15 minutos. As tiras foram retiradas e colocadas em papel absorvente para secar.

A graduação de intensidade de cor correspondeu à quantidade de anticorpos e esta foi comparada, com a intensidade verificada nos controles de IgG; às diferentes intensidades de cor foi associada uma leitura determinada por número de cruces. Assim, as amostras com baixa reatividade corresponderam à intensidade fraca (+/-), as com alta reatividade corresponderam a quatro cruces (4+) e as intermediárias variando de um a três cruces (1+, 2+ e 3+).

FIGURA 5 - Fita de *Immunoblot* (LiaTek® HCV III – Organon Teknika, Holanda) contendo as proteínas recombinantes e sintéticas do HCV e os controles de IgG.

O manual de instrução do fabricante preconiza como sendo resultado positivo o aparecimento, no mínimo, de: duas bandas com pelo menos 1+ de reatividade ou uma banda de reatividade $\geq 2+$, aqui denominados de critério **A**. Entretanto, na FPS/HSP, de comum acordo com o fabricante, e de acordo com outros autores citados na literatura (BOSSI *et al.*, 2004), tem adotado o critério de positivo que exige, no mínimo, duas bandas com intensidade de coloração $\geq 1+$; negativo na ausência de bandas e, inconclusivo quando não preenchia os critérios acima. Critério **B**.

O IB foi realizado apenas nas amostras de doadores de sangue positivos ou inconclusivos pelo ELISA anti-HCV, ou seja, em 517 amostras.

Para definir as amostras denominadas de sorologicamente positivas neste estudo, utilizou-se como parâmetro à positividade em ambos os testes, ELISA e *Immunoblot*.

3.2.2 – Testes moleculares

3.2.2.1 – Reação em cadeia da polimerase

PCR *in house*

A técnica *in house* da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a detecção do RNA do HCV em todas as 692 amostras de retorno de doadores de sangue, incluídos nesse estudo. As amostras que se tornaram negativas pelos testes sorológicos foram agrupadas em *pools* de cinco amostras e aquelas que permaneceram reativas, foram amplificadas individualmente. Para cada *pool*, foram adicionados 200µL de soro, totalizando um volume de 1000µL.

A PCR de escolha para tal análise foi a ***nested-PCR***, por sua maior sensibilidade e baseou-se na amplificação de uma região não codificadora (5'NC) do genoma viral, de, aproximadamente, 300 pares de bases, seguida de uma segunda etapa de amplificação de um fragmento interno, ao produto da primeira amplificação que apresentava 235 pares de bases.

A PCR foi realizada de acordo com a metodologia que vem sendo utilizada pela FPS/HSP, que consiste na adaptação da técnica descrita por KLETER (1995).

Extração do RNA HCV e síntese do DNA complementar (cDNA)

O RNA do HCV foi obtido a partir de 100µL de soro, utilizando-se 300µL de Trizol® (GIBCOBRL, EUA). Após agitação em agitador tipo *Vórtex* e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente (T.A.), foram adicionados 80µL de clorofórmio (Sigma, EUA) e após agitação vigorosa manual as amostras foram incubadas por 2 a 15 minutos à TA. Após centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C, transferiu-se

200µL do sobrenadante para um tubo contendo 40µL de Dextran T500 a 1,0µg/µL (Pharmacia Biotech, EUA) e 200µL de isopropanol (Sigma, EUA) para precipitar o RNA. Após incubação por 10 minutos à T.A., as amostras foram centrifugadas a 14.000 x *g*, por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante aspirado e desprezado. O precipitado de RNA foi lavado em 400µL de etanol a 70% gelado (Merck, Brasil) e centrifugado a 7.500g por 5 minutos à T.A.; o sobrenadante foi aspirado e desprezado. Depois de removido todo o resíduo de álcool, o *pellet* formado foi dissolvido em uma solução de água purificada (*Mille-Q-Millipore*), tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e 300 ng de oligonucleotídeos de sequência randômica (2µL de uma solução a 150 ng/µL random *primer* - Pharmacia Biotech, Suécia), em volume final de 12µL/amostra. Após a desnaturação por 10 minutos a 70°C, o material foi mantido a 42°C por 5 minutos para estabilizar e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA, através da enzima transcriptase reversa (RT). Para tanto, foram adicionados 8,0µL da solução de síntese de cDNA (*mix* da RT) e incubada a 42°C por 90 minutos. Para desnaturar a RT as amostras foram aquecidas a 70°C por 10 minutos. A mistura que continha o DNA em volume final de 20µL foi submetida a PCR, ou estocada a -20°C para utilização posterior.

Preparo do *mix* da RT

Tampão 5x (GIBCOBRL, EUA)	4,0 µL
Dithiothreitol (DTT), 0,1M (GIBCOBRL ou Sigma)	2,0 µL
dNTPs (Pharmacia Biotech ou GIBCOBRL)	1,0 µL
"SuperScript™ II – 200 U/µL	0,5 µL
Inibidor de ribonuclease (10 U/µL GIBCOBRL, EUA)	0,5 µL

Reação de amplificação do material genético pela PCR

Os s iniciadores (*primers*) foram fornecidos pela Innogenetics (Bélgica), para serem utilizados na PCR. A PCR foi realizada utilizando-se *primers* biotinilados NCR1 e NCR2 (*Outer-primers* ou *primers* externos), que amplificaram parte da 5'-NCR do genoma do HCV, produzindo um fragmento de, aproximadamente, 300 pares de bases. Na segunda amplificação, utilizou-se *primers* internos (*Inner-*

primers) biotinilados para a NCR3 e a NCR4 que amplificam um fragmento interno, de, aproximadamente, 235 pares de bases (**tabela 3**).

TABELA 3: Iniciadores utilizados na PCR *nested* do HCV da região 5'-NCR

Iniciadores	seqüência	tamanho
NCR1 (outer)	5'-GTATCTCGAGGCGACACTCCACCATAG-3'	300 pb
NCR2 (outer)	5'-ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGAC-3'	
NCR3 (inner)	5'-CCACCATAGATCTCTCCCCTGT-3'	235 pb
NCR4 (inner)	5'-CACTCTCGAGCACCTATCAGGCAGT-3'	

Fonte: KLETER, 1995 (modificado)

Primeira amplificação - No volume de 5 μ L de cDNA, foram adicionados 45 μ L de *mix* da primeira amplificação (*mix* 1) e amplificados em termociclador, utilizando um ciclo inicial de 1 minuto a 94°C para permitir a desnaturação das moléculas “alvo”, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos. A hibridação dos *primers* biotinilados e os dNTPs com as moléculas de DNA ocorreram quando a reação foi rapidamente resfriada a 55°C. Em seguida, a *Taq*-DNA-polimerase iniciou a polimerização, a 72°C, com a síntese das fitas complementares. A cada bateria de 20 amostras de soro foi intercalado um controle negativo (soro padrão negativo) e 1 de controle positivo (soro padrão positivo).

Preparo do *mix* 1 (45 μ L por amostra)

Tampão <i>Taq</i> -DNA-polimerase 10x, pH 8,4 (s/ MgCl ₂) (GIBCOBRL)	4,5 μ L
dNTPs 10mM (Pharmacia Biotech ou GIBCOBRL)	0,75 μ L
NCR1 (12,5 pmoles/ μ L) (Innogenetics, Bélgica)	1,0 μ L
NCR2 (12,5 pmoles/ μ L) (Innogenetics, Bélgica)	1,0 μ L
Mgcl ₂ (50mM) (GIBCOBRL, EUA)*	2,0 μ L
<i>Taq</i> -DNA-polimerase (5 U/ μ L) (GIBCOBRL)	0,2 μ L ou 1U
Água purificada (DEPC, Sigma) <i>q.s.p.</i>	45,0 μ L

*A concentração final de MgCl₂, 50mM na primeira fase de amplificação foi ajustada entre 1,5-2,0 mM.

Após amplificação, o produto da primeira PCR foi acondicionado a -20°C ou submetido à segunda fase de amplificação (*Nested-PCR*).

Segunda amplificação – *Nested-PCR*. A *nested-PCR* foi realizada, utilizando-se a mesma metodologia empregada na primeira amplificação, empregando-se uma segunda solução de amplificação (*mix 2*).

À solução (*mix 2*), foi acrescentado 3µL da amostra já amplificada, perfazendo um volume de 50µl. Esta mistura foi submetida a *nested-PCR* e o produto amplificado (*amplicon*) foi, a seguir, armazenado a -20 °C para posterior detecção e hibridação.

Preparo do *mix 2* (47µL por amostra)

Tampão <i>Taq</i> -DNA-polimerase 10x, pH 8,4 (s/ MgCl ₂) (GIBCOBRL)	5,0 µL
dNTPs 10mM (Pharmacia Biotech ou GIBCOBRL)	1,0 µL
NCR3 (12,5 pmoles/µL) (Innogenetics, Bélgica)	1,0 µL
NCR4 (12,5 pmoles/µL) (Innogenetics, Bélgica)	1,0 µL
Mgcl ₂ (50mM)*	1,5 -2,0 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase recombinante (5U/µLGIBCOBRL®)	0,2µl ou 1U
Água purificada (DEPC, Sigma) <i>q. s. p</i>	47,0 µL

*A concentração final de MgCl₂ foi ajustada em 1,5 mM

Tanto para a primeira como para a segunda PCR a amplificação foi realizada em tubos apropriados contendo 50µL de *mix*, adicionados de 50µL de RNA extraído ou *amplicon*, em termociclador automático GeneAmp PCR System 9600 da (Perkin-Elmer Cetus, EUA).

Detecção do produto da PCR

Após a PCR, foi realizada a detecção do produto amplificado, através de corrida eletroforética (100Volts/ 20 minutos) em gel de agarose a 1,5%.

Assim, a 5µL da solução contendo os fragmentos de interesse (e a um padrão de peso molecular – Ladder 100 pb DNA – GIBCOBRL, EUA), foram adicionados

2,0µL de tampão de corrida (azul de bromofenol – Sigma ou BioRAD Life Science Research Products, EUA), diluído a 1:10 em água destilada e aplicados em gel de agarose 1,5% (GIBCOBRL em tampão TBE 0,5x [ácido bórico 5,5%, EDTA 0,9%, Tris 10,8% (10x); GIBCOBRL] previamente corado com brometo de etídio 0,5 (µg/mL). Os produtos obtidos foram visualizados, pela ação da luz ultravioleta, como bandas fluorescentes, de 235pb, após excitação das moléculas de brometo de etídio, inseridas randomicamente na seqüência alvo. Tais bandas indicaram a presença dos fragmentos de interesse nas amostras de soro, determinando portanto, a presença do HCV nas mesmas.

PCR de procedência comercial

Para confirmar a ausência da viremia, as 37 amostras reativas para os testes sorológicos de ELISA e *Immunoblot*, mas negativas pela técnica de PCR nested *in house*, foram submetidas a uma segunda PCR, de procedência comercial, o *Amplicor* HCV vs 2.0 da Roche Molecular Systems (Branchburg, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

No teste *Amplicor*, a PCR é realizada em três etapas: extração do RNA, amplificação do cDNA com *primers* biotinilados e detecção dos *amplicons*. Essa técnica utiliza controle interno, de concentração conhecida, que é amplificado junto com o RNA do HCV, para garantir a validade da reação. A detecção do produto amplificado (*amplicon* biotinilado) é realizada por meio de hibridação com *probes* específicas (para o controle e para o RNA do HCV) ligados a microplacas. A revelação da reação é feita por meio de conjugado de avidina marcada com peroxidase que na presença de substrato e cromógeno produz cor quando a amostra é positiva. Após bloqueio da reação enzimática é realizada a leitura espectrofotométrica. Essa técnica utiliza uma enzima, a AmpErase® que destrói o produto amplificado do teste anterior que pode contaminar a reação em curso. A interpretação do resultado é feita de acordo com o manual de instruções do fabricante.

3.3 – ANÁLISE DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS TESTES DE TRIAGEM ANTI-HCV, COM SUBSÍDIOS NOS TESTES SUPLEMENTARES E MOLECULARES

A avaliação dos resultados foi feita tomando-se como referência ou como resultado verdadeiramente positivo as amostras com ELISA e IB positivos. Foi também realizada em relação a PCR que por se tratar de um método que detecta diretamente o material genético do agente em estudo, tem também capacidade diagnóstica. Assim, foram avaliados:

- Concordância do resultado do teste de ELISA entre as duas amostras do mesmo doador, colhida em momentos diferentes;
- Taxa de confirmação pelos testes suplementares, IB e PCR em diferentes perfis de reatividade sorológica;
- Valor preditivo positivo (VPP) - referindo-se à probabilidade de um resultado positivo pertencer a um indivíduo verdadeiramente positivo (neste estudo, ELISA e IB positivos);
- Frequência das bandas em amostras de diferentes perfis de reatividade nos testes realizados;
- Associação da intensidade de reatividade de cada banda com a positividade no IB e na PCR.

3.4 - ESTUDO DE ALGORITMOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HCV

3.4.1 - Índice de reatividade

O índice de reatividade tem sido, recentemente, bastante valorizado no diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) no ELISA.

No presente estudo, o índice de reatividade (IR) foi obtido dividindo-se a DO da amostra pela DO do *cut-off* (DO/CO) e foram estratificados em 6 grupos: $\geq 1 < 2$, $\geq 2 < 3$, $\geq 3 < 4$, $\geq 4 < 5$, $\geq 5 < 6$, ≥ 6 para a análise.

3.4.2 - Algoritmos propostos pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção

Os algoritmos preconizados pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) foram aplicados em 517 amostras positivas ou inconclusivas, sendo um deles empregado, na maioria dos laboratórios, desde a introdução do teste suplementar de IB e foi aqui denominado de algoritmo convencional (algoritmo c). Para interpretação dos resultados, o CDC considera como positivos:

- a) os resultados do ELISA, com relação DO/CO suficientemente elevados, ou seja, $\geq$ IR de corte, a ser estabelecido para cada laboratório e, quando abaixo desse valor, aqueles que forem IB positivos;
- b) todos os resultados de ELISA e de PCR positivos e aqueles cuja PCR for negativa, mas com IB positivo;
- c) todos os resultados positivos pelos testes de ELISA e IB, como preconizado pelo algoritmo convencional.

A análise da concordância foi realizada entre os resultados positivos, os algoritmos estudados e também com as amostras divergentes. Resultados indeterminados pelo IB foram complementados com a realização da PCR, aqui denominado de algoritmo expandido.

3.4.3 - ANÁLISE DO CUSTO ESTIMADO DOS TRÊS ALGORITMOS

A análise do custo estimado foi feita após aplicação dos três algoritmos em 517 amostras, como descritos no item 3.4.2. Para tanto, utilizou-se a Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos (tabela AMB) da Associação Médica Brasileira de 2004, onde os custos de cada teste eram de R\$ 28,57; R\$ 177,50 e R\$ 123,06, respectivamente para ELISA, IB e PCR. A aplicação dessa tabela na amostragem estudada não representa o custo para fins de estabelecimento do preço dos testes, já que para tanto outros fatores são considerados. Trata-se apenas de exemplo para obtenção de um parâmetro de comparação entre os três algoritmos. O custo da PCR seria consideravelmente menor se a técnica utilizada fosse a metodologia *in house*, porém esta técnica é altamente complexa, com múltiplas etapas e não é adequada para uso em rotina diagnóstica.

O custo foi também estimado para os três algoritmos expandidos.

3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística, dos resultados dos testes aqui estudados, foi realizada empregando-se para comparação de proporções o teste de *qui-quadrado* e de Goodman (análise entre multinomiais). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ (ZAR, 1999; GOODMAN, 1964; GOODMAN, 1965).

RESULTADOS

FIGURA 6 - Resultados dos testes sorológicos ELISA-R , teste suplementar IB e molecular PCR em 692 amostras que tiveram resultados positivos ou inconclusivos no ELISA-T, na ocasião da doação de sangue e que retornaram à instituição para confirmação do diagnóstico da infecção pelo HCV.

4 - RESULTADOS

Foram analisadas 692 amostras de soro de doadores, que no ato da doação de sangue foram ELISA-T positivas (522) ou inconclusivas (170) para o anti-HCV. Esses doadores voltaram à FPS/HSP para a coleta de nova amostra de sangue para a repetição da sorologia, onde foram realizados ELISA-R, IB e RNA para HCV. Os resultados gerais estão apresentados na **figura 6**.

Todos os resultados de amostras sorologicamente positivas, porém negativas na PCR *in house*, foram repetidas por uma PCR comercial. Dentre as 37 amostras nessas condições, 6 (16,2%) foram positivas somente na PCR comercial e foram aqui consideradas positivas para RNA do HCV, assim como as que foram positivas pela PCR *in house*.

4.1 - REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ELISAS (ELISA-T E ELISA-R) REALIZADOS EM DUAS AMOSTRAS DO MESMO DOADOR E ANÁLISE DOS RESULTADOS EM RELAÇÃO AO IB E PCR

4.1.1 - Análise das 692 amostras com resultados positivos ou inconclusivos no ELISA-T, frente aos resultados do ELISA-R

Dos 692 doadores, que no anti-HCV pelo ELISA-T foram positivos ou inconclusivos, 64,5% (446/692) tiveram seus resultados de ELISA-R reproduzidos, sendo de 77,6% (405/522) entre as amostras positivas e 24,1% (41/170) entre as inconclusivas.

Resultados não concordantes entre ELISA-T e ELISA-R foram encontrados em 35,5% (246/692) das amostras, sendo: 25,3% (175/692) de soros inicialmente positivos ou inconclusivos no ELISA-T, cujos resultados no ELISA-R foram negativos. Nessas, o IB não foi realizado assumindo que essas amostras seriam também IB negativas, uma vez que ambos os testes utilizam as mesmas frações antigênicas do HCV. Os demais soros foram aqueles positivos no ELISA-T e que se tornaram inconclusivos no ELISA-R (5,6%) e vice-versa (4,6%).

Para os bancos de sangue, ELISA positivos ou inconclusivos são considerados igualmente reagentes e as bolsas de sangue descartadas. Dentre as

692 doadores nessas condições, os resultados da segunda amostra (ELISA-R) demonstraram que apenas 41,2% (285/692) desses doadores eram verdadeiros positivos sorológicos (ELISA e IB positivos) e 36,0% (249/692) virêmicos, portanto as demais seriam, hipoteticamente, sem potencial de transmissão do HCV.

Em um total de 517 amostras cujos resultados foram positivos ou inconclusivos no ELISA-R, o IB confirmou como sendo positivos 55,1% (285/517), indeterminados 27,3% (141/517) e negativos 17,6% (91/517). A PCR foi positiva em 48,2% (249/517).

4.1.2 - Valor preditivo positivo de resultados do ELISA-T e ELISA-R em diferentes associações

A associação entre os resultados do ELISA-T e ELISA-R e a positividade no IB e PCR podem ser observadas na **tabela A1** – anexos. O valor preditivo positivo foi calculado, baseado nas taxas de IB positivos, nas diferentes associações.

O VPP, mesmo positivo em dois ELISAS (ELISA-T, ELISA-R), foi baixo, sendo de 69,9%. Este valor preditivo cai para 6,2% se um dos resultados da associação for inconclusivo.

4.1.3 – Análise dos 522 resultados positivos no ELISA-T

O ELISA-R, realizado nas 522 amostras que foram positivas no ELISA-T, foi analisado com subsídios nos resultados do IB e positividade na PCR (**tabela 4**).

TABELA 4: Análise de 522 amostras com resultados positivos no ELISA-T baseado nos resultados do ELISA-R, IB e PCR(+).

ELISA-T	ELISA-R	n (%)		IB (%)	PCR (%)
Positivo	Positivo	405 (77,6)	Pos	282 (69,6)	247 (87,6)
			Ind	78 (19,3)	1 (1,3)
			Neg	45 (11,1)	0
Positivo	Inconclusivo	39 (7,5)	Pos	0 (0,0)	0
			Ind	27 (69,2)	0
			Neg	12 (30,8)	0
Positivo	Negativo	78 (14,9)		NR	0

NR – não realizado

Nas 282 amostras IB positivas, a PCR foi positiva em 87,6% (247/282). As 12,4% (35/282) amostras positivas pelo IB foram negativas na PCR e podem representar infecção pregressa pelo HCV com eliminação viral.

Nas 78 indeterminadas, uma (1,3%) amostra foi positiva pela PCR (amostra 2699) e em 11% (45/405) das amostras, apesar de dois ELISAs positivos resultaram IB negativos com PCR também negativas, sugerindo tratar-se de uma reação falso-positiva nos ELISAs.

4.1.4 – Análise dos resultados inconclusivos no ELISA-T

O ELISA-R realizado nas 170 amostras que foram inconclusivas no ELISA-T, foram analisados com subsídios nos resultados do IB e positividade na PCR (**tabela 5**).

TABELA 5: Análise das 170 amostras com resultados inconclusivos no ELISA-T baseada nos resultados de ELISA-R, IB e PCR+.

ELISA-T	ELISA-R	n (%)		IB (%)	PCR (%)
Inconclusivo	Positivo	32 (18,8)	Pos	2 (6,3)	0
			Ind	14 (43,8)	0
			Neg	16 (50)	0
Inconclusivo	Inconclusivo	41 (24,1)	Pos	1 (2,4)	0
			Ind	22 (53,7)	1 (2,4)
			Neg	18 (43,9)	0
Inconclusivo	Negativo	97 (57,1)		NR	0

NR – IB não realizado por Ter sido negativo no ELISA-R

4.2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES BANDAS REATIVAS NO IB ANTI-HCV E A POSITIVIDADE SOROLÓGICA E MOLECULAR

4.2.1 – Associação entre a frequência das bandas individuais e a positividade no IB e PCR nas amostras sorologicamente positivas com ou sem viremia

Para se verificar a possível associação entre a presença de bandas específicas no IB anti-HCV e a positividade nos testes aqui realizados, analisou-se, inicialmente, a frequência com que elas foram detectadas nos grupos de:

- a) amostras positivas ao PCR
- b) amostras IB positivas
- c) amostras IB indeterminadas
- d) amostras sorologicamente positivas e também RNA do HCV positivas
- e) amostras sorologicamente positivas e RNA do HCV negativas

Observou-se uma maior frequência de reatividade para as bandas C1C2, C3C4 e NS3, em todos os cinco grupos estudados. (tabela 6).

TABELA 6: Frequência das frações antigênicas no IB em grupos de amostras positivas no IB, na PCR e em amostras sorologicamente positivas com ou sem viremia.

Frações antigênicas	a) PCR+ n=249	b) IB+ n=285	c) IB IND n=141	d) ELISA-R+ / IB+ / PCR+ n=247	e) ELISA-R+ / IB+ / PCR – n=37
C1C2 (%)	242 (97,2)	278 (97,5)	48 (34,0)	242 (98,0) ^a	35 (95,0) ^b
C3C4 (%)	241 (96,8)	275 (96,5)	25 (17,7)	241 (97,6) ^c	33 (89,2) ^d
E2NS1 (%)	176 (70,7)	187 (65,6)	11 (7,8)	176 (71,3)^e	11 (29,7)^f
NS3 (%)	234 (94,0)	261 (91,6)	67 (47,5)	232 (93,9)^g	29 (78,4)^h
NS4 (%)	211 (84,7)	236 (82,8)	9 (6,4)	210 (85,0)ⁱ	25 (67,6)^j
NS5 (%)	127 (51,0)	138 (48,4)	7 (5,0)	126 (51,0)^k	12 (32,4)^L

Teste de proporção de Goodman – análise entre multinomiais; $G_{(crítico)}=1,96$

$p<0,05$: e versus f; g versus h; i versus j; k versus L

As bandas C1C2, C3C4 e a NS3 foram as mais freqüentes em todos os grupos estudados e as bandas E2NS1, NS3, NS4 e a NS5 eram significativamente mais freqüentes nos indivíduos sorologicamente positivos e virêmicos.

4.2.2 – Associação entre intensidade de cor de cada banda do IB anti-HCV e a positividade ao IB e PCR

A reatividade de cada fração antigênica traduzida pela intensidade de cor da banda individual no IB também foi analisada em relação ao resultado positivo de IB e PCR. Para tanto, dividiu-se o total de amostras que apresentou reatividade para qualquer banda, em 2 grupos: a) intensidade até 2 cruzes; b) intensidade 3 a 4 cruzes (tabela 7).

TABELA 7: Associação entre intensidade de cor de cada banda no IB anti-HCV e a positividade ao IB e PCR, em 517 amostras.

Bandas	IB + (%)		PCR + (%)	
	Até 2 cruces	3 ou 4 cruces	Até 2 cruces	3 ou 4 cruces
C1C2	105 (37,77) _a	173 (62,23)_b	81 (33,47) _m	161 (66,53)_n
C3C4	149 (54,18) _c	126 (45,82) _d	119 (49,38) _o	122 (50,62) _p
E2NS1	159 (85,03)_e	28 (14,97)_f	148 (84,09)_q	28 (15,91)_r
NS3	102 (39,08) _g	159 (60,92)_h	78 (33,33) _s	156 (66,67)_t
NS4	116 (49,15) _i	120 (50,85) _j	94 (44,55) _u	117 (55,45)_v
NS5	71 (51,45) _k	67 (48,55) _l	60 (47,24) _x	67 (52,76) _y

Teste de proporção de Goodman – análise entre multinomias; $G_{(crítico)} = 1,96$

$p < 0,05$ a versus b g versus h q versus r u versus v
 e versus f m versus n s versus t

4.3 – AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DO *IMMUNOBLOT* ANTI-HCV, ATRAVÉS DE 2 CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO, COM A PCR

A interpretação dos resultados do *immunoblot* tem sido realizada de diferentes formas de acordo com os fabricantes como também em diversos trabalhos da literatura (BOSSI, 2004). Assim, avaliou-se os dois critérios: o recomendado pelos fabricantes (**A**) e o alternativo (**B**) (tabela 8).

TABELA 8: Critérios de interpretação do IB e associação dos resultados obtidos com a PCR, em 517 amostras. Critério – A (fabricantes) e B (alternativo).

CRITÉRIOS	IB POS	PCR POS EM IB POS	IB IND	PCR NEG EM IB IND
A	67,5% (349/517)	71,3% (249/349)	14,9% (77/517)	100% (77/77)
B	55,1% (285/517)	86,7% (247/285)	27,3% (141/517)	98,6% (139/141)

4.4 – ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE REATIVIDADE (IR) DO ELISA-R E A POSITIVIDADE DO IB E PCR

Um total de 495 amostras, reativas no teste de ELISA-R com $IR \geq 1$, foi estratificado em 6 grupos: $\geq 1 < 2$; $\geq 2 < 3$; $\geq 3 < 4$; $\geq 4 < 5$; $\geq 5 < 6$ e ≥ 6 . A frequência de positivos no IB, na PCR e em ambos, está representada na **tabela 9**.

TABELA 9: Associação do índice de reatividade (IR) do ELISA-R, estratificados em 6 grupos e a frequência dos resultados positivos no IB, na PCR e em ambos. Análise realizada em 495 amostras.

ELISA-R / IR	IB +		PCR +		IB e PCR +	
$\geq 1 < 2$ (164)	4,9%	(8/164)	0,6%	(1/164)	0,0%	(0/164)
$\geq 2 < 3$ (29)	13,8%	(4/29)	0,0%	(0/29)	0,0%	(0/29)
$\geq 3 < 4$ (22)	36,4%	(8/22)	13,6%	(3/22)	13,6%	(3/22)
$\geq 4 < 5$ (29)	65,5%	(19/29)	51,7%	(15/29)	48,3%	(14/29)
$\geq 5 < 6$ (13)	76,9%	(10/13)	46,2%	(6/13)	46,2%	(6/13)
≥ 6 (238)	99,2%	(236/238)	94,1%	(224/238)	94,1%	(224/238)

Para IR igual ou maior a 4,0, aproximadamente 50% das amostras positivas pelo ELISA foram também positivas para o IB e PCR. Para IR igual ou maior a 6,0, praticamente todos (99,2%) os soros foram positivos pelo IB. A PCR foi positiva em 94,1%.

No grupo de amostras $IR \geq 6,0$, dois soros foram IB indeterminados e PCR negativas (amostra 86 e 2268).

4.5 – APLICAÇÃO DE TRÊS ALGORITMOS PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HCV, ANÁLISE DO DESEMPENHO E CUSTO ESTIMADO

Recentemente, o CDC (2003) propôs dois novos algoritmos alternativos (*a* e *b*) para o diagnóstico da infecção pelo HCV. Assim, um estudo comparativo desses com o convencional (*c*) foi realizado em 517 soros ELISA-R positivos ou inconclusivos (**figura 7**).

Figura 7 - Algoritmo a, b, e c para diagnóstico da infecção do HCV aplicados em 517 amostras positivas/inconclusivas pelo ELISA

- algoritmo **a** - Utilizando-se os dados obtidos no estudo anterior, onde se determinou como sendo o $IR \geq 6,0$ aquele adequado como IR de corte para o ELISA aqui empregado, e aplicando-se os critérios propostos pelo CDC, obteve-se 287 resultados positivos. Esses foram constituídos de 238 resultados com $IR \geq 6$ e 49 com $IR < 6,0$, com IB positivos, do total de 279 amostras. Resultados negativos foram obtidos em 91 amostras e indeterminados em 139. Assim, esse algoritmo definiu o diagnóstico sorológico (positivo ou negativo) em 73,1% (378/517) das amostras, com 26,9% (139/517) de resultados indefinidos (IB indeterminados). A concordância entre os resultados positivos por este algoritmo e o convencional (**c**) foi de 99,3% (285/287).
- algoritmo **b** - 287 resultados positivos constituídos de 249 amostras PCR positivas e 38 PCR negativas, porém IB positivos. Resultados negativos foram obtidos em 91 amostras e indeterminados em 139. Assim, esse algoritmo definiu o diagnóstico sorológico ou molecular (positivo ou negativo) em 73,1% (378/517) das amostras. Apesar de 26,9% (139/517) das amostras serem indeterminadas por IB, estas já possuíam diagnósticos moleculares definidos como sendo negativos pela PCR o que permite excluir a infecção ativa. A concordância com o algoritmo **c** foi de 99,3% (285/287).
- algoritmo **c** - 285 resultados positivos, 91 negativos e 141 indeterminados. Esse algoritmo definiu o diagnóstico sorológico (positivo ou negativo) em 72,7% (376/517), ou seja, não definiu o diagnóstico em 27,3% (141/517) dos casos.

Estes dados demonstraram a estreita correlação entre os resultados dos três algoritmos (**a**=287; **b**=287; **c**=285) .

Um total de 283 amostras foram positivas pelos três algoritmos.

Duas amostras positivas somente pelo algoritmo **a** (2268 e 86) ($IR \geq 6$) e duas somente pelo algoritmo **b**, (1992 e 2699), que foram indeterminadas no algoritmo convencional (**c**), podem ser observadas na **tabela 10** que apresenta mais dados e as hipóteses de interpretação clínica.

TABELA 10: Dados adicionais das amostras positivas no algoritmo *a* ou no *b*, porém indeterminadas no *c*.

Amostras	2268	86	2699	1992*
Data da doação	22/09/1998	19/12/1997	11/07/1997	01/08/1998
Data do retorno	19/10/1998	14/01/1998	04/09/1997	01/09/1998
IR do ELISA/T	4,1	6,8	1,6	1,0
IR do ELISA/R	7,0	8,6	4,3	0,97
IB	IND NS3(3+)	IND C1C2,E2NS1, NS4 e NS5 (+)	IND NS3 (3+)	IND NS3, NS5 (+) e NS4 (2+)
PCR	NEG	NEG	POS	POS
Resultados dos algoritmos	a) POS b) IND c) IND	a) POS b) IND c) IND	a) IND b) POS c) IND	a) IND b) POS c) IND
Interpretação hipotética	eliminação viral e início de sororreversão? falso positivo?	eliminação viral e início de sororreversão? falso positivo?	soroconversão	Baixa reatividade do kit ELISA*

* Esta amostra foi repetida por ELISA de outra procedência (Murex - Abbott) com resultados positivos ($IR > 4,0$); genotipagem por seqüenciamento = genótipo 1

4.7 - CUSTO – BENEFÍCIO DOS TRÊS ALGORITMOS

A estimativa de custo, para a população estudada, aplicando-se os preços constantes na tabela AMB, para os testes utilizados em cada algoritmo.

No algoritmo **a** foram realizados: 279 IB para amostras DO/CO < 6, com custo de R\$ 64.293,19 ; algoritmo **b**: foram realizados 517 PCR e 268 IB para as amostras PCR negativas, com o custo R\$ 125.962,71; algoritmo **c** foram realizados 517 IB com custo de R\$ 106.538,19 (**tabela 11**).

TABELA 11: Estimativa de custo dos testes de triagem anti-HCV ELISA e de testes suplementar e molecular aplicados nos algoritmos *a*, *b* e *c*.

TESTES	ALGORITMO <i>a</i>		ALGORITMO <i>b</i>		ALGORITMO <i>c</i>	
	n	R\$	n	R\$	n	R\$
ELISA (R\$ 28,57)	517	14.770,69	517	14.770,69	517	14.770,69
IB (R\$ 177,50)	279	49.522,50	268	47.570,00	517	91.767,50
PCR (R\$ 123,06)	—	—	517	63.622,02	—	—
Preço total (R\$)		64.293,19		125.962,71		106.538,19
Preço unitário (R\$)		124,36		243,64		206,07

Apesar dos três algoritmos preconizados pelo CDC mostrarem ser válidos para a utilização no diagnóstico da infecção pelo HCV, uma parcela de amostras não tiveram o seu diagnóstico estabelecido. Essas amostras, 139 do algoritmo *a* e 141 do algoritmo *c*, eram aquelas IB indeterminadas e que teriam que ser elucidadas para fins clínicos. Para tanto realizou-se a PCR (aqui denominado de algoritmo expandido), que permitiu a detecção de duas amostras positivas que eram comuns aos dois algoritmos. O custo estimado dos algoritmos expandidos pode ser observado na **tabela 12**.

TABELA 12: Custo estimado do algoritmo expandido (PCR realizado em IB indeterminados pelo algoritmo *a* e *c*).

	ALGORITMO <i>a</i>	ALGORITMO <i>b</i>	ALGORITMO <i>c</i>
Custo do algoritmo anterior (tabela 11)	64.293,19	125.962,71	106.538,19
PCR realizados	139	—	141
Custo da PCR (R\$123,06 cada)	17.105,34	—	17.351,46
Custo total (R\$)	81.398,53	125.962,71	123.889,65
Custo unitário (R\$)	157,44	243,64	239,63

A complementação do algoritmo com a realização da PCR, tornou o custo do algoritmo **a** 26,6% maior, entretanto este algoritmo é ainda o de menor custo, sendo 34,3% menor do que o **c** . Para o algoritmo **c** o acréscimo foi de 16,3%. O algoritmo **b** não necessitou de complementação já que a PCR fazia parte desse algoritmo. O custo deste algoritmo foi de apenas 1,7% maior do que **c**, com a vantagem de ter detectado, dentro do critério do CDC, duas amostras positivas que só foram também positivas no **a** e no **c** após complementação desses algoritmos com a PCR.

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Após a descoberta do HCV, medidas universais foram implementadas para o controle desta infecção, como triagem de anti-HCV por técnicas de imunoensaios (ELISA), em doadores de sangue. Apesar da grande evolução nos testes de ELISA, ainda é observada uma parcela importante de resultados falsos-positivos. Portanto, estratégias para confirmação deste resultado são necessárias para garantir o diagnóstico verdadeiro e definir melhor o seu significado.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os testes anti-HCV nas condições reais de uso, com subsídios nos resultados de testes suplementares e moleculares e avaliar as diferentes formas de interpretação desses resultados, assim como de algoritmos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCV.

O presente estudo demonstrou que de uma forma geral, os resultados do ELISA foram pouco reprodutíveis quando os testes foram realizados em duas amostras do mesmo doador e verificou-se também uma baixa taxa de confirmação dos resultados positivos nos testes suplementares.

A causa mais importante das divergências entre os resultados de diferentes laboratórios, o que não é raro, é devido à procedência dos reagentes onde se verifica o emprego de antígenos obtidos por tecnologias diferentes, como a natureza imunoquímica (antígenos recombinados ou peptídeos sintéticos), a região genômica que derivam estes antígenos, o grau de reatividade e o uso de metodologias e tecnologias diferentes de diagnóstico.

Outros fatores, externos aos reagentes, podem afetar a eficiência diagnóstica de um teste como, por exemplo, as condições de armazenamento e de transporte, estabilidade e a diferença de reatividade entre os lotes. Incluem-se ainda, instalações físicas, assim como rede elétrica, qualidade da água, temperatura ambiente, limpeza do material e vidrarias e de calibração sistemática de equipamentos e vidrarias.

A eficiência diagnóstica de um teste sorológico é bastante influenciada por características da população, como a genética do hospedeiro e memória sorológica à outros agentes. Dessa forma, a população estudada geneticamente bastante heterogênea e em geral exposta a múltiplas infecções, pode apresentar resposta imune variada e maior frequência de resultados sorológicos inespecíficos. O valor preditivo positivo (VPP) de população de baixo risco de infecção, como os doadores

de sangue é muito baixo, exigindo para um bom desempenho diagnóstico, um teste de alta sensibilidade e especificidade.

A cepa do vírus predominante na região também constitui um fator de variação na reatividade do teste, já que os testes comerciais são produzidos baseados nas proteínas do genótipo 1a e a existência de infecções pelo HCV do genótipo diferente de 1, pode acarretar baixa reatividade. A alta prevalência, no nosso meio, do genótipo 3a pode prejudicar a sensibilidade destes testes, pois anticorpos contra este genótipo mostraram ser pouco reativos, quando ensaiados com antígenos dos genótipos 1a (BASSIT *et al.*, 1999; FARCI *et al.*, 2000).

A soma destes fatores que interferem de forma não identificável no desempenho diagnóstico dos testes torna a avaliação inicial feita em condições ideais pouco representativa quando utilizados nas condições de rotina. Essa avaliação deve ser feita em um estudo de grande porte para que o resultado não seja viciado por problemas pontuais do momento ou particulares daquele laboratório.

Reprodutibilidade do ELISA anti-HCV quando aplicados em duas amostras de um mesmo doador - Repetição do ELISA anti-HCV em uma segunda amostra do doador positivo/inconclusivo na ocasião da triagem constitui um procedimento de rotina adotado na maioria dos bancos de sangue e visa confirmar tanto a autenticidade da amostra como do resultado do teste.

No presente estudo, apesar do *kit* reagente ser da mesma procedência e ambos serem de terceira geração, a **reprodutibilidade** do resultado do ELISA em amostras do mesmo doador, ou seja, a frequência de resultados concordantes no ELISA-T e ELISA-R foram muito baixas, sendo de 64,5% (446/692). Entre as amostras positivas no ELISA-T, ELISA-R foi também positivo em 77,6% (405/522) das amostras e entre as amostras inconclusivas, somente 24,1% (41/170) foi confirmado na repetição

Testes suplementares de IB realizados nas amostras positivas e inconclusivas pelo ELISA-R e PCR realizados em todas as 692 amostras de retorno mostraram que, daqueles doadores cujas bolsas de sangue foram descartadas devido ao ELISA-T positivo, somente 41,2% (285/692) eram sorologicamente positivos e 36,0% (249/692) virêmicos.

Esses dados mostram que mais da metade dos resultados, ELISA positivos/inconclusivos, na triagem são falsos e que cerca de 2/3 dos doadores não apresentam viremia, sendo hipoteticamente sem potencial de transmissão do HCV.

Mesmo entre as amostras com resultados positivos, tanto na triagem como no retorno, essas taxas ainda foram muito baixas, sendo de 54,0% (282/522) para os positivos sorológicos e a presença de viremia em 47,5%.

Essa baixa reprodutibilidade, provavelmente, decorre da insuficiente precisão dos testes anti-HCV. A sensibilidade e a especificidade também não podem ser ainda consideradas ideais, pela dificuldade na obtenção de antígenos mais reativos e específicos e podem não ser capaz de discriminar eficientemente sinais oriundos de interações específicas do ruído proveniente das interações inespecíficas ou de interferentes, tornando os seus resultados mais susceptíveis as oscilações. Assim, a alta frequência de reações inespecíficas, geralmente observadas nos resultados próximos aos valores de *cut-off*, principalmente na população de baixo risco, podem contribuir para comprometer a reprodutibilidade por fornecer resultados ora considerados positivos, ora negativos. De fato, a concordância de resultados indeterminados entre os dois ELISAs foi muito baixa, sendo de 24,1% (BARRETO *et al.*, 2003a).

Assim, apesar da alta especificidade serem relatadas na literatura, quando um teste é aplicado “em campo” e, sobretudo na população de baixo risco, vários fatores de difícil identificação podem influenciar um resultado sorológico, tornando o seu desempenho diagnóstico e a reprodutibilidade menor do que o encontrado na literatura.

A alta sensibilidade exigida para os testes de triagem, visando evitar os resultados falsos negativos, que são erros de maior gravidade para a seleção de doadores de sangue, por outro lado, pode prejudicar a especificidade. Assim, todas as amostras positivas nos testes de triagem precisam ser submetidas ao testes suplementares, mais específicos, que no algoritmo de referência (ou convencional) consiste no uso de IB. Entretanto, a preferência pelo uso dos testes moleculares, como testes suplementares, vem sendo cada vez mais observada entre os laboratórios.

Avaliação dos resultados do ELISA-T e ELISA-R por meio de testes suplementares – mostrou que entre as amostras positivas nos dois ELISAs (ELISA-T e ELISA-R), o IB confirmou positivo em 69,6% (282/405) (denominados, aqui, como sorologicamente positivos) ao passo que a PCR confirmou viremia em 61,0% (247/405). Essa diferença na positividade do IB e PCR (35 amostras ou 12,4%) corresponde, provavelmente, aos anticorpos de memória, de doadores que tiveram a infecção por HCV no passado e que eliminaram espontaneamente o vírus.

Entretanto, para se considerar a infecção pelo HCV como resolvida, o resultado negativo de RNA-HCV deve ser demonstrado por mais de uma vez. Alguns pacientes podem apresentar uma viremia intermitente com as flutuações decorrentes da resposta imunológica do hospedeiro, bem como da meia vida muito curta do HCV, de 1,5 – 4,6 horas (CDC, 2003; NIH, 2002; LUTCHMAN *et al.*, 2003).

Deve-se, ainda, considerar a possibilidade do nível de viremia ser inferior ao limiar de detecção do teste molecular empregado. Para garantir a detecção do RNA do HCV nessas amostras, ou seja, para garantir uma elevada sensibilidade da PCR, kit comercial de sensibilidade ao redor de 50 UI/mL (aproximadamente, 135cp/mL) (PAWLOTSKY, 2002) foi realizada naquelas amostras sorologicamente positivas e PCR *in house* negativas. A PCR *in house* utilizada, nesse trabalho, foi aquela que vem sendo utilizada na FPS/HSP, com sensibilidade ao redor de 1000 cópias/mL, aferida por meio de soros padrões diluídos em série, provenientes do *Viral Quality Control* (VQC, Netherlands).

A resolução natural da infecção pelo HCV pode ocorrer tanto em doentes crônicos como também em indivíduos assintomáticos, em uma taxa de 0,5%/ano/paciente (WATANABE *et al.*, 2003). O seguimento de pacientes com hepatite C crônica, por cerca de 7 anos demonstrou que 3,7% deles eliminaram o vírus. O mecanismo de eliminação viral é pouco conhecido e tem sido atribuído à diversidade genética do HCV, com inúmeras cepas que formam a *quasispecies* e a presença de anticorpos neutralizantes contra a proteína E2 (BUSCH, 2001). Sabe-se também que a perda dos anticorpos não ocorre com a mesma rapidez em todos os pacientes que sororrevertem e que o RNA viral mesmo não sendo detectado no sangue, por estar em níveis muito baixos, o HCV pode estar replicando no fígado ou em algum reservatório extra-hepático, como encontrado por LEFRÈRE *et al.*, (2004).

Entre as amostras ELISA-T e ELISA-R positivas, 11,1% (45/405) foram negativas no IB e na PCR. Essa taxa, provavelmente, corresponde aos resultados

falsos-positivos encontrados nos dois ELISAs, que sendo de mesma procedência fornecia o mesmo resultado em consequência da reatividade inespecífica ao mesmo antígeno.

Outros autores também relataram essa alta taxa de falsos-positivos no ELISA em duas ocasiões distintas. (VAN DER POEL, *et al.*, 1991; GRETCH, 1995; CDC, 1998).

Em 7,5% (39/522) das amostras **ELISA-T positivo e ELISA-R inconclusivo**, nenhum IB foi positivo, sendo indeterminados em 69% (27/39) e negativos em 31% (12/39). Todas as amostras desse grupo foram PCR negativas. A probabilidade de o resultado ser falso-positivo para o teste de ELISA, é muito alta, porém não se pode descartar a possibilidade desses soros pertencerem a um indivíduo que tenha se infectado no passado e em processo de sororreversão, com títulos de ELISA em declínio e IB indeterminado ou negativo.

Das 14,9% (78/522) amostras, **ELISA-T positivas e ELISA-R negativas**, todas foram PCR negativas, sendo portanto, interpretadas como ELISA-T falso positivo. Este perfil de reatividade já foi descrito na literatura e denominado de falso positivo biológico (KIELY *et al.*, 2004).

O **valor preditivo positivo (VPP)** sendo diretamente proporcional a prevalência da infecção na população, em populações de baixo risco para anticorpos anti-HCV, como o doador de sangue, um resultado positivo apresenta um VPP baixo (GALEN, GAMBINO, 1975).

A população aqui estudada era composta de doadores já selecionados, por ter sido ELISA-T positivo ou inconclusivo e portanto, com alta prevalência da infecção. Assim, esperava-se um VPP elevado, com grande probabilidade de corresponder ao verdadeiro positivo. Entretanto, observou-se um baixo VPP (69,6%), até mesmo em amostras positivas nos dois ELISAs. Provavelmente, a baixa especificidade dos testes ELISA produziu resultados positivos inespecíficos, não confirmados por um teste mais específico, prejudicando o VPP.

Nas amostras ELISA-R negativas, o IB não foi realizado por assumir que, sendo ambos os testes baseados nos mesmos antígenos, a negatividade no ELISA também poderia ser inferida para o IB. Além disso, nenhuma PCR positiva foi

observada nessas amostras levando a sugerir fortemente de que os resultados do ELISA-R negativos fossem verdadeiros, ou seja, ELISA-T falso positivo.

Essa negatificação na segunda amostra (ELISA-R) ocorreu em 15,0% (78/522) entre os positivos na triagem e em 57,1% (97/170) entre os inconclusivos, demonstrando que, provavelmente, a reatividade dessas amostras era muito próxima a do *cut-off* no ELISA-T.

Análise das 170 amostras inconclusivas na triagem - Das 170 amostras inconclusivas no ELISA-T, 18,8% (32/170), foram positivas no ELISA-R, 24,1% (41/170), inconclusivas e 57,1% (97/170), negativas. Entretanto, no total de amostras, somente 1,8% (3/170) dos soros foram positivos no IB e 0,6% (1/170) na PCR. Essa baixa taxa de confirmação sorológica e molecular demonstra que o ELISA com DO próxima ao *cut-off*, raramente é um verdadeiro positivo, principalmente em populações de baixo risco para a infecção pelo HCV.

Análise das frações antigênicas em amostras de diferentes reatividades - A análise das frações antigênicas foi realizada dividindo-se as amostras em diferentes grupos de acordo com o perfil de reatividade:

a) Grupo de amostras PCR positivas - a fração antigênica mais freqüentemente encontrada nesse grupo foi a C1C2 (97,2%), seguida pela C3C4 (96,8%). Para as demais frações, NS3, NS4, E2NS1 e NS5, a taxa de positividade foi respectivamente 94%, 85%, 70,7% e 51%. Resultados semelhantes foram obtidos por BOSSI *et al.*, 2004, que encontrou uma alta freqüência de anti-core positivas (97,1%) nas amostras PCR positivas

b) Grupo de amostras IB positivas - as freqüências das bandas antigênicas foram muito semelhantes às encontradas no grupo de soros PCR positivos.

c) Grupo de amostras com resultados indeterminados - a maior freqüência foi de NS3 (47,5%), seguida de C1C2 (34%), C3C4 (17,7%). Alta freqüência do NS3 e C1C2 mostra que apesar da associação com PCR e IB positivos não apresentam a especificidade desejada já que essas são as frações mais freqüentes também no grupo de indeterminados, onde muitos soros não são verdadeiros positivos.

Este padrão de resultado indeterminado com predomínio de reatividade para NS3 e core também foi encontrado por PAWLOTSKY *et al.*, 1996.

Dentre este grupo, uma amostra (2699) (**tabela 10**), foi IB indeterminada com a presença da NS3 e PCR positiva pelas duas metodologias empregadas, mostrando que realmente esta fração antigênica possa estar associada à fase inicial da infecção (SCHRÖTER *et al.*, 2001). COUROUCE *et al.*, em 1995, utilizando painéis de soroconversão e amostras de pacientes infectados, obtiveram 19% de reatividade para apenas uma banda no IB, sendo ela a NS3 ou core e todas PCR positivas.

d) Grupo de amostras sorologicamente positivas com viremia (ELISA, IB e PCR positivas)

e) Grupo de amostras sorologicamente positivas sem viremia (ELISA e IB positivos com a PCR negativa)

Verificou-se que nos grupos **d** e **e** as frações do core foram as mais freqüentes, com distribuição bastante semelhante entre si, mostrando que a sua presença, provavelmente, é constante durante todo o curso da infecção. As demais frações foram significativamente mais freqüentes em amostras com viremia (BARRETO *et al.*, 2004a).

Associação entre a intensidade de reação de cada banda antigênica e a positividade ao IB e PCR - As frações antigênicas, **C1C2** e **NS3**, com intensidade de 3 cruces ou mais, tiveram associação significativa com a positividade do IB. Já a **E2NS1**, essa associação foi inversa sendo aquelas menores que 2 cruces as mais freqüentes e as mais associadas ao IB.

Em relação à PCR, as frações antigênicas **C1C2**, **NS3** e **NS4** de intensidade de 3 cruces ou mais apresentaram maior associação com a viremia. A E2NS1 apresentou, também com a PCR, uma relação inversa, ou seja, quando a intensidade foi até duas cruces, observou-se uma alta proporção de resultados positivos.

A maior associação da E2NS1 de menor reatividade aos positivos na PCR e IB, ao nosso ver, pode estar relacionada ao baixo nível de anticorpos neutralizantes, anti-E2NS1, o que permitiria aumento da replicação viral e resposta imunológica. Entretanto essa hipótese, deve ser confirmada em maior número de pacientes com seguimento clínico e laboratorial (ISHII *et al.*, 1998).

Critério de interpretação das bandas do IB - Os positivos pelo critério **A** mostraram menor associação com a positividade na PCR em relação ao **B** e os indeterminados por esse critério foram todos negativos pela PCR. Apesar do critério **B** ter uma maior taxa de confirmação dos resultados positivos pelo IB, foram encontradas dentre os indeterminados, amostras com viremia (BARRETO *et al.*, 2004b).

Assim, o critério **A** confere maior sensibilidade ao IB e maior valor preditivo negativo. O critério **B** apresenta maior especificidade e maior valor preditivo positivo.

A escolha de um ou outro critério depende do interesse de cada laboratório, considerando-se as características acima e também que muitos dos resultados indeterminados podem pertencer aos indivíduos em sororreversão, que sendo PCR negativas, a única forma de diagnóstico seria o acompanhamento sorológico dos pacientes

Índice de reatividade - A análise dos resultados de ELISA em doadores de sangue demonstrou que nas amostras positivas, o índice de reatividade (IR) poderia ser utilizado como um teste suplementar, preditivo para os resultados positivos.

Um estudo realizado pelo CDC utilizando testes ELISA 2,0 (ABBOTT) e 3,0 (ORTHO) e quimioluminescência 3,0, todos licenciados pelo FDA, e envolvendo populações de baixo e alto risco, demonstrou que o IR maior ou igual a 3,8 estava correlacionado com a positividade no IB em mais de 95% dos casos, independente da prevalência do anti-HCV na população, enquanto que a correlação com a PCR foi de 80,2% e 91,5%, respectivamente, para população de baixo e alto risco (CDC, 2003)

No presente trabalho, em doadores de sangue, utilizando-se também *kits* de terceira geração, mostrou-se que as amostras com IR maior ou igual a 6,0 concordavam com o IB positivo em 99,2% e com a PCR positiva em 94,1%.

BOSSI *et al.*, 2004, analisando 888 amostras provenientes de um hospital especializado em doenças infecciosas, também utilizou o IR obtidos por MEIA (ABBOTT). Nesse estudo, as amostras com IR > 50 no MEIA tiveram uma correlação de 99,4% com IB e 93,6% com a PCR.

O IR de corte varia amplamente com o reagente utilizado e a população analisada como, por exemplo, IR de corte maior do que 3,0 obtido para o *kit* MUREX

versão 4.0 (Abbott) (SUSLOV *et al.*, 2002) e maior do que 50 para o MEIA (Abbott) (BOSSI *et al.*, 2004).

Nossos resultados demonstraram que o IR adotado foi altamente preditivo de IB positivo, bem como de PCR positiva. Apesar de duas amostras (0,8%) com IR maior do que 6,0 serem IB indeterminados e PCR negativas, o índice aqui obtido mostrou ter capacidade diagnóstica superior à maioria dos encontradas na literatura (TOBLER *et al.*, 2003; SUSLOV *et al.*, 2002; CDC, 2003) (BARRETO *et al.*, 2003b).

Análise de novos algoritmos - Alguns laboratórios reportam como resultado positivo aquele obtido com os testes de triagem, sem a confirmação sorológica no IB ou a pesquisa do RNA do HCV (CDC, 2003). Na falta ainda de **um teste gold standard** e devido ao alto custo dos testes suplementares, o CDC, sugere 2 algoritmos alternativos, além do convencional.

algoritmo a, produziu 287 resultados positivos. Com base no índice de reatividade (IR), definiu inicialmente como sendo positivos 46% (238/517) das amostras, necessitando da realização do IB em 54% (279/517) dos soros (IR<6.0).

Esses dados demonstraram a **validade desse algoritmo** na interpretação de um resultado sorológico altamente positivo para o anti-HCV. Por esse algoritmo, 27% (139/517) do total de amostras ficaram sem diagnóstico (IB indeterminados), taxa essa bastante semelhante aos indeterminados do algoritmo **b** e **c**.

O algoritmo **a**, representa o mais econômico e prático, pois parte dos resultados seriam liberados somente com os resultados de ELISA (IR $\geq$ 6,0) e seria o algoritmo de escolha para os laboratórios cujos recursos são limitados. Entretanto, para elucidar a presença, ou não, da infecção ativa seria necessária a complementação do diagnóstico com a realização da PCR.

Das 287 amostras positivas, duas (86 e 2268) foram positivas somente nesse algoritmo sendo indeterminadas nos algoritmos **b** e **c**. A interpretação possível seria de eliminação viral seguida de início de uma reversão sorológica, tendo sido detectada no ELISA que é altamente sensível, porém com baixa reatividade no IB, menos sensível. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de uma inespecificidade a um antígeno em particular, alertando-se para a necessidade de repetição dos testes anti-HCV tanto de triagem como suplementar, em uma nova amostra, principalmente quando a hipótese diagnóstica não for compatível.

No **algoritmo b**, todas as 517 amostras positivas pelo ELISA foram submetidas a PCR, sendo 48,2% (249/517) positivas e 51,8% (268/517) negativas e que foram submetidas ao IB. O número de amostras sem diagnóstico (IB indeterminados) foi de 139, iguais ao obtido no algoritmo **a**. Apesar disso, essas indeterminadas sendo PCR negativas, permitem concluir que o paciente não apresenta viremia, dado este importante para a decisão médica. Assim, dos três algoritmos, este se mostrou o que melhor define o resultado da amostra, mas com um maior custo do que o algoritmo **a** e discretamente maior que o **c**. Este algoritmo detecta também os soros ainda no início da soroconversão onde IB ainda não preencheu os critérios de positividade (BARRETO *et al.*, 2003c).

O **algoritmo c** é de grande importância quando se trata de população de baixa prevalência, onde os resultados falsos-positivos podem ocorrer, porém, com a realização somente do IB para complementação do resultado, não se esclarece se a infecção é ativa. O teste de IB utilizado neste algoritmo forneceu uma importante parcela de 27,3% (141/517) de resultados indeterminados, que ficaram sem definição.

O grande problema do IB é o resultado indeterminado. As possíveis hipóteses para tal resultado podem ser apontadas: *i*) fase de soroconversão, onde o ELISA já pode ser positivo, devido a sua maior sensibilidade em relação ao IB, e este, ainda não ter preenchido o critério de positividade; *ii*) deve-se considerar ainda a sororreversão, onde os anticorpos para algumas frações antigênicas já negativaram no IB, mas que ainda são suficientes para resultar positivo no ELISA; *iii*) indivíduo infectado com genótipo 3 do HCV pode ter baixa reatividade dos anticorpos para as frações antigênicas do genótipo 1a, que são os utilizados nos kits comerciais, resultando em IB indeterminado, porém o ELISA ainda permanece positivo devido à reatividade aos antígenos mais conservados (BASSIT *et al.*, 1999). Assim, se uma amostra for reativa apenas ao antígeno do core, poderá resultar em ELISA positivo e IB indeterminado; *iiii*) outros fatores, que podem estar relacionados à qualidade dos *kits* ou à variação individual do paciente. O acompanhamento seqüencial dos pacientes indeterminados no IB pode, em parte, elucidar esse problema, mas alguns continuarão mantendo esse padrão de resultado, por longo tempo.

Pelas tecnologias disponíveis, os três algoritmos possuem desempenho diagnóstico comparáveis, sendo no presente estudo, considerados positivos 287 pelo algoritmo **a**, 287 com o **b** e 285 com o **c**.

Complementação dos algoritmos a e c com a PCR - Foram positivas nos três algoritmos 283 amostras. Quatro amostras apresentaram resultados divergentes, sendo duas positivas somente para o algoritmo **a** (86 e 2268), duas somente para o **b** (1992 e 2699) e as quatro amostras indeterminadas para o algoritmo **c** (**tabela 10 de resultados**).

Para se obter um diagnóstico mais conclusivo, é necessário continuar a análise, com técnicas moleculares, para verificar se o indivíduo é virêmico ou se trata de infecção pregressa, com eliminação viral. Portanto, os resultados indeterminados, resultantes do algoritmo **a** e **c**, podem ser elucidados expandindo-se os dois algoritmos com a realização da PCR. Assim, 139 amostras do algoritmo **a** e 141 do **c**, foram submetidas à PCR. A realização da PCR permitiu observar que duas amostras consideradas positivas pelo algoritmo **a** ($IR \geq 6,0$), resultaram em PCR negativas e a realização do IB, não considerada nesse algoritmo, demonstrou que era indeterminado, com a presença da banda NS3 (3+) na amostra 2268 e das bandas C1C2, E2NS1, NS4 e NS5 ($\pm$) na amostra 86. Esses dados demonstraram que, nas amostras positivas pelo ELISA com $IR \geq 6,0$, quando estas forem PCR negativas, é recomendável a realização do IB.

No algoritmo **b**, duas amostras (amostras 2699 e 1992) foram consideradas positivas na PCR. Entretanto, pelos algoritmos **a** e **c** seriam consideradas indeterminadas. Para a amostra 2699 a hipótese de pertencer a um indivíduo em soroconversão é bastante alta, pois, verificou-se um aumento de quase três vezes no IR do ELISA-R em relação ao ELISA-T, com PCR positiva e IB indeterminado, com a presença de NS3 (3+). Essa banda tem sido proposta como a que melhor detecta a soroconversão precoce com forte correlação com a viremia (40,5%) (FEUCHT *et al.*, 1995).

A amostra 1992 apresentou IR de 1,0, com IB indeterminado, com bandas NS3 e NS5 ($\pm$) e NS4 (2+). O ELISA-T, realizado na amostra colhida 31 dias antes do retorno, também apresentou IR de 1,0 mostrando a baixa probabilidade de corresponder a de um paciente em soroconversão, pois os níveis de anticorpos no ELISA não mostraram elevação entre as duas amostras. Essa amostra foi também

testada com *kit* de outra procedência (Murex, Abbott Lab), apresentando IR > 4,0, sugerindo que o ELISA empregado na triagem e na amostra do retorno apresentava baixa reatividade para essa amostra.

Estimativa de custo dos algoritmos *a*, *b* e *c* A estimativa de custo do algoritmo *a*, baseada na tabela AMB de 2004, mostrou, para a amostragem estudada, um valor total de R\$ 64.293,19 sendo, aproximadamente, 40% menor do que o custo do algoritmo *c*, (convencional), que foi de R\$ 106.538,19

Já, o algoritmo *b*, foi 18,24% mais elevado do que o convencional, com um custo de R\$ 125.962,71. Entretanto, considerando-se o elevado número de resultados indeterminados obtidos nos algoritmos *a* e *c*, realizou-se a PCR expandindo-se esses algoritmos. Assim, a estimativa de custo para os algoritmos *a* e *c* elevaram-se para: *a*: R\$ 81.398,53 e *c* R\$ 123.889,65 (o *b* manteve-se o mesmo do custo inicialmente calculado).

Comparando-se os valores unitários dos algoritmos do CDC com o expandido temos os seguintes valores, respectivamente: para *a* R\$ 124,36 e R\$ 157,44; para *b* R\$ 243,64 e R\$ 243,64 e para o *c* R\$ 206,07 e R\$ 239,63.

A escolha de um algoritmo depende do objetivo do diagnóstico e o recurso financeiro que cada laboratório dispõe, além da infra-estrutura; depende, ainda, da população atendida, seja ela de alta ou baixa prevalência da infecção por HCV, de assintomáticos, de imunossuprimidos, hemodialisados, de acidentes de trabalho, entre outros.

Portanto, devido à praticidade e à alta sensibilidade aqui encontrada, o **algoritmo *a*, este pode ser validado** para o uso em laboratórios de diagnóstico em geral, sendo útil, principalmente, naqueles com condições e recursos limitados (BARRETO *et al.*, 2004c).

Para populações de alto risco, o algoritmo *b*, onde um resultado positivo no teste de triagem tem alta probabilidade de corresponder ao verdadeiro positivo, diminuindo a necessidade do IB (GRETCH, 1997), a realização da PCR pode agilizar a decisão médica e o encaminhamento do paciente para o tratamento. O algoritmo *b* é também o mais indicado para os pacientes imunossuprimidos onde o teste suplementar pode apresentar uma reatividade reduzida.

O algoritmo **c** é útil para determinar o *status* imunológico do paciente ou para confirmar o resultado positivo do teste de triagem. No entanto, para fins clínicos, não informa se a infecção é ativa ou pregressa ou ainda, se houve transmissão vertical.

Esse algoritmo, devido ao grande número de IB indeterminados, necessitou ser expandido para permitir a análise daqueles que foram indeterminados, o que iguala o custo ao algoritmo **b**, sem, no entanto informar a presença ou não da viremia nos casos positivos no ELISA e IB e, eventualmente, produzir resultado falso-negativo nos imunossuprimidos.

Na situação atual, onde os testes de triagem são realizados somente por ensaios sorológicos, o algoritmo **b** é o melhor entre os três estudados, sem, no entanto, detectar indivíduos em fase de pré-soroconversão, pois sendo ELISA negativo a investigação não seria continuada.

Contudo, quando de fato se tornar obrigatória a realização do teste de amplificação de ácido nucleico (NAT) adicional ao ELISA, IB seria importante somente para as amostras ELISA positivas e NAT negativos, a fim de detectar pacientes que já tiveram a infecção pelo HCV, mas que eliminaram o vírus.

O diagnóstico da infecção pelo HCV emprega as mais avançadas tecnologias disponíveis atualmente, como recurso laboratorial. Essa avaliação foi realizada em um grande número de amostras, utilizando-se de resultados obtidos na rotina diária de um banco de sangue, portanto, diferente das obtidas em condições planejadas e teóricas. Os resultados, inéditos, forneceram informações que podem ser importantes na interpretação dos vários perfis de reatividade dessa infecção, na prática, tanto de pacientes como de doadores de sangue.

Este estudo foi realizado na FPS/HSP que é um banco sangue de excelência, com infra-estrutura comparável aos grandes centros do mundo. Apesar disso, a análise dos resultados, nos seus vários aspectos, mostrou que o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCV exige cuidados e que testes mais eficientes devam ser desenvolvidos.

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

1- Os testes de ELISA utilizados na triagem sorológica para anti-HCV mostraram uma baixa reprodutibilidade quando aplicados em duas amostras do mesmo paciente. Esses resultados foram confirmados pelos testes suplementares de IB e PCR em aproximadamente 50%.

- a) A concordância dos resultados do ELISA entre as duas amostras do mesmo doador foi 64,5%, sendo de 77,6% entre os positivos e de 24,1% entre os inconclusivos. Dentre as 35,5% não concordantes, 25,3% inicialmente positivas/inconclusivas, ficaram negativas.
- b) Dentre os doadores positivos ou inconclusivos para ELISA de triagem a segunda amostra demonstrou que apenas 41,2% desses eram verdadeiros positivos sorológicos (ELISA e IB positivos); este valor equivale ao VPP do ELISA-T. A viremia foi encontrada em 36%.
- c) A taxa de confirmação por IB em amostras com dois ELISAs positivos foi de 69,6%, com viremia em 61,2% e de 6,3% se um dos resultados for inconclusivo sem viremia detectada. No ELISA inconclusivo nas duas amostras, 2,4% foram positivas tanto no IB quanto na PCR.

2- Avaliação das bandas do IB quanto a sua frequência e reatividade associado aos resultados dos testes complementares permitiu concluir que:

- a) Bandas C1C2, C3C4 e NS3 foram as mais freqüentes nas amostras estudadas. As bandas do core estavam igualmente distribuídas no grupo de pacientes virêmicos e não virêmicos, enquanto que as demais bandas mostraram freqüências significativamente maiores dentre os virêmicos.
- b) A distribuição das frações antigênicas entre o grupo que apresentou baixa reatividade no IB (até duas cruzes) e o de alta reatividade (3 e 4 cruzes) foi bastante semelhante, com exceção da C1C2 e NS3 cuja intensidade de reação mostrou associação significativa com IB positivo e C1C2, NS3 e NS4 com a PCR. Relação inversa foi observada na E2NS1 onde a maior freqüência de IB e PCR foi encontrada no grupo de baixa reatividade.

3- Os dois critérios de interpretação do IB podem ser utilizados para as amostras ELISA positivo/inconclusivo.

- a) critério **A**, recomendado pelos fabricantes, classifica como IB positivo um maior número de amostras mas com baixa associação com a positividade na PCR; os indeterminados por esse critério foram negativos pela PCR.
- b) critério **B**, **alternativo**, classifica como positivos um menor número de amostras mas com maior associação com a positividade da PCR; dentre os indeterminados foi encontrado 1,4% das amostras com PCR positiva.

4- IR mostrou ser um recurso importante na interpretação dos resultados do ELISA anti-HCV. Nas condições deste estudo $IR \geq 6,0$ mostrou ser adequado como IR de corte, fornecendo resultados concordantes com o IB em 99,2%, com viremia detectada em 94,1%.

5.- Os três algoritmos analisados forneceram resultados comparáveis entre si.

5.1- Os novos algoritmos **a** e **b** podem ser validados para o uso no diagnóstico da infecção pelo HCV, podendo a escolha ser feita de acordo com o interesse e características da população atendida em cada laboratório:

- **a**: mais econômico, com custo estimado de 40% menor do que o **c** (convencional); útil para laboratórios de recursos limitados e para população de alta prevalência.
- **b**: o que melhor permite decisão clínica fornecendo dados sobre viremia, principalmente na população de alto risco e em imunossuprimidos, porém 18,3% mais oneroso do que o **c**.
- **c**: confirmação sorológica principalmente para população de baixo risco e define o *status* sorológico.

5.2- Os algoritmos **a** e **c** não estabeleceram o diagnóstico em cerca de quarta parte das amostras estudadas (26,8% e 27,3%, respectivamente), isto é aquelas IB indeterminadas. A PCR foi aqui realizada para complementação do diagnóstico (algoritmo expandido) o que resultou na detecção de duas amostras positivas a mais para o algoritmo **a** e **c** em relação ao algoritmo **b**. Foi obtido igual número de positivos nos algoritmos **b** e **c** com custos semelhantes e duas amostras a mais no **a**, mantendo-se ainda como o de menor custo dentre os três algoritmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDULKARIM, A.S.; ZEIN, N.N.; GERMER, J.J.; KOLBERT, C.P.; KABBANI, L.; KRAJNIK, K.L.; HOLA, A.; AGHA, M.N.; TOUROGMAN, M.; PERSING, D.H. Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C vírus subtypes. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.59, p.571-6, 1998.

ABRIGNANI, S.; HOUGHTON, M.; HSU, H.H. Perspectives for a vaccine against hepatitis C virus. **J. Hepatol.**, v.31, p.259-263, 1999.

AGNELLO, V.; ABEL, G.; KNIGHT, G.B.; MUCHMORE, E. Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.28, p.573-84, 1998.

ALQUÉZAR, A.S. Triagem sorológica em unidades hemoterápicas. **Boletim COSAH**. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. MS/SAS/DAPS. v.1,n.5, jan. 1995.

ALTER¹, H.J.; SEEFF, L.B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. **Semin. Liver Dis.**, v.20, p.17-35, 2000.

ALTER¹, H.J. *Natural history and clinical aspects of hepatitis C virus infection* In: SCHINAZI, R.F.; SOMMADOSSI, J.-P.; HOWARD, T. (Ed.). **Therapies for viral hepatitis**. Atlanta: International Medical Press, 1998. p.43-50.

ALTER¹, H.J.; CONRY-CANTILENA, C.; MELPOLDER, J.; TAN, D.; VAN RADEN, M.; HERION, D.; LAU, D.; HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C in asymptomatic blood donors. **Hepatology**, v.26, n.3, Suppl. 1, p.29S-33S, 1997.

ALTER¹, H.J.; SANCHEZ-PESCADOR, R.; URDEA, M.S.; WILBER, J.C.; LAGIER, R.J.; DI BISCEGLIE, A.M.; SHIH, J.W.; NEUWALD, P.D.

Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. **J. Viral Hepat.**, v.2, n.3, p.121-32, 1995a.

ALTER¹, H.J. New kit on the block: Evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C [editorial]. **Hepatology**, v.15, p.350-3, 1992.

ALTER¹, H.J.; PURCELL, R.H.; SHIH, J.W.; MELPOLDER, J.C.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q.L.; KUO, G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, v.30, n.321, p.1494-500, 1989a.

ALTER¹, H.J. Chronic consequences of non-A, non-B hepatitis. *In*: SEEFF L.B.; LEWIS, J.H. (Ed.). **Current perspectives in hepatology**. New York: Plenum Press, 1989b. p.83-97.

ALTER¹, H.J.; PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V.; POPPER, H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. **Lancet**, v.1, n.8062, p.459-63, 1978.

ALTER², M.J. *et al.* The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. **N. Engl. J. Méd.**, v.341, p. 446-52, 1999.

ALTER², M.J. *et al.* Natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **N. Engl J. Med.**, v.327, n.27, p.1899-905, 1992.

BAIN, C.; PARROCHE, P.; LAVERGNE, J.P.; DUVERGER, B.; VIEUX, C.; DUBOIS, V.; KOMURIAN-PRADEL, F.; TREPO, C.; GEBUHRER, L.; PARANHOS-BACCALA, G.; PENIN, F.; INCHAUSPE, G. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. **J Virol.** v.78, n.19, p. 10460-9, 2004.

BASSIT, L.; SILVA, L.C.; SANTOS, G.R.; MAERTENS, G.; CARRILHO, F.J.; FONSECA, L.E.P.; ALVES, V.A.F.; GAYOTTO, L.C. C.; PEREIRA, A.N.; TAKEI, K.; CHAMONE, D.; ALQUÉZAR, A.S. Chronic hepatitis C virus

infections in Brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.41, n.3, p.183-9, May/Jun., 1999.

BARRETO, A.M.E.C. *et al.*, Avaliação da reprodutibilidade do teste de ELISA para a detecção de anti-HCV em amostras de doadores de sangue, colhidas em dois momentos diferentes. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 37., 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBPC-ML, 2003a. 1 CD

BARRETO, A.M.E.C. *et al.*, Correlação entre o índice de reatividade do ELISA e a positividade do Imunoblot e PCR. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 37., 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBPC-ML, 2003b. 1 CD

BARRETO, A.M.E.C. *et al.*, Novo algoritmo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCV – Comparação com o algoritmo convencional. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 37., 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBPC-ML, 2003c. 1 CD

BARRETO, A.M.E.C. *et al.*, Frequência de bandas individuais do *immunoblot* em amostras de doadores de sangue, sorologicamente positivas para anti-HCV, na presença ou não do RNA do HCV. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 38., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC-ML, 2004a. 1 CD

BARRETO, A.M.E.C. *et al.*, Avaliação dos critérios de interpretação dos resultados do *immunoblot* anti-HCV. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 38., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC-ML, 2004b. 1 CD

BARRETO, A.M.E.C. *et al.*, Análise do custo benefício dos diferentes algoritmos para o diagnóstico da infecção pelo HCV. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO

DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL, 38., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC-ML, 2004c. 1 CD

BERG.T.; KRONENBERGER,B.; HINRICHSEN, H.; GERLACH, T.; BUGGISCH, P.; HERMANN, E.; SPENGLER, U.; GOESER, T.; NASSER, S.; WURSTHORN, K.; PAPE G.R., HOPF, U.; ZEUZEM, S. Triple therapy with amantadine in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C: a placebo-controlled trial. **Hepatology**, v.37, p.1359-67, 2003.

BLIGHT, K.J.; KOLYKHALOV, A.A.; RICE, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. **Science**, v.290, p.1972-4, 2000.

BOSSI, V.; GALLI, C. Quantitative signal of anti-HCV by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection. **J. Clin. Virol.**, v.30, p.45-9, 2004.

BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. A "new" antigen in leukemia sera. **JAMA. J. Am. Med. Assoc.**, v.191, p.541-6, 1965.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria n.721/GM, de 09 de agosto de 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.229, 02 dez. 1993. Seção 1, p.18405-15. Revogada pela Portaria n.103, de 06/02/2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.1407, de 01 de agosto de 2002. Determina a inclusão, no âmbito da Hemorrede Nacional, nos serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos, privados contratados pelo SUS, e exclusivamente privados, a realização de testes para detecção de ácidos nucleicos (NAT) para o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o vírus da Hepatite C (HCV), nas amostras de doadores. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº148, de 02 ago. 2002. Seção 1, p.33. Revogada pela Portaria n.79, de 31/01/2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.863, de 04 de novembro de 2002. Resolve aprovar o PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS-HEPATITE VIRAL CRÔNICA C – Interferon-alfa, Interferon-alfa peguilado, Ribavirina, na forma do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.217, nov. 2002. Seção 1, p.160-74.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.112, de 29 de Janeiro de 2004. Dispõe sobre a implantação e realização, no âmbito da Hemorrede Nacional, de testes de amplificação e detecção de ácidos nucléicos (NAT) para HIV e HCV. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 21, 30 jan. 2004. Seção 1, p.71-2.

BUKH, J., APGAR, C.L. Five new or recently discovered (GBV-A) virus species are indigenous to new world monkeys and may constitute a separate genus of the *Flaviviridae*. **Virology**, v.229, p.429-36, 1997.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Sem. Liver Dis.**, v.15, p.41-63, 1995.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.8234-8, 1993.

BURIONI, R.; MANCINI, N.; CANDUCCI, F.; CARLETTI, S.; GRIECO, A.; PEROTTI, M.; SERAFÍN, G.; BERARDINELLI, E.; BIGHI, S.; VARALDO, P.E.; CLEMENTI, M. Humoral immune response against hepatitis C virus. **J. Bil. Regul. Homeost. Agents**, v.17, p.125-7, 2003.

BUSCH, M.P. Insights into the epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatitis C virus infection from studies of infected donors and blood product recipients. **Transfus. Clin. Biol.**, v.8, p.200-6, 2001.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; Da SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINEELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; COELHO, H.S.M.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.; BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C, genotypes in Brazil. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v.38, p.41-9, 2005.

CAREY, W. Tests and screening strategies for the diagnosis of hepatitis C. **Clev. Clin. J. Med.**, v.70; Supl.4; S7-S13, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. **MMWR**, v.52, n. RR-3, p.1-15, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV related chronic disease. **MMWR**, v.47, n. RR-19, p.1-39, 1998.

CERNY, A.; CHISARI, F.V. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. **Hepatology**, v.30, n.3, p.595-601, 1999.

CHA, T.A.; BEALL, E.; IRVINE, B.; KOLBERG, J.; CHIEN, D.; KUO, G.; URDEA, M.S. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p.7144-8, 1992.

CHAMBERLAIN, R.W.; ADAMS, N.; SACED, A.; SIMMONDS, P.; ELLIOTT, R.M. Nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East.. **J. Gen. Virol.**, v.78, p.1341-7, 1997.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.44, p.649-88, 1990.

- CHISARI, F.V. Hepatitis B virus biology and pathogenesis. **Mol. Genet. Méd.**, v.2, p.67-104, 1992.
- CHOO, Q-L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-62, 1989.
- CHOO, Q-L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER, A.J.; BRADLEY, D. W.; KUO, G.; HOUGHTON, M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 2451-5, 1991.
- COLOMBO, M.; KUO, G.; CHOO, Q.L.; DONATO, M.F.; DEL NINNO, E.; TOMMASINI, M.A.; DIOGUARDI, N.; HOUGHTON, M. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v.28, n.2 (8670), p.1006-8, 1989.
- CONRY-CANTILENA, C.; VANRADEN, M.; GIBBLE, J., Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v.334, p.1691-6, 1996.
- COOPER, S.; ERICKSON, A.L.; ADAMS E.J. Analysis of successful immune response against hepatitis C virus. **Immunity**, v.10, p.439-49, 1999.
- COUROUCE, A.M.; BARIN, F.; BOTTE, C.; LUNEL, F.; MAISONNEUVE, P.; MANIEZ, M.; TREPO, C. A comparative evaluation of the sensitivity of seven anti-hepatitis C virus-screening tests. **Vox Sang**. v.69, n.3, p.213-6, 1995.
- DEV, A.T.; McCRAW, R.; SUNDARARAJAN, V.; BOWDEN, S.; SIEVERT, W. Southeast Asian patients with chronic hepatitis C: the impact of novel genotypes and race on treatment outcome. **Hepatology**, v.36, n.5, p.1259-65, 2002.

- DIENSTAG, J.L. Non-A, non-B hepatitis. Recognition, epidemiology, and clinical features. **Gastroenterology**, v.85, n.2, p. 439-62, 1983.
- DOU, X-G.; TALEKAR, G.; CHANG, J.; DAÍ, X.; LI, L.; BONAFONTE, M-T; HOLLWAY, B.; FIELDS, H.A; KHUDYAKOV, Y.E. Antigenic Heterogeneity of Hepatitis C virus NS5A protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p. 61-7, 2002.
- DUSHEIKO, G.; SIMMONDS, P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. **J. Viral Hep.**, v.1, p.3-15, 1994.
- ENOMOTO, N., SAKUMA, I., ASAHINA, Y., KUROSAKI, M., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, C., IZUMI, N., MARUMO, F., SATO, C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.224-30, 1995.
- FABRIZI, F.; POORDAD, F.F.; MARTIN, P. Hepatitis C infections and the patient with end stage renal disease. **Hepatology**, v.36, p.3-10, 2002.
- FARCI, P. *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral *quasispecies*. **Science**, v.288, p. 339-44, 2000a.
- FARCI, P.; PURCELL, R.H. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and *quasispecies*. **Semin. Liver Dis.**, v.20, n.1, p.103-26, 2000b.
- FARCI, P.; ALTER, H.J.; GOVINDARAJAN, S.; WONG, D.C.; ENGLE, R.; LESNIEWSKI, R.R.; MUSHAHWAR, I.K.; DESAI, S.M.; MILLER, R.H.; OGATA, N. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. **Science**, v.258, p.135-40, 1992.
- FARCI, P.; ALTER, H.J.; WONG, D.; MILLER, R.H.; SHIH, J.W.; JETT, B.; PURCELL, R.H. Hepatitis viruses section. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. National Institutes of Health, Bethesda, MD. **N. Engl. J .Med.**, v.325, p.98-104, 1991.

FEUCHT, H.H.; ZOLLNER, B.; POLYWKA, S.; LAUFS, R. Study on reliability of commercially available hepatitis C virus antibody tests. **J. Clin Microbiol.** v.33, n.3, p.620-4, 1995.

FOCACCIA R. *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the Municipality of San Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence based population. **Braz J. Infect. Dis.**, v.2, n.6, p.269-84, 1998.

FORNS, X.; PAYETTE, P.J.; MA, X.; SATTERFIELD, W.; EDER, G.; MUSHAHWAR, I.K.; GOVINDARAJAN, S. Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. **Hepatology**, v.32, p.618-25, 2000.

FORNS, X.; BUKH, J. The molecular biology of hepatitis C virus. **Clin. Liver Dis.**, v.3, n.4, p.693-716, 1999.

GALE JR., M.; BLAKLELY, C.M.; KWIECISZEWSKI, B.; TAN, S.-L.; DOSSETT, M.; TANG, N.M.; KORTH, M.J.; POLYAK, S.J.; GRETCH, D.R.; KATZE, M.G. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. **J. Virol.** v.18, p.5208-8, 1998.

GALEN, R.S.; GAMBINO, S.R. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses. *In: A WILEY Biomedical Publications.* New York, 1975. p.30-48.

GARSON, J.A.; TEDDER, R.S.; BRIGGS, M.; TUKE, P.; GLAZEBROOK, J.A.; TRUTE, A.; PARKER, D.; BARBARA, J.A.J.; CONTRERAS, M.; ALOYSIUS, S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. **Lancet**, v.335, p.1419-22, 1990.

- GERLACH, J.T. *et al.* Recurrence of hepatitis C virus after loss of vírus-specific CD4 (+) T-cell response in acute hepatitis C. **Gastroenterology**, v.117, p.933-41, 1999.
- GOODMAN, L.A. On the multivariate analysis of three dichotomous variables. **AJS**, v.71, p.290-301, 1965.
- GOODMAN, L.A. A short computer program for the analysis of transaction flows. **Behav. Sci.**, v.9, p.176-86, 1964.
- GRAKOU, A.; WYCHOWSKI, C.; LIN, C.; FEINSTONE, S.M.; RICE, C.M. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. **J. Virol.**, v.67, n.3, p.1385-95, 1993.
- GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**, v.26, n.3, Suppl., p.43S-47S, 1997.
- GRIFFIN, S.D.; BEALES, L.P.; CLARKE, D.S.; WORSFOLD, O.; EVANS, S.D.; JAEGER, J.; HARRIS, M.P.; ROWLANDS, D.J. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **Febs Letters**, v.535, p.34-8, 2003.
- GUNSON, R.N., SHOUVAL, D., ROGGENDORF, M., ZAAIJER, H., NICHOLAS, H., HOLZMAN, H., SCHRYVER, A., D. REYNDERS, D., CONNELL, J., GERLICH, W.H., MARINHO, R.T., TSANTOULAS, D., RIGOPOULOU, E., ROSENHEIM, M., VALLA, D., PURO, V., STRUWE, J., TEDDER, R., AITKEN, C., ALTER, M., SCHALM, S.W., CARMAN, W.F., EUROPEAN CONSENSUS GROUP. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections in health care workers (HCWs): guidelines for prevention of transmission of HBV and HCV from HCW to patients. **Journal of Clinical Virology**, v.27, p.213-230, 2003.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v.11, p.1026-30, 1993.

HIJIKATA, M.; KATO, N.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; SHIMOTOHNO, K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.88, p.5547-51, 1991.

HOOFNAGLE, J.H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, n.36, p. S21-S29, 2002.

HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**, n.26, p.S15-S20, 1997.

HOUGHTON, M.; WEINER A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q.-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, v.14, n.2, p.381-8, 1991.

ILAN, E.; ARAZI, J.; NUSSBAUM, O.; ZAUBERMAN, A.; EREN, R.; LUBIN, I.; NEVILLE, L. The hepatitis C virus (HCV) – trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. **J. Infect. Dis.** v.185, p.153-61, 2002.

ISHII, K. *et al.* High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.28, p.1117-20, 1998.

ISHIDA, S.; KAITO, M.; KOHARA, M.; TSUKIYAMA-KOHORA, K.; FUJITA, N.; IKOMA, J.; ADACHI, YUKIHIKO, A.; WATANABE, S. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. **Hepatol. Res.**, v.20, p.335-47, 2001.

KANEKO, T.; TANJI, Y.; SATOH, S.; HIJIKATA, M.; ASABE, S.; KIMURA, K.; SHIMOTOHNO, K. Production of two phosphoproteins from the NS5A

region of hepatitis C viral genome. **Biochem. Biophys.**, v.205, p.320-6, 1994.

KATAYAMA, K.; UMAGAI, Y.; ZUI, M.; YUGI, H.; KISHIMOTO, S.; YAMANAKA, R.; TAMATSUKURI, S.; TOMOGURI, T.; MIYAKAWA, Y.; TANAKA, J.; YOSHIZAWA, H. Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission. **Intervirology**, v.47, p.57-64, 2004.

KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SUGIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. Molecular cloning of the human hepatitis C genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, p.9524-8, 1990.

KIELY, P.; KAY, D.; PARKER, S.; PISCITELLI, L. The significance of third-generation HCV RIBA-indeterminate, RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. **Transfusion**, v.44, p.349-58, 2004.

KIYOSAWA, K. *et al.* Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 12, p.671-5, 1990.

KLEINMAN, S. *et al.* Comparison of preliminary observed yield of HCV and HIV minipool (MP) nucleic acid testing (NAT) with predictions from the incidence/window period (INC/WP) model. **Transfusion**, v. 40, Suppl. 10, p. 4s., 2000. [Abstract S6-030A].

KLETER, B. **Characterization of hepatitis C virus isolates from chronically infected patients**. Rotterdam, 1995. 182p. Tese (Doutorado). – Erasmus University.

KOZIEL, M.J. *et al.* HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.2311-21, 1995.

KOMURIAN-PRADEL, F.; RAJOHARISON, A.; BERLAND, J.L.; KHOURI, V.; PERRET, M.; VAN ROOSMALEN, M.; POL, S.; NEGRO, F.; PARANHOS-BACCALA, G. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.40, n.4, p.900-9, 2004.

KUO, G., CHOO, Q.-L., ALTER, H.J., GITNICK, G.L., REDEKER, A.G., PURCELL, R.H., MIYAMURA, T., DIEBSTAG, J.L., ALTER, M.J., STEVENS, C.E., TEGTMEIER, G.E., BONINO, F., COLOMBO, M., LEE, W.-S., KUO, C., BERGER, K., SHUSTER, L.R., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W., HOUGHTON, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human Non-A, Non-B hepatitis. **Science**, v.244, p.362-4, 1989.

LAI, M.E.; MAZZOLENI, A.P.; ARGIOLOU, F.; DE VIRGILIS, S.; BALISTRIERI, A.; PURCELL, R.H.; CAO, A. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. **Lancet**, v.343, p.388-90, 1994.

LARGHI, A., *et al.* Outcome of an outbreak of acute hepatitis C among healthy volunteers participating in pharmacokinetics studies. **Hepatology**, v.36, p. S93-8, 2002.

LAUER, G. M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N. England J. Med.**, v.345, p. 41-52, 2001.

LERAT, H.; BERBY, F.; TRABAUD, M.A.; VIDALIN, O.; MAJOR, M.; TRÉPO, C.; INCHAUSPÉ, G. Specific detection of hepatitis C virus, minus strand RNA in hematopoietic cells. **J. Clin. Invest.**, v.97, p.845-51, 1996.

LECHNER, F. *et al.* Analyses of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. **J. Exp. Méd.**, v.191, p.1499-512, 2000.

LEFRÈRE, J-J.; GIROT, R.; LEFRÈRE F.; GUILLAUME, N.; LERABLE, J.; MARREC, N.L.; BOUCHARDEAU, F.; LAPERCHÉ, S. Complete or partial seroconversion in immunocompetent individuals after self-limits HCV infection: consequences for transfusions. **Transfusion**, v.44, p.343-8, 2004.

LEFRÈRE, J-J. *et al.* Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. **J Infect Dis**, v. 175, p.316-22, 1997.

LIAKINA, V.; SPEICIENE, D.; IRNIUS, A.; NARASKEVICIENE, J.; BARAUSKIENE, A.; SEMUCHINIENE, T. Prevalence of cryoglobulinemia in patients with chronic HCV infection. **Med. Sci. Monit.**, v.8, p. CR31-6, 2002.

LIANG, T.J.; REHERMANN, B.; SEEFF, L.B.; HOOFNAGLE, J.H. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. **N.I.H. Conference**, v.132, n.4, p.296-305, 2000.

LINNEN, J. *et al.* Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. **Science**, v.71, p.505-8, 1996.

LO, S.-Y.; SELBY, M.J.; OU, J.-H. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. **J. Virol.**, v.70, p.5177-82, 1996.

LOCARNINI, S.A. Mechanisms of drug resistance and novel approaches to therapy for chronic hepatitis C: hepatitis C. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.17, Suppl., S351-9, 2002.

LOCARNINI, S.A.; BARTHOLOMEUSZ, A. Advances in liver disease: hepatitis C. Advances in hepatitis C: what is coming in the next 5 years? **J. Gastroenterol. Hepatol**, v.17; p.442-7, 2002.

- LOHMANN, V.; KORNER, F.; KOCH, J.; HERIAN, U.; THEILMANN, L.; BARTENSCHALAGER, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**, v.285, p.110-3, 1999.
- LUTCHMAN, G.; HOOFNAGLE, J.H. Viral kinetics in hepatitis C. **Hepatology**, v.37, n.6, p.1343-51, 2003.
- MAERTENS G., STUYER, L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. *In*: HARISON T., ZUCKERMANM, A. (Ed.) **The molecular medicine of viral hepatitis**. New York: John Wiley, 1997. p.183-234.
- MAJOR, M.E.; FEINSTONE, S.M. The molecular virology of hepatitis C. **Hepatology**, v.25, p.1527-38, 1997.
- MANNS, M.P.; McHUTCHISON, J.G.; GORDON, S.C.; RUSTGI, V.K.; SHIFFMAN, M.; REINDOLLAR, R.; GOODMAN, Z.D.; KOURY, K.; LING, M.; ALBRECHT, J.K. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v.358, p.958-65, 2001.
- MANZINI, P. *et al.* Human immunodeficiency virus infection as risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission; persistence of anti-hepatitis C virus in children is associated with the mother's anti-hepatitis C virus immunoblotting pattern. **Hepatology**, v.21, n.2, p.328-32, 1995.
- MARTINS, R.M.B.; VANDERBORGHT, B.O.M.; YOSHIDA, C.F.T. Hepatitis C virus genotypes among Blood Donors from different regions of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, n.3, p.299-300, 1998.
- McHUTCHISON, J.G. *et al.* The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.119, p.1317-23, 2000.

- MERCER, D.F.; SCHILLER, D.E.; ELLIOT, J.F.; DOUGLAS, D.N.; HAO, C.; RINFRET, A.; ADDISON, W.R. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. **Nat. Med.**, v.7, p.927-33, 2001.
- MEHTA, S.H.; COX, A.; HOOVER, D.R.; WANG, X.-H.; MAO, Q.; RAY, S.; STRATHDEE, S.A. Protection against persistence of hepatitis C. **Lancet**, v.359, p.1478-83, 2002.
- MILLER, R.H., PURCELL, R.H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviruses as well as members of two plant virus supergroups. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.87, p.2057-2061, 1990.
- MIZOKAMI, M.; GOJOBORI, T.; OHBA, K.; IKEO, K.; GE, X.M.; OHNO, T.; ORITO, E.; LAU, J.Y. Hepatitis C virus types 7, 8, and 9 should be classified as type 6 subtypes. **J. Hepatol.**, v.24, p.622-4, 1996.
- MULLER-BREITKREUTZ, K.; BAYLIS, S.A.; ALLAIN, J.P. Nucleic acid amplification tests for detection of blood-borne viruses. **Vox Sang**, v.76, p.194-9, 1999.
- NAPOLI, J.; BISHOP, G.A.; McCAUGHAN, G.W. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1- associated cytokines. **Hepatology**, v.24, p.759-65, 1996.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Consensus Development Conference Statement. **Management of Hepatitis C**. June 10-12, p.1-44, 2002.
- NEVILLE, J.A.; PRESCOTT, L.E.; BHATTACHERJEE, V.; ADAMS, N.; PIKE, I.; RODGERS, B.; EL-ZAYADI, A.; HAMID, S.; DUSHEIKO, G.M.; SAEED, A.A.; HAYDON, G.H.; SIMMONDS, P. Antigenic variation of core, NS3,

- and NS5 proteins among genotypes of hepatitis C virus. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.12, p. 3062-70, 1997.
- NEUMANN, A.U.; LAYDEN, T.J.; REDDY, K.R.; LEVY-DRUMMER, R.; POULAKOS, R. The second phase slope phase of HCV decline is highly predictive of sustained virologic response (SVR) following consensus interferon. **J. Hepatol.**, v.32, p.318A, 2000.
- NEUMANN, A.U.; LAM, N.P.; DAHARI, H.; GRETCH, D.R.; WILEY, T.E.; LAYDEN, T.J.; PERELSON, A.S. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon alpha therapy. **Science**, v.282, p.103-7, 1998.
- NÜBLING, C.M. *et al.* Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. **Transfusion**, v.42, p.1037-45, 2002.
- OGATA, N.; ALTER, H.J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.88, p. 3392-6, 1991.
- OKAMOTO, H.; KURAI, K.; OKADA, S.-I.; YAMAMOTO, K.; IIZUKA, H.; TANAKA, T.; FUKUDA S.; TSUDA F.; MISHIRO, S. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. **Virology**, v.188, p.331-41, 1992.
- OMATA, M.; KATO N. Recent advances in hepatitis C virus research. **J. Gastroenterol.**, v.29, p.377-82, 1994.
- PAWLOTSKY, J-M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. **Gastroenterology** , v.122, n.6, p.1554-68, 2002.
- PAWLOTSKY, J-M.; LONJON, L.; HEZODE, C.; RAYNARD, B.; DARTHUY, F.; REMIRE, J.; SOUSSY, C.; DHUMEAUX, D. What strategy should be used

for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories?
Hepatology, v.27, p.1700-2, 1998.

PAWLOTSKY, J-M, BASTIE A., PELLET, C., REMIRE,J., DARTHUY, F.,
WOLFE, L., SAYADA, C., DUVAL, J., DHUMEAUX, D. Significance of
indeterminate third-generation hepatitis c virus recombinant immunoblot
assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.1, p.80-3, 1996.

PAWLOTSKY, J-M, TSAKIRIS, L., ROUDOT-THORAVAL, F., PELLET, C.,
STUYVER, L., DUVAL, J., DHUMEAUX, D. Relationship between hepatitis
C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic
hepatitis C. **J. Infect Dis.**, v.173, p.509-512, 1995a.

PAWLOTSKY, J-M.; ROUDOT-THORAVAL, F.; PELLET, C.; AUMONT, P.;
DARTHUY, F.; REMIRE, J.; DUVAL, J.; DHUMEAUX, D., DUVAL, J.
Influence of hepatitis C virus (HCV) genotypes on HCV recombinant
immunoblot assay patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.5, p.1357-
9,1995b.

PEOPLES, B.G.; PRESTON, S.B.; TZENG, J.L.; STRAMER, S.L.; GIFFORD, L.;
WISSEL, M.E. Prolonged antibody-negative HCV viremia in a US blood
donor with apparent HCV transmission to a recipient. **Transfusion**, v.40,
p. 1280-1, 2000.

PEREBOEVA, L.A.; PEREBOEV, A.V.; WANG, L. F.; MORRIS, G.E. Hepatitis C
epitopes from phage-displayed cDNA libraries and improved diagnosis with a
chimeric antigen. **J. Med. Virol.**, v.60, p.144-51, 2000.

PESSOA, M.G.; TERRAULT, N.A.; FERRELL, L.D.; DETMER, J.; KOLBERG, J.;
COLLINS, M.L.; VIELE, M.; LAKE, J.R.; ROBERTS, J.P.; ASCHER, N.L.;
WRIGHT, T.L. Hepatitis after liver transplantation: the role of the known
and unknown viruses. **Liver Transpl. Surg.**, v.4, n.6, p.461-8, 1998.

- POIGNET, J.L. *et al.* Complete response to interferon-alpha for acute hepatitis C after needlestick injury in a hemodialysis nurse. **J Hepatol.**, v.23, p.740-1, 1995.
- PUOTI, M.; PRESTINI, K.; PUTZOLU, V.; ZANINI, B.; BAIGUERA, C.; ANTONINI, M.G.; PAGANI, P.; AIROLDI, M.; CAROSI, G. HIV/HCV co-infection: natural history. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v.17, p.144-6, 2003.
- RICE, C.M: *Flaviviridae*: The viruses and their replication. *In*: FIELDS B.N., KNIPPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds): **Fields Virology**, ed 3. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996. p.931.
- RICE, C.M.; KOLYKHALOV, A.A.; LIN, C.; REED, K.; AGAPOV, E.A.; BLIGHY, K.; XU, J.; GRAKOU, A. Hepatitis C virus genome organization and expression: potential antiviral targets. **Antiviral Ther.**, v.1, suppl.4, p. 11-7, 1996. (International Conference on therapies for Viral Hepatitis, 1., Kauai, 1995).
- RICHTER, S.S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection, minireview. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.12, p.4407-12, 2002.
- ROBERTSON, B.; MYERS; HOWARD, C.; BRETTIN, BUKH, GASHEN, B., GOJOBORI, T., MAERTENS, M., MIZOKAMI, M., NAINAN, O., NETSOV, S., NISHIOKA, K., SHIN-I, T., SIMMONDS, P., SMITH, D., STUYVER, L.; WEINER, A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. **Arch. Virol.**, v.143, p.12, 1998.
- SAKAI, A.; CLAIRE, M.S.; FAULK, K.; GOVINDARJAN, S.; EMERSON, S.U.; PURCELL, R. H.; BUKH, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **PNAS**, v.100, n.20, p.11646-51, 2003.

- SALLES, N.A.; SABINO, E.C.; BARRETO, C.C.; BARRETO, A.M.E.; OTANI, M.M.; CHAMONE, D.F. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. **Pan Am. J. Publ. Health**, v.13, n.2/3, p.111-5, 2003.
- SALDANHA, J.; LELIE, N.; HEATH, A. LELIE, N.; PISANI, G.; NÜBLING, M.; YU, M., THE COLLABORATIVE STUDY GROUP. Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. **Vox Sang.**, v.78, p.217-24, 2000.
- SALDANHA, J.; LELIE, N.; HEATH, A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. **Vox Sang**, v.76, p.149-58, 1999.
- SCHÜTTLER, C.G.; CASPARI, G.; JURSCH, C.A. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. **Lancet**, v.355, p.41-2, 2000.
- SCHRÖTER, M., SCHÄFER, P., ZÖLLNER, B., POLYWKA, S., LAUFS, R., FEUCHT, H-H. Strategies for reliable diagnosis of hepatitis C infection: The need for a serological confirmatory assay. **Journal of Medical Virology**, v.64, p.320-4, 2001.
- SEEFF, L.B. The natural history of hepatitis C-A quandary. **Hepatology**, v.28, p.1710-2, 1998.
- SHIMIZU, Y.; YAMAJI, K.; MASUHO, Y.; YOKOTA, T.; INOUE, H.; SUDO, K.; SATOH, S.; SHIMOTOHNO, K. identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/5B site by hepatitis C virus NS3 protease. **J. Virol.**, v.70, p.127-32, 1996.

-
- SHOJI, I., SUZUKI, T., SATO, M., AIZAKI, H., CHIBA, T., MATSUURA, Y., MYAMURA, T. Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. **Virology**, v.254, p.315-23, 1999.
- SIMMONDS, P., MELLOR, J., SAKULDAMRONGPANICH, NUCHAPRAYOON, C., TANPRASERT, S., HOLMES, E.C., SMITH, D.B. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-east Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. **J. Gen. Virol.**, v.77, p.3013-24, 1996.
- SIMMONDS, P. Variability, of hepatitis C virus. **Hepatology**, v.21, p. 570-83, 1995.
- SIMMONDS, P.; McOMISH, F.; YAP, P.L.; CHAN, S.W.; LIN, C.K.; DUSHEIKO, G.; SAEED A.A.; HOLMES, E.C. Sequence variability in the 5'noncoding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **J. Gen. Virol.**, v.74, p.661-8, 1993.
- SIMON, N. *et al.* A twelve year natural history of hepatitis C virus infection in hemodialized patients. **Kidney Int** . v.46, p.504-11, 1994.
- SIMONS, J.N.; PILOT-MATIAS, T.J.; LEARY, T.P.; DAWSON, G.J.; DESAI, S.M.; SCHLAUDER, G.G.; MUERHOFF, A.S.; ERKER, J.C.; BUIJK, S.L.; CHALMERS, M.L.; VAN SAN, C.L.; MUSHAWAR, I.K. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. **Proc. Natl. Sci.**, v.92, n.8, p.3401-5, 1995.
- STRAMER, S.L., CAGLIOTI, S., STRONG D.M., NAT of the United States and Canadian blood supply. **Transfusion**, v.40, p.1165-8, 2000.
- STUYVER, L., ROSSAU, R., WYSEUR, A., DUHAMEL, M., VANDERBORGHT, B., VAN HEUVERSWYN, H., MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. **J. Gen. Virol.**, v.74, p.1093-1102, 1993.

- SUSLOV, A.P., KUZIN, S.N., GOLOSOVA, T.V., SHALUNOVA, N.V., MALYSHEV, N.A., SADIKOVA, N.V., VAVILOVA, L.M., SOMOVA, A.V., MUSINA, E.E., IVANOVA, M.V., KIPOR, T.T., TIMONIN, I.M., KUZINA, L.E., GODKOV, M.A., BAJENOVE A.L., NESTERENKO, V.G. – Limits of diagnostic accuracy of anti-hepatitis C virus antibodies detection by ELISA and immunoblot assay. **Russian Journal of Immunology**, v.7, n.2, 2002.
- SUZUKI, R.; SUZUKI, T.; ISHII, K.; MATSUURA, Y.; MIYAMURA, T. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. **Intervirology**, v.42, p.145-52, 1999.
- SZABÓ, E., LOTZ, G., PÁSKA, C., KISS, A., SCHAFF, Z. - Viral hepatitis new data on hepatitis C Infection. **Pathology Oncology Research**, v.9, n.4, p.215-221, 2003.
- TAKADA, N., TAKASE, S., TAKADA, A., DATE, T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. **J. Hepatology**, v.17, p.277-283, 1993.
- TAKAKI, A., WIESE, M., MAERTENS, G., DEPLA, E., SEIFERT, U., LIEBETRAU, A., MILLER, J.L., MANNS, M.P., REHERMANN, B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. **Nat med.**, v.6, p.578-82, 2000.
- TAKAMIZAWA, A., MORI, C., FUKE, I., MANABE, S., MURAKAMI, S., FUJITA, J., ONISHI, E., ANDOH, T., YOSHIDA I., OKAYAMA, H. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **Journal of Virology**, v.65, no.3, p.1105-13, 1991.
- THIMME, R.; OLDACH, D.; CHANG, K.-M.; STEIGER, C.; RAY, S.C.; CHISARI, F.V. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **J. Exp. Med.**, v.194, n.10, p.1395-406, 2001.

- TOBLER, L.H., STRAMER, S.L., LEE, S.R., MASECAR, B.L., PETERSON, J.E., DAVIS, E.A., ANDREWS, W.E., BRODSKY, J.P., KLEINMAN, S.H., PHELPS, B.H., BUSCH, M.P. Impact of HCV 3.0 EIA relative to HCV 2.0 EIA on blood-donor screening. **Transfusion**, v.43, p.1452-9, 2003.
- TOKITA, H.; OKAMOTO, H.; IIZUKA, H.; KISHIMOTO, J.; TSUDA, F.; LESMANA, L.A.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. **J. Gen. Virol.**, v.77; p.293-301, 1996.
- TOKITA, H.; OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SONG, P.; NAKATA, S.; CHOSA, T. H.; IIZUKA, H.; MISHIRO, S.; MIYAKAWA, Y. ; MAYUMI, M. Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eight, and ninth major genetic groups. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.11022-6, 1994.
- VAN DER POEL, C.L.; CUYPERS, H.T.; REESINK, H.W. Hepatitis C virus six years on. **Lancet**, .344, p. 1475-9, 1994.
- VAN DER POEL, C.L. *et al.* Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. **Lancet**, v.337, p.912-3, 1991.
- VAN DOORN, L-J. **Detection and characterization of hepatitis C virus: the biology of the hepatitis C virus a review of literature.** Rotterdam, 1994. (Tese de Doutorado) – Universidade de Rotterdam.
- VEILLON, P.; PAYAN, C.; GAUDY, C.; GOUDEAU, A.; LUNEL, F. Mutation analysis of ISDR and V3 domains C vírus NS5A region before interferon therapy with or without ribavirn. **Pathol Biol.**, v.52, n.9, p.505-10, 2004.
- VUILLERMOZ, I.; KHATTAB, E.; SABLON, E.; OTTEVAERE, I.; DURANTEL, D.; VIEUX, C.; TREPO, C.; ZOULIM, F. Genetic variability of hepatitis C vírus

in chronically infected patients with viral breakthrough during interferon-ribavirin therapy. **J Med Virol.**, v.74, n.1, p.41-53, 2004

VOGT, M.; LANG, T.; FRÖSNER, G.; CHRISTIANE, K. SENDL, A.F.; ZELLER, A.; WIEBECKE, B.; LANGER, B.; MEISNER, H.; HESS, J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood – donor screening. **New Engl. J. Med.** v.341, n.12, p.866-70, 1999.

XIE, Z-C.; RIEZU-BOJ, J-I.; LASARTE, J-J.; GUILLEN, J.; SU, J-H.; CIVEIRA, M-P.; PRIETO, J. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. **Virology**, v.244, n.VY989127, p513-20, 1998.

WATANABE, H.; SAITO, T.; SHINZAWA, H.; OKUMOTO, K.; HATTORI, E.; ADACHI, T.; TAKEDA, T.; SUGAHARA, K.; ITO, J.-L.; SAITO, K.; TOGASHI, H.; SUZUKI, R.; HAYASHI, M.; MIYAMURA, T.; MATSUURA, Y.; SUMIO, K. Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population – based cohort study. **J. Med. Virol.**, v.71, p.56-61, 2003.

WEINER, A.J.; BRAUER, M.J.; ROSENBLATT, J.; RICHMAN, K.H.; TUNG, J.; CRAWFORD, K.; BONINO, F.; SARACCO, G.; CHOO, Q.-L.; HOUGHTON, M.; HAN, J.H. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. **Virology**, v.180, p.842-8, 1991.

WRIGHT, T.L.; HOLLANDER, H.; PUO, X.; HELD, M.J.; LIPSON, P.; QUAN, S.; POLITO, A.; THALER, M.M.; BACCHETTI, P.; SCHARSCHMIDT, B.F. Hepatitis C in HIV-infected patients with and without AIDS: prevalence and relationship to patient survival. **Hepatology**, v.20, n.5, p.1152-5, 1994.

ZHAO, X.; TANG, Z-Y.; KLUMPP, B.; WOLFF-VORBECK, G.; BARTH, H.; LEVY, S.; WEIZSACKER, F.; BLUM, H.E.; BAUMERT, T.F. Primary

hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. **J. Clin. Invest.**, v.109, n.2, p.221-32, 2002.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p. 663.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin. Microbiol. Rev.** v.13, n.2, p.223-5, 2000.

ZUCKERMAN, A. J. The elusive hepatitis C virus. **BMJ**, v.299, p.871-3, 1989.

ANEXO

8 - ANEXO

8.1. ANEXO 1

TABELA A1 - Associação entre diferentes resultados do ELISA-T e ELISA-R e a positividade no IB e na PCR

ELISA-T	ELISA-R	IB positivo	Viremia
Pos/Inc	NR	41,2% (285/692)	36,0% (249/692)
Pos/Inc	Pos	65,0% (284/437)	61,2 % (248/405)
Pos/Inc	Inc	1,2% (1/80)	1,2% (1/80)
Pos/Inc	Neg	NR	0,0% (0/175)
Pos	NR	54,0% (282/522)	47,5% (248/522)
Pos	Pos	69,6% (282/405)**	61,2% (248/405)
Pos	Inc	0,0% (0/39)	0,0% (0/39)
Pos	Neg	NR	0,0% (0/78)
Inc	NR	1,8% (3/170)	0,6% (1/170)
Inc	Pos	6,2% (2/32)	0,0% (0/32)
Inc	Inc	2,4% (1/41)	2,4% (1/41)
Inc	Neg	NR	0,0% (0/97)

NR – não realizado