

NORMA DE PAULA CAVALHEIRO

Hepatite C: transmissão entre casais

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone

SÃO PAULO
2004

Para as mulheres da minha vida:

Celina, minha avó
Maria de Lourdes, minha mãe
Verena, minha filha

Para os homens da minha vida:

Rudney, meu marido
Matheus, meu filho

AGRADECIMENTOS

Ao **LIM-47**. Minha segunda casa.

Em especial ao **Prof. Dr. Antonio Alci Barone**, orientador, chefe e amigo.

Antonia Magali Dias de Souza, minha amiga consultora de assuntos de informática. Esta dissertação não existiria sem ela.

Carlos Eduardo de Melo, bioquímico de nosso laboratório que em pouco tempo provou seu valor científico e competência profissional.

Clélia Venezian de Carvalho, amiga e mãe de todas as horas. Obrigada por suas orações.

Dra. Fátima Mitiko Tengan, com seriedade, muito me ajudou na construção efetiva deste trabalho.

Dr. Evaldo Stanislau Affonso de Araújo, pelo apoio e cooperação no encaminhamento de pacientes para o estudo.

Dr. Azzo Widman, com entusiasmo e seriedade profissional muito tem me ajudado, também pela cooperação e encaminhamento de pacientes para o estudo.

Marinalva de Souza Aragão, bibliotecária da FMUSP, muito acrescentou para a conclusão deste trabalho.

Dean Dominic de Lucia, amigo sempre presente e disposto a ajudar, obrigada.

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, professor e pesquisador que sempre, com muito carinho e competência, me incentivou não só para a conclusão deste trabalho e tem sido um exemplo em minha vida profissional.

Grupo Esperança, da cidade de Santos. Na figura do **Sr. Jeová Fragoso**, curvo-me à sua proposta de vida.

Hospital Guilherme Álvaro, especialmente ao **Ambulatório de Hepatites** de onde parte dos pacientes foi selecionada para o estudo.

Ambulatório de Hepatites do HC-FMUSP, a todos os médicos deste serviço que encaminharam seus pacientes para este estudo.

Dr. Abel de La Rosa e **Dr. Slava Elagin**, pesquisadores que acreditaram e viveram a proposta deste projeto científico.

Mr. Jim Mcmenamin e **Michele Cescon Portela**, com sabedoria, amizade e profissionalismo me acompanham.

Bayer Health Care, GA, USA, pela confiança e apoio profissional de seus pesquisadores.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	21
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	22
RESULTADO.....	43
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	80
PERSPECTIVAS.....	81
ANEXOS.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

VHC	vírus da hepatite C
VHB	vírus da hepatite B
HIV	vírus da imunodeficiência humana
CDC	Centro de Controle de Doenças Americano
E	envelope
NS	região não estrutural
NC	região não codificadora
HVR	região hiper variável
cDNA	DNA complementar
ORF	fase de leitura aberta
PCR	reação em cadeia pela polimerase
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcriptase reversa
OTU	unidades taxonômicas operacionais
GDD	glicina-aspartato-aspartato
DST	doença sexualmente transmissível
U.D.	usuário de drogas

RESUMO

Cavalheiro, NP. **Hepatite C: transmissão entre casais**. São Paulo, 2004. 111p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Introdução: A ocorrência e eficiência da transmissão sexual do VHC na ausência de outros fatores de risco ainda é muito controversa. Foram investigados e analisados 24 casais, ambos cônjuges infectados com o VHC. Destes, 22 apresentaram o mesmo subtipo viral e a análise filogenética de parte da região NS5b mostrou altos índices de homologia nas seqüências entre os vírus dos casais infectados.

Objetivo: Análise da transmissão da Hepatite C entre casais heterossexuais.

Método: O estudo recrutou 45 casais. Destes, 24 foram selecionados e incluídos na pesquisa, com diagnóstico clínico e laboratorial para a Hepatite C crônica. A infecção foi diagnosticada por testes imunoenzimáticos de terceira geração e pela presença da partícula viral circulante detectada pela PCR. As amostras de sangue foram coletadas entre os anos de 1999 e 2002. Foram seqüenciadas partes das regiões 5'NC e NS5b do VHC, para determinação dos subtipos virais. Os testes utilizados para as PCRs estão disponíveis para pesquisa e foram respectivamente TRUGENE 5'NC Test (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) e Titan One Tube RT-PCR Kits (Roche Molecular, Mannheim, Germany). Para as PCRs dos seqüenciamentos foi utilizado o kit CLIP sequencing test (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). As seqüências foram analisadas com o sistema de seqüenciamento Open Gene DNA, software na Versão 3.1, biblioteca específica (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Para o alinhamento das seqüências, referentes a região NS5b, foi utilizado o programa Clustal W (Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7, June 1997) e a árvore filogenética foi gerada pelo método Neighbor Joining. Um questionário padrão e entrevistas foram usados para coleta de dados sobre fatores de risco para aquisição da doença e comportamento sexual. Os pacientes desta pesquisa foram recrutados no Ambulatório de Hepatite do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e Ambulatório de Hepatite do Hospital Guilherme Álvaro, da cidade de Santos.

Resultados: Entre os 24 casais selecionados, 22 apresentaram o mesmo subtipo viral e altas porcentagens de homologia (região NS5b) entre 93,0% e 99,4%. Os subtipos HCV apresentados foram dois (9,1%) casais infectados por 1a, nove (40,9%) com subtipo 1b, um (4,6%) com subtipo 2b e dez (45,5%) dos casais pelo subtipo HCV 3a. Os dois casais discordantes apresentaram índices de 70,1% e 82,2% e foram infectados pelos subtipos 2b e 1b, e 1b e 1a respectivamente. A média de tempo de convivência foi de 22,4 anos, variando de 2 a 45 anos e a renda per capita anual foi em média US\$2,270/ano. Com base nos questionários e entrevistas os fatores de risco apresentados pelos casais foram: 9 (37,5%) transfusão de sangue, 17 (70,8%) U.D. endovenosa e 15 (62,5%) U.D. inalatória, 4 (16,7%) acupuntura e 5 (20,8%) tatuagem. O compartilhar de utensílios de higiene pessoal relatado pelos casais apresentou altos índices e 6 (25,0%) dos casais assumiram o uso comum de escova de dente, 16 (66,7%) lâmina de barbear, 21 (87,5%) cortador de unhas e 14 (58,3%)

alicate de manicure. Os dois casais discordantes relataram fatores de risco como transfusão de sangue e U.D.

Conclusão: A alta similaridade encontrada entre as cadeias genômicas do VHC pode dar suporte a hipótese de transmissão do VHC entre esses casais. O uso compartilhado de utensílios de higiene pessoal e o tempo de convivência tornam difícil a interpretação dos dados. O uso compartilhado de utensílios de higiene pessoal pode dificultar a interpretação dos dados em relação à transmissão sexual do VHC. A hipótese do sentido mais provável de transmissão do VHC, de homem para mulher, foi reforçada neste trabalho.

ABSTRACT

Cavalheiro, NP. **Hepatitis C: transmission between couples**. São Paulo, 2004. 111p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Introduction: The occurrence and the efficiency of HCV sexual transmission in the absence of other risk factors are still very controversial. I investigated and analyzed 24 couples, both infected with HCV, of whom 22 shared the same viral subtype. A phylogenetic analysis of NS5b region showed high sequence homology among the infected couples.

Objective: Analysis of the Hepatitis C transmission between heterosexuals couples.

Methods: The study recruited 45 couples, 24 were included, with anti-HCV positive and clinical diagnosis of active chronic hepatitis. HCV infection was diagnosed by positivity of serum samples for anti HCV (third-version enzyme immunoassay) and by circulating HCV-RNA detected by Polymerase Chain Reaction (PCR). All blood samples were collected between 1999 and 2002. Sequencing of the 5'NC region was performed utilizing the research available TRUGENE HCV 5'NC Test (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Sequencing of the NS5B region was performed by RT-PCR amplification with Titan One Tube RT-PCR Kits (Roche Molecular, Mannheim, Germany) and CLIP sequencing using a prototype NS5B genotyping assay (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Sequence analysis was completed using the Open Gene DNA Sequencing System, Gene Objects software package (Version 3.1), and Gene Librarian module (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Multiple sequence alignments of the NS5B region were performed with Clustal W (Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7, June 1997), and phylogenetic trees were generated using the Neighbor Joining Method. A standardized questionnaire and interview was used to collect data concerning risk factors and sexual behaviors. Follow up of all subjects was conducted at the hepatitis clinic of the Clinical Hospital of the University of Sao Paulo and at the Hospital Guilherme Alvaro in the city of Santos, in the state of Sao Paulo, Brazil.

Results: Among the 24 couples, 22 had matching viral subtypes with homology scores (NS5b) ranging from 93.0% to 99.4%. Of the 22 couples with matching subtype, two (9.1%) were infected with subtype 1a, nine (40.9%) with subtype 1b, one (4.6%) with subtype 2b and ten (45.5%) with subtype 3a. The two couples that did not show matching viral subtypes had scores of 70.1% and 82.2%, and were infected with subtypes 2b and 1b, and 1b and 1a, respectively. The average of duration of marriage was 22.4 years (range 2-45 years) and the per capita income was an average of US\$2,270/year. Based on the questionnaire and interviews, cause of infection of the 24 couples could be attributed to: blood transfusions 9 (37.5%), drug use, I.V. 17(70.8%) and inhalation 15 (62.5%), acupuncture 4 (16.7%) and tattooing 5 (20.8%). Shared hygienic utensils showed a much higher correlation of possible route of transmission, and are better explained by the sequence homology data than by the other associated risk factors. A total of 6 (25.0%) couples shared

tooth brushes, 16 (66.7%) shared shaving blades, 21 (87.5%) shared nail clippers and 14 (58.3%) shared manicure cutters. The two couples that had different subtypes, both of them related transfusion blood and I.V. drug use.

Conclusions: The high similarity found among the genome chains of HCV supports the hypothesis of transmission between these couples. The shared use of personal hygiene utensils and the amount of time spent living together made it difficult to interpret the data. Also, the shared use of personal hygiene utensils can make it difficult to interpret the data in relation to the sexual transmission of HCV. The hypothesis in relation to the direction of the HCV transmission, from man to woman, was reinforced in this work.

INTRODUÇÃO

Os pacientes infectados pelo VHC muitas vezes questionam se podem transmitir a infecção para seus parceiros sexuais e se existe a hipótese de terem adquirido o VHC através de relações sexuais. O senso comum poderia sugerir que o VHC, como o VHB e o HIV, pode ser transmitido pelo contato sexual, porém, qual seria esse risco? Depende da população estudada? Comportamentos de risco podem alterar o potencial de contaminação? (1 - 3)

Classicamente, a exposição parenteral reúne fatores de risco para o VHC relevantes como o uso de drogas ilícitas endovenosas, hemodiálise, transfusão de sangue e hemoderivados, tatuagem, transplante de órgãos, acupuntura, uso compartilhado de canudo para uso de droga inalatória e acidentes perfuro-cortantes envolvendo profissionais da área da saúde. (4 - 11)

Evidências convincentes sobre a transmissão sexual do VHC requerem uma história de convivência com atividade sexual, ausência de outras oportunidades para infecção e evidências genéticas do vírus, mostrando que ambos parceiros estão infectados por vírus de seqüências genômicas muito próximas. A posse de informações de qualidade sobre estas questões pode nos ajudar a responder sobre o

assunto. Porém, poucos trabalhos preenchem estes critérios satisfatoriamente. (1, 12, 13)

Alter MJ et al. 1989, apresentaram o primeiro trabalho, onde a possibilidade de transmissão sexual do VHC foi discutida e evidenciada como fator de risco múltiplos parceiros sexuais. Porém, a contribuição da transmissão sexual do VHC permanece controversa. Nos Estados Unidos da América o CDC (Center for Disease Control and Prevention) estima que entre 20%-25% dos índices de transmissão estão associados com contato sexual, mas os números discutidos em todo o mundo, envolvendo diferentes populações estudadas oscilam. (14 - 16)

As informações que circulam sobre transmissão sexual do VHC, variam muito e os números relatados estão entre 0% e 27%. Porém a grande maioria dos estudos menciona porcentagens entre 0% e 3%. Os baixos índices relatados, associados com raros fatores de risco, sugerem que a transmissão sexual apresenta riscos mínimos ou mesmo inexistentes. (1, 2, 4, 17 - 19, 20)

Os trabalhos que discutem populações específicas, como clínicas de doenças sexualmente transmissíveis, atendimento a usuários de drogas, homossexuais e profissionais do sexo, mostram achados que diferem da população em geral e os riscos de transmissão para o VHC aumentam consideravelmente. (1, 3, 10, 12, 15, 21 - 25)

Ao analisar uma coorte de 1.038 homossexuais masculinos, Bodsworth NJ et al. 1996, encontraram 7,6% de positividade para o anti-VHC e sugerem a possibilidade de que a supressão imunológica causada pelo HIV possa ter sido um facilitador para a aquisição da infecção. Autores como Filippini P et al. 2001, afirmam que o risco de transmissão sexual é maior na co-infecção HIV-VHC. (2 - 4, 11, 20, 24 - 27)

Em artigo de revisão, Bonacini M et al. 2000, apresentam duas versões opostas; a primeira que parceiros sexuais de pacientes portadores de co-infecção HIV/VHC apresentam risco maior de contrair o VHC quando comparados com parceiros de sorologia negativa para o HIV e positiva apenas para o VHC. A segunda versão onde o risco de transmissão sexual do VHC, nesta população de pacientes co-infectados HIV/VHC não se altera ou é muito baixo. (28)

No Canadá, ao se investigar o risco de transmissão sexual do VHC e HIV entre usuários de drogas não injetáveis e seus parceiros sexuais de grupos de “baixo risco”, mostrou que estes pacientes apresentam um potencial de transmissão pela via sexual para o VHC. (29)

Agora, pensando sobre os pacientes atendidos em serviços de hepatologia, que não pertencem a grupos de risco, mas são portadores do VHC e seus parceiros sexuais. Qual seria o risco de seus parceiros não concordantes serem infectados por via sexual? Esta questão deve ser considerada e avaliada cuidadosamente. (1, 17)

Outra população que nos gera grande curiosidade seria a que não apresenta fonte definida para aquisição do VHC, em média 30%-40% dos pacientes. Provavelmente a transmissão sexual, assim como outras formas de contato humano possam ter um papel significativo dentro desta comunidade. Na Austrália onde foram avaliadas notificações de casos de Hepatite C, os fatores de risco relacionados com transmissão sexual apresentaram índices menores que 2%. Outro grupo australiano menciona que a soropositividade entre parceiros sexuais foi maior que entre outros contactantes não sexuais, moradores no mesmo domicílio. (2, 22, 27, 30 - 33)

Neumayr G et al. 1999, após avaliarem apenas o genótipo entre 8 casais, relataram 2 concordantes, sendo que apenas 1 não apresentou outro fator de risco

evidente, mostrando que a transmissão sexual é possível, mas infreqüente para cônjuges monogâmicos de pacientes portadores crônicos do VHC e os riscos parecem não estar relacionados com a intensidade e duração da relação sexual. Kao JH et al. 1996 encontraram o índice de 17% entre 100 casais anti-VHC positivos. Destes, 11 apresentaram o mesmo genótipo 1b. (31, 34, 35)

Tanaka K et al. 1997 observaram que esposas de parceiros sexuais portadores do VHC apresentam risco duas vezes maior de contrair a doença que as esposas de parceiros VHC negativo. Soto B et al. 1994, em estudo multicêntrico, avaliaram 423 parceiros heterossexuais, com caso index reativo para anti-VHC e sugerem que a infecção pode ser transmitida sexualmente, mas com pouca eficiência. Porém a co-infecção pelo HIV pode aumentar estes valores. Marincovich B et al. 2003, ao avaliarem uma coort de 171 casais heterossexuais, inicialmente soro-discordantes para o VHC e HIV, sugerem que a transmissão sexual do VHC é extremamente baixa ou mesmo nula e nenhum casal desta população estudada soroconverteu positivamente para o VHC. (15, 17 - 19, 36 - 38)

A transmissão sexual e intrafamiliar do VHB têm sido bem documentadas, mas a mesma questão para o VHC parece não estabelecida. Lembramos também que comparativamente, a transmissão do VHB e do HIV são consideravelmente maiores que do VHC, porém o número de pessoas que podem adquirir a Hepatite C pela rota sexual não deve ser negligenciado. (3, 9, 12, 33, 35, 39 - 42)

A comparação entre parceiros sexuais e outros familiares moradores do mesmo domicílio, tendo um paciente portador do VHC como referência, mostra que o contato intrafamiliar é um fator importante na discussão da transmissão do VHC.

Hábitos culturais diferem de uma população para outra e podem interferir nos resultados de estudos epidemiológicos que envolvam a transmissão do VHC.

Para Diago M et al. 1996, a positividade do anti-VHC para parceiros sexuais de casos index foi de 7,6% (30/394) e de 3,3% (34/1057) para outros membros da família moradores no mesmo domicílio. (43)

Chang TT et al. 1994, entre 307 famílias de pacientes portadores do VHC, 28% apresentaram cônjuges com positividade para o anti-VHC, que foi mais alto comparando-se com crianças (6,9%) e outros contactantes (6,4%) ($p < 0.001$). A positividade anti-VHC foi de 23% em maridos que apresentaram esposas como caso índice e de 29% em mulheres que apresentaram maridos com caso index. (39)

A identificação, os meios de transmissão e a determinação da prevalência do VHC entre membros familiares são importantes no que se refere à prevenção da disseminação da infecção pelo VHC em áreas endêmicas. (44)

Egito, área endêmica de infecção pelo VHC. Nesta população foram investigadas 669 parturientes. Destas, 94 foram positivas em testes para detecção de anticorpos anti-VHC e posteriormente, 35 seqüências genômicas do VHC foram genotipadas e a homologia entre elas determinada. Sendo assim, 33 destas apresentaram o mesmo genótipo (28-1b e 5-2b); 30 apresentaram similaridade de 100%, dois 97% e um 91%. Foi seqüenciada a região NS3 do genoma VHC. O índice de crianças foi baixo comparando-se aos casais. Neste trabalho a transmissão sexual parece ter um papel importante na transmissão intrafamiliar do VHC. (45)

Okayama A et al. 2002, avaliaram no Japão 973 pessoas em área considerada endêmica para VHC e 23% apresentaram anti-VHC positivo. Esta população foi acompanhada e no período de 11 meses 14 cônjuges soroconverteram. Destes, 5

tinham história de cônjuge portador da infecção pelo VHC e 6 não. Estatisticamente não houve correlação e a transmissão sexual não foi considerada nesta população.

(46)

Ao avaliar 109 casos VHC, na Korea, Kim YS et al. 1998, diagnosticaram apenas um cônjuge e nenhuma criança VHC positivo, concluindo que a infecção pelo VHC no núcleo familiar parece não ocorrer. (47)

Um relato de transmissão intrafamiliar na Itália, menciona 8% de positividade entre familiares de pacientes VHC positivo, contra menos de 1% da população geral. Outro estudo, oriundo de pesquisadores do CDC, menciona 22,6% como risco de aquisição de infecção sexual e contactantes familiares, após avaliarem 206 pacientes portadores do VHC. (48, 49)

Hou C-H et al. 1995, avaliaram esposas de pacientes em hemodiálise e observaram um aumento no risco de infecção pelo VHC, comparado ao risco de outros familiares moradores do mesmo domicílio. (50)

De Mercato R et al. 1996, diferentemente de outros estudos, não encontraram positividade nas crianças que convivem no mesmo domicílio de pacientes com VHC, porém as esposas apresentaram positividade de 22,2% na mesma população. Concluem que a transmissão sexual não deve ser excluída e que altas prevalências foram associadas com o tempo de convivência. (32)

A questão de tempo de convivência entre os casais para justificar a transmissão sexual do VHC é outro tema polêmico que devemos ressaltar. A literatura traz relatos divergentes e convincentes discutindo tanto a infecção aguda quanto crônica onde a possibilidade de transmissão sexual é colocada em evidência.

Rooney G & Gilson RJC 1998, relatam em artigo de revisão, uma estimativa de risco associado á infecção pelo VHC de 1.5 (IC 1.05-2.2) por década de casamento, além de que mulheres com parceiros VHC positivo apresentam 3,7 vezes mais chances de contrair a doença. Neste trabalho fica evidente que, somado ao contato familiar e o comportamento sexual, o compartilhar de utensílios pessoais como lâmina de barbear, escova de dente, cortador de unhas e alicate de manicure, podem ser importantes na transmissão intrafamiliar da Hepatite C. (4, 10, 12, 24, 32, 34, 44, 51 - 58)

Um percentual de 8,43%, para 83 parceiros sexuais estudados, foi encontrado por Scotto G et al. 1996. Curiosamente, nenhum parceiro de 10 pacientes submetidos à diálise apresentou positividade para anti-VHC. Cônjuges de pacientes com doença crônica do fígado foram 5 em 31 (16,12%) e de pacientes anti-VHC foram 2 em 42 (4,76%). (59)

Stroffolini T et al. 2001, concluíram que apesar de 8/13 casais apresentarem o mesmo tipo viral, a transmissão sexual foi considerada baixa e o compartilhar de seringas aparece como uma rota mais eficaz na transmissão do vírus entre os casais. A filogenia destas seqüências também poderia esclarecer, sua origem e semelhança. (7, 34, 39, 44, 60 - 62)

A questão da necessidade de longos períodos de convivência para aumento do risco de transmissão sexual do VHC foi abalada pelo relato de Capelli C et al. 1997, onde uma doadora de repetição anual foi abordada com a positividade da PCR-VHC, entre duas doações. Ela admitiu a convivência com parceiro sexual, portador crônico do VHC. A similaridade dos vírus entre o casal foi de 93,4% (região E2/NS1). Nenhum outro fator de risco foi observado. (63, 64)

Outro relato, com fortes indícios de transmissão sexual em curto período, onde a convivência de uma mulher com um parceiro sexual VHC positivo, mostrou dupla infecção, tipos 2 e 4, em ambos cônjuges. Este foi o primeiro caso publicado de transmissão de dois diferentes tipos do VHC. (54)

Em defesa da necessidade de longos períodos de convivência para justificar a transmissão do VHC, Hershov RC et al. 1998, encontraram significativos fatores de risco para a infecção pelo VHC quando mencionado sexo promíscuo, parceiro U.D., DST associada, sexo pago e convívio de longa duração (> que 10 anos) com parceiro VHC positivo. (65)

A transmissão sexual do VHC envolve uma gama de pontos que devem ser somados e considerados quando se fala do assunto, entre eles o número de parceiros.

Mele A et al. 1999, discutiram o número de parceiros sexuais na transmissão do VHC, e o risco encontrado foi 2,0 vezes mais alto para quem relatou dois parceiros sexuais e 2,8 para três. Estes grupos foram comparados com relatos de menos de dois parceiros e sugerem que a transmissão sexual pode ter um importante papel na transmissão da Hepatite C na Itália. (10, 25, 40, 66, 67). Também Salleras L et al. 1997, relacionam número de parceiros sexuais com o aumento do risco de transmissão do VHC, este risco foi 14 vezes maior naqueles com 4 parceiros ou mais, três vezes para os que relataram 2 ou 3 parceiros. O risco foi comparado com pacientes que mencionaram apenas um parceiro sexual. Os autores mencionam que a transmissão sexual deve ser considerada como modo de transmissão do VHC para aqueles pacientes que não apresentaram nenhuma outra exposição parenteral. (2, 10, 20, 22, 25, 41, 60, 66, 67)

No Brasil, existem poucos relatos sobre a transmissão sexual do VHC entre os mais evidentes podemos citar Tengan, FM et al. 2001, avaliaram 154 doadores de sangue que apresentaram reação sorológica positiva para o VHC e seus parceiros sexuais. Nesta população, 11,76% dos parceiros foram considerados, atualmente ou previamente, infectados pelo VHC. Sugerindo que a alta prevalência da infecção entre estes parceiros poderia ser atribuída, pelo menos em parte, a transmissão sexual. Neste trabalho os autores sugerem a análise das seqüências virais entre os casais avaliados. Também Souto B et al. 1994, que objetivaram a importância dos fatores de risco para aquisição da infecção pelo VHC para 780 habitantes da região Sul Amazônica, não notificaram sinais de que a transmissão sexual contribuísse na prevalência de 2,4% de anti-VHC encontrada. Um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, constatou a prevalência de 20, 2% de casais RNA-VHC positivos, a partir de um dos cônjuges já sabidamente infectado pelo VHC. Houve concordância genotípica do VHC em 16 dos 20 casais estudados, com maior frequência de genótipo 1. (6, 11, 13, 16, 68)

Mesquita PE et al. 1997, trabalharam com uma população brasileira de prostitutas e seus clientes, analisando os fatores de risco associados com a transmissão da hepatite C, sugerindo um importante papel da transmissão sexual na epidemiologia do VHC, principalmente quando o comportamento sexual promíscuo entra em cena. A prevalência do VHC nesta população foi de 15,3%, este índice gira em torno de 2,2% para bancos de sangue. Os autores concluem que a transmissão sexual tem um importante papel na manutenção da infecção pelo VHC na espécie humana. Passos EP et al. 2002, concluíram que a transmissão, sexual e perinatal,

foram baixas entre os 409 pacientes avaliados em clínica de reprodução assistida. (13, 38, 44, 69, 70)

Ainda sobre o número de parceiros sexuais, agora envolvendo um grupo de risco importante como o de sexo pago, mostram números que diferem da população em geral. No Japão, de 244 prostitutas testadas para o VHC, 10,1% apresentaram positividade sorológica, enquanto que mulheres recrutadas em bancos de sangue apresentaram 0,8%. Também foi constatado que quanto mais anos de trabalho, maiores as chances de contrair o vírus. Neste estudo também foi citado que o índice de soroconversão do VHC foi de 0,5%/ano, um valor menor que para o anti-HBc que foi de 1,8%/ano. Os autores recomendam atenção ao risco de transmissão sexual do VHC entre grupos que estejam relacionados com alta atividade sexual. Ainda mencionam que pacientes do sul europeu e japonês parecem apresentar um risco maior para a transmissão sexual do VHC. (2, 21, 22, 71)

Laurent C et al. 2001, na República do Congo afirmam que a transmissão sexual do VHC, entre prostitutas desta população, não tem papel relevante encontrando apenas um aumento significativo entre as mulheres que apresentaram pelo menos uma DST associada. (72)

Outra questão, que pode estar relacionada à transmissão sexual do VHC seria a presença de vírus nas secreções, sêmen, saliva e sangue menstrual. Alguns trabalhos levantam a questão e discutem o sentido mais provável de veiculação da infecção, se homem para mulher ou de mulher para homem. O VHC tem sido isolado em ambos, sêmen e secreção vaginal, porém sugerem que existe um potencial maior de transmissão no sentido homem para mulher. Certamente, traumas na mucosa durante o intercurso sexual aumentam os riscos de transmissão viral assim como altos níveis

de viremia e a PCR positiva no sêmen. Devem-se considerar também as dificuldades técnicas relacionadas a PCR-VHC em sêmen que podem na verdade mascarar um diagnóstico positivo. (12, 57, 73)

O sêmen de 35 homens foi avaliado e 5 de 35 apresentaram PCR-HCV positiva. Para Cassuto NG et al, 2002, como para outros autores, existem dificuldades de se transpor os inibidores presentes no manuseio destas amostras durante a PCR-VHC, observando que os resultados podem ser falso-negativos. (74)

Silverman AL et al. 1994, examinaram o sangue menstrual de 10 mulheres cronicamente infectadas pelo VHC e todas as amostras apresentaram VHC-RNA positiva. O estudo sugere um mecanismo que pode ser uma possível rota de transmissão sexual mulher-homem da infecção pelo VHC. (51, 71)

Curiosamente, ao se avaliar as possíveis conseqüências de um acidente onde mulheres que receberam anti-D Imunoglobulina contaminada com o vírus da Hepatite C, Meisel H et al. 1995 resgataram, após 10-15 anos, 94 maridos destas mulheres e não foram encontradas evidências de transmissão do VHC nestes homens. Este trabalho reforça a hipótese de que a infecção no sentido mulher-homem é muito menor que o sentido oposto para casais heterossexuais. (75)

A presença do VHC em saliva e o seu risco de transmissão foi avaliado por Fabris P et al. 1999, que concluíram que a presença do VHC neste fluido corpóreo representa uma condição necessária, mas não suficiente para a transmissão do VHC. O estudo demonstrou a presença de vírus nas frações de saliva, em altas proporções para pacientes portadores crônicos do VHC, porém, estes achados não foram associados com um aumento no risco de transmissão da Hepatite C entre parceiros sexuais. (76)

Estudos epidemiológicos com respaldo virológico, tratando de transmissão sexual do VHC não são muito comuns na literatura e os trabalhos existentes, na sua maioria apresentam casuística pequena ou relatam transmissão aguda de casos isolados. A região do vírus estudada também varia de trabalho para trabalho. (12)

Thomas DL et al. 1995, investigaram evidências de transmissão sexual do VHC, em clínica de doenças sexualmente transmissíveis (DST) de Baltimore e o grau de homologia, quando avaliado o domínio hipervariável (HVR 1) na junção entre as regiões E1 e NS1/E2 do VHC foi, para 3 casais, 94,4% quando comparadas com amostras randomicamente selecionadas que apresentaram valores significativamente inferiores de 82,4%. A homologia destas seqüências indica uma fonte comum de infecção do VHC, sugerindo fortemente a transmissão sexual. Observou-se também que mulheres que apresentavam parceiros VHC positivos apresentaram índice 3,7 vezes maior de infecção que as de parceiros VHC negativos. (77)

Também Morsica G et al. 2001, ao avaliarem um caso de infecção aguda por VHC, mostraram 94,9% de similaridade na região E2/VHC, onde a única e provável fonte de transmissão foi sexual. (78)

Chayama K. et al. 1995, analisaram a região E1/VHC de 8 casais que apresentaram o mesmo genótipo, para 5 destes a análise filogenética mostrou alta similaridade >97% e números mais baixos para outros 3, entre 91-92%. Os autores concluem que estes dados sugerem fortemente a ocorrência de transmissão do VHC entre estes casais. (79)

Williams IT e Alter MJ 2003, pesquisadores do Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (CDC), Divisão de Hepatites Virais, acompanharam 263 casos de Hepatite C aguda e 13% destes reportaram exposição sexual como única

fonte de risco para aquisição da doença. Amostras de soro de 7 entre 24 parceiros positivos foram analisadas e 5 apresentaram concordância no genótipo e a identidade na seqüência genômica de 97,8% a 99,3%. As relações encontradas entre estes cônjuges suportam que a atividade sexual como um modo de transmissão do VHC. (73)

Piazza M et al. 1997, acompanharam 884 casais, sendo critério de inclusão a PCR-HCV negativa para os cônjuges dos pacientes crônicos de Hepatite C. No período de dois anos e meio, estes parceiros sexuais foram acompanhados e 7 destes cônjuges passaram a positivo pela reação da PCR-VHC. A porcentagem de similaridade para a região 5'NC foi de 100% e 70% para um fragmento da HVR 1, entre 4 destes casais. Este trabalho conclui que a Hepatite C é transmissível sexualmente. (80)

Ross RS et al. 1999, ao avaliar um casal cujo estudo filogenético entre os vírus resultou em 100% de similaridade, foi considerada a região do Core-VHC, mencionam que os resultados do inquérito epidemiológico e a análise do genoma viral são peças complementares para se evidenciar as possibilidades de transmissão sexual do VHC. (2, 81)

A homologia entre as seqüências genômicas apenas sugere uma mesma fonte de infecção em ambos parceiros, porém não permite confirmar onde ou como a infecção foi contraída, se por uma fonte externa como o compartilhar de utensílios de higiene pessoal ou se no intercurso da relação sexual. (12, 25)

Virologia:

A classificação precisa do VHC ainda não é definitiva, mas está atualmente colocado na família Flaviviridae, como um gênero separado dos Flavivírus e Pestivírus, pois, apesar de apresentar uma estrutura genômica geral semelhante a estes, no que se refere à seqüência, o VHC não se aproxima muito de nenhum deles. Para este novo gênero, foi proposto recentemente o nome Hepacivírus. (82 - 87)

A seqüência completa do VHC foi determinada pelo isolamento de vários clones de DNA complementares (cDNA) através de hibridações com clones que se justapunham. O vírus possui genoma de RNA fita simples de polaridade positiva com cerca de 9.400 nucleotídeos ou 3.011 aminoácidos. Nesta seqüência, encontra-se uma única longa fase de leitura aberta (ORF, do inglês open reading frame) que compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína de pouco mais de 3.000 aminoácidos. (82 - 88)

O genoma do VHC, apresenta em suas extremidades as regiões 5'NC e 3'NC (NC-não codificadora) e a poliproteína precursora é processada em diversas proteínas individuais através da ação de proteases virais e celulares. As proteínas estruturais do VHC estão assim representadas pelo Core (C), ou proteína do nucleocapsídeo e proteínas do envelope viral, "E1" e "E2/NS1", estas proteínas parecem estar ligadas a funções específicas como fusão com a membrana celular e escape imune. As proteínas não-estruturais (NS), NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b, parecem estar mais envolvidas com o ciclo de replicação viral. (FIGURA 1). (82 - 87)

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO GENOMA DO VHC

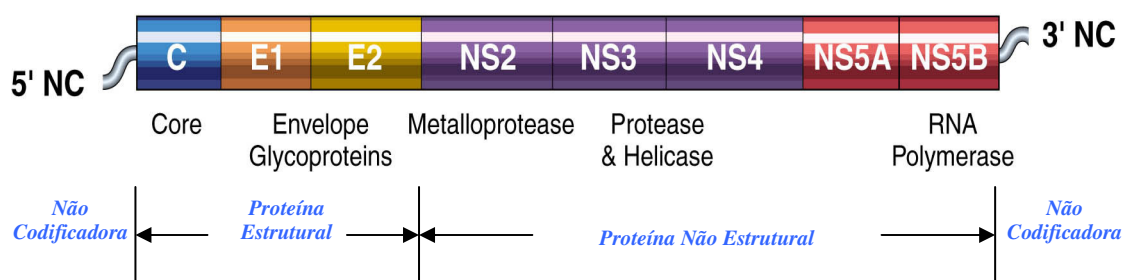
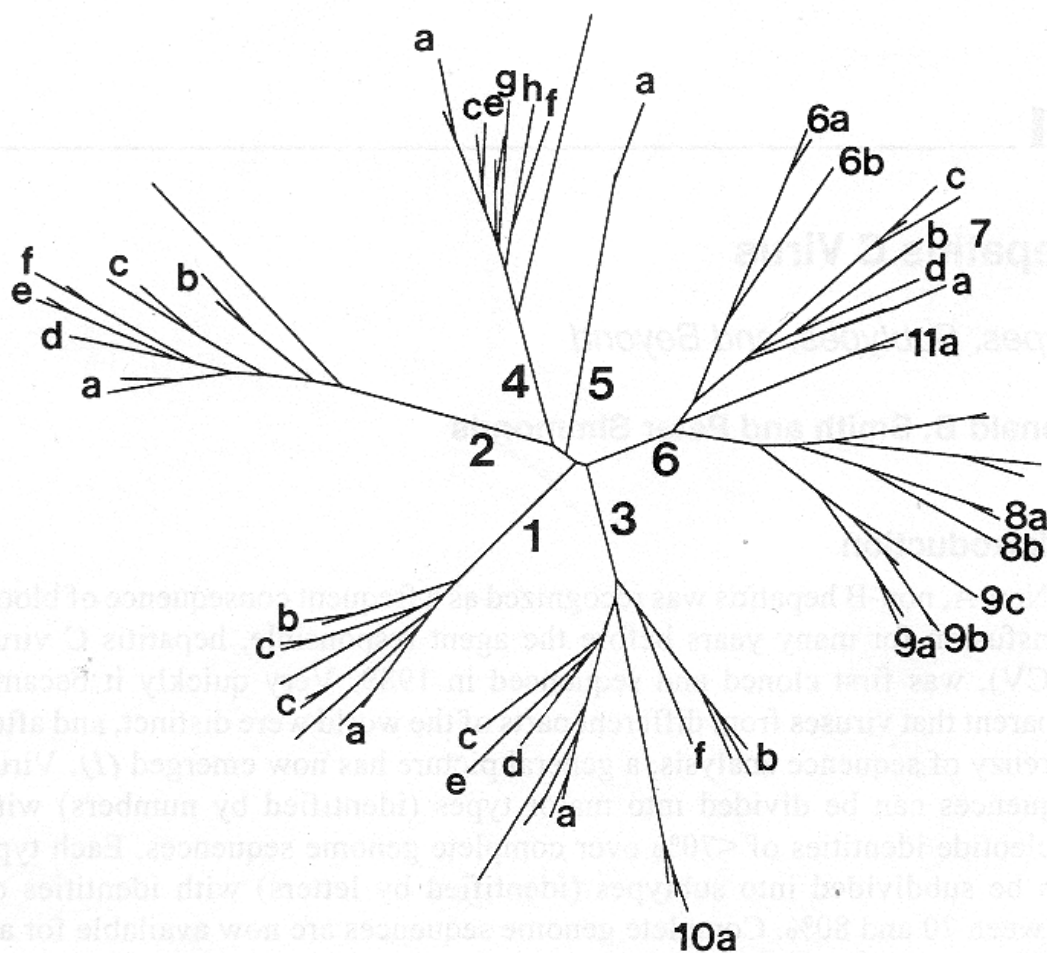


Figura 1: Esquema do genoma do VHC, apresentando as regiões não codificadoras 5'NC e 3'NC; estruturais, Core (C), e do envelope E1, E2 e não estruturais NS2, NS3, NS4, NS5a e NS5b.

Para padronizar as várias nomenclaturas descritas em diferentes centros de pesquisa do mundo, um sistema único de classificação dos genótipos do VHC tem sido proposto. A comparação das seqüências da região NS5 do VHC de variantes de diferentes partes do mundo foram avaliadas e estabeleceu-se que as seqüências genômicas com similaridade menor que 72% com alguma seqüência conhecida, evidencia a existência de um novo genótipo. Entre aqueles considerados de um mesmo subgrupo (subtipo) o grau de similaridade varia entre 75% e 86% (média 80%); os isolados individuais, para cada um dos grupos apresentados tem 88% de similaridade. Os tipos do VHC devem ser identificados por numerais arábicos para evitar confusão com nomenclaturas anteriores, para os subtipos a indicação se faz por letras minúsculas, ambos por ordem de descoberta. Seis genótipos (1, 2, 3, 4, 5, 6), apresentando entre 2 e 3 subtipos (a, b, c) para alguns destes genótipos, tem sido sugeridos como padrão de nomenclatura para os VHC. (89 - 92)

FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO OS TIPOS DE 1 A 6 DO VHC E SEUS SUBTIPOS



GENÓTIPOS - ramos maiores
 SUBTIPOS - ramos menores (91)

O tempo e a origem dos tipos do VHC são muito difíceis de serem estimados devido à saturação das substituições nucleotídicas, mas provavelmente tenham ocorrido entre 500 e 2000 anos atrás. Recentemente, vários estudos têm revelado que o VHC exibe uma heterogeneidade considerável em sua estrutura molecular, provavelmente como resultado de pequenos erros na replicação e de mutações espontâneas que ocorrem no genoma. A média de mutações do genoma do VHC em um único indivíduo infectado tem sido estimada entre 1 e 2×10^{-3} trocas/sítio/ano e tem-se observado um alto índice de variação na extremidade 5' do genoma que

codifica a porção N terminal da glicoproteína E2 – Região Hipervariável 1(HVR1). (25, 93, 94)

O genoma do VHC apresenta padrões distintos de variabilidade e heterogeneidade ditados pelas funções do próprio vírus e pela pressão imunológica do hospedeiro. As regiões 5'NC, NS4 carboxi terminal e o Core são consideradas as mais conservadas, enquanto o Envelope, em destaque a região E2 hipervariável (HVR 1) que apresenta maior grau variação sendo a eleita para estudos de quasispécies. As NS2, NS4 região epítotope, NS5a e 3'NCR exibem maior variabilidade quando comparadas com a média de outras regiões do genoma. Com base nestas diferenças, podemos citar percentagens entre os subtipos isolados, 1a, 1b, 2a, 2b 3a e 3b. (TABELA 1). (88)

TABELA 1 - NÍVEIS DE HETEROGENEIDADE POR REGIÃO DO GENOMA DO VHC, CONSIDERADAS AS PORCENTAGENS ENTRE OS TIPOS E SUBTIPOS 1a, 1b, 2a, 2b, 3a e 3b

REGIÃO	SUBTIPOS VHC	GENÓTIPOS VHC
5'NCR	1 - 3,3	5,5 - 12,3
Core	9,0 - 13,0	15,7 - 19,8
E1	24,2 - 30,7	33,3 - 45,7
E2	23,7 - 29,2	29,5 - 36
NS2	26,0 - 32,0	40,0 - 45,2
NS3	20,0 - 23,0	29,8 - 32,0
NS4	10,3 - 24,7	29,7 - 40,5
NS5a	23,7 - 30,0	35,3 - 31,5
NS5b	16,5-20,1	29,0 - 31,5
3'NCR	14,2 - 38,8	30,3 - 73,9

A região 5'NC inicia o genoma e compreende os aminoácidos –341 a –1 (341 bases), trata-se de uma região altamente conservada que apresenta estruturas típicas

de ligação com o processo de entrada no ribossomo e provavelmente estão vinculadas com a replicação viral. (88)

A proteína não-estrutural NS5b, de seqüência razoavelmente conservada, possui o motivo característico GDD (Glicina-Aspartato-Aspartato) característico de RNA replicase (RNA-polimerase RNA-dependente) presente em todos RNAs vírus. Está localizada entre as regiões NS5a e 3'NC na posição 7601 até 9374 (aminoácidos 2.421 e 3011 somando 591aa). Possui especial predileção para ligação com segmentos de poli U, presente na extremidade 3'UTR do VHC. A ligação específica de uma estrutura secundária com a extremidade 3' do genoma viral garante a iniciação da replicação do genoma completo a partir de 3'UTR. A determinação precisa da estrutura indispensável do substrato para a ligação com NS5b é fundamental para que inibidores efetivos da RNA polimerase do VHC sejam desenvolvidos. Alguns inibidores desta polimerase também foram relatados e estes compostos podem ser os primeiros de uma nova série de drogas antivirais para o VHC. A proteína NS5b tem sido expressa em células de insetos e tem demonstrado ser capaz de sintetizar a fita de RNA complementar sem a participação de outras proteínas do vírus. (82, 83, 87, 88, 95)

O conceito de filogenia surgiu com Darwin, junto com o próprio conceito de ancestralidade entre as espécies, e é seu o primeiro diagrama publicado representando relações filogenéticas. Cerca de 100 anos após a proposição de Darwin, o entomólogo alemão Willi Hennig criou um método de reconstrução das relações de parentesco entre grupos de organismos e também uma escola de classificação em conjunto, chamada "Sistemática Filogenética". (96, 97)

Uma árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos nela presentes constituindo, graficamente, de pontos (ou nós) ligados por linhas (ramos ou clados). Os táxons podem ser famílias, gêneros, espécies ou populações, ou seja, qualquer nível taxonômico sobre os quais se deseje inferir a história evolutiva e, com frequência, são chamados também de unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Árvores filogenéticas têm dois tipos de nós, os internos e os terminais. Os nós terminais representam as OTUs estudadas, unidos por ramos cujo nó interno representa o ancestral comum mais recente desses táxons. Na filogenia molecular, os dados são as seqüências e seus respectivos caracteres e estados de caracteres. (96)

Para a obtenção de uma árvore filogenética, faz-se necessária à escolha de algoritmos. Existem dois tipos básicos de algoritmos: os Exatos e os Heurísticos. No algoritmo Heurístico, temos o “Branch-swapping”, que foi desenvolvido para casos em que se analisa um grande número de táxons, promovendo rearranjos em uma dada árvore inicial; a melhor entre todas as construídas é a escolhida. Existem formas para se re-arranjar a árvore inicial, entre elas o “nearest neighbor interchange” ou troca de vizinhos mais próximos (parte do programa PHILIP). OTUs que aparecem separadas por apenas um ramo interno são trocadas de lugar e a cada troca, escolhe-se no final a melhor das árvores reconstruídas. Esse método faz parte do grupo de métodos de evolução mínima, no qual a árvore com a menor soma total de ramos é a procurada. (96)

Quando os caracteres utilizados apresentam muitas homoplasias (ou seja, quando as divergências entre os táxons estudados são pequenas), é possível obter filogenias corretas e fidedignas. (96)

Na questão do alinhamento, o objetivo é fazer com que a posição (sítio) de cada base (ou aminoácido) que esteja sendo comparada entre as seqüências consideradas seja homóloga. Existem diversos programas de computador para alinhar seqüências de aminoácidos e nucleotídeos, entre eles o programa Clustal W, originalmente descrito por Desmond G. Higgins. O resultado final do alinhamento é, na realidade, um excelente indicador de quão adequado é o seu gene para o problema filogenético específico. (96, 98)

Seqüências alinhadas de nucleotídeos ou de aminoácidos podem ser comparadas quantitativamente, através de vários modelos que refletem sua semelhança. Em seqüências homólogas, ou seja, quando se trata de trechos de DNA com origem comum, as diferenças entre elas originaram-se a partir de mutações que ocorreram em linhagens que se diversificaram a partir de seu ancestral comum. As diferenças, que podem ser expressas na forma de valores ou distâncias, podem ser utilizadas para a inferência de filogenias. (96)

OBJETIVO

Analisar a transmissão do VHC entre casais heterossexuais infectados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Seleção de Pacientes

No período compreendido entre Janeiro de 1999 a Dezembro de 2002, 45 casais heterossexuais com diagnóstico clínico e laboratorial para infecção pelo VHC foram recrutados. Destes 24 foram eleitos para o estudo sendo selecionados treze no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas do HC-FMUSP e onze no Ambulatório de Hepatites do Hospital Guilherme Álvaro, na cidade de Santos, São Paulo.

O ambulatório de Hepatite do Hospital das Clínicas iniciou suas atividades no ano de 1987, tornando-se um serviço de referência para o encaminhamento de pacientes com diagnóstico de hepatite viral. Atualmente inscritos cerca de 4.000 pacientes, sendo aproximadamente 800 em tratamento ou atendimento contínuo. A maioria destes com diagnóstico de infecção atual ou pregressa de Hepatite C.

O ambulatório de Hepatite do Hospital Guilherme Álvaro, localizado na cidade de Santos, atende a população de outros oito municípios da baixada santista: Guarujá, Itanhaém, São Vicente, Praia Grande, Bertioga, Mongaguá, Peruíbe e Cubatão. Tendo iniciado suas atividades em 1996, é também um hospital de referência para o encaminhamento e atendimento das hepatites virais. O ambulatório

tem registrado cerca de 2.500 pacientes e destes, perto de 500 estão em atendimento e/ou tratamento da Hepatite C atualmente.

1.1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram critérios de inclusão a presença do RNA-VHC pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em ambos os cônjuges e ausência de co-infecção pelo HIV e pelo HBV.

2. Estudo Realizado

2.1. Entrevistas

Os pacientes foram entrevistados privadamente, utilizando-se um questionário padronizado (ANEXO 1) sobre dados demográficos e fatores de risco para a aquisição do VHC. As questões relevantes utilizadas nas análises deste trabalho foram: idade, sexo, tempo de convivência (em anos) e número de relações sexuais mantidas pelos casais ao mês. Assim como fatores de risco para aquisição da doença como transfusão de sangue, uso de drogas injetáveis e inalatórias, acupuntura e tatuagem. Os casais também foram questionados quanto a fatores de comportamento dentro do domicílio, especialmente foram coletadas informações sobre o uso compartilhado de utensílios de higiene pessoal, uso comum de escova de dente, lâmina de barbear, cortador de unhas e alicate de manicure. As entrevistas foram feitas entre os anos de 2001 e 2002.

2.2. Coleta de sangue

O sangue dos pacientes foi coletado por punção venosa a vácuo, com uso de tubo seco de 10ml. Destas amostras foram separados os soros, em prazo máximo de 4 horas após colheita, por centrifugação a 1.500 rpm/10min. aliquotados e conservados a -70°C até o uso.

2.3. Análise Laboratorial

Para triagem, foi avaliada a presença de HCV-RNA em soro pela Nested-PCR, teste qualitativo. Posteriormente, se positivas, as amostras foram genotipadas. Avaliou-se as regiões 5'NC e NS5b do VHC nos testes de genotipagem. Para os casais que apresentaram o mesmo genótipo e subtipo, as seqüências virais foram analisadas filogeneticamente.

A Nested PCR-HCV de triagem inicial foi realizada no Laboratório de Hepatite (LIM-47) do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras sabidamente positivas foram genotipadas e analisadas filogeneticamente no Laboratório de desenvolvimento e pesquisa da Bayer Health Care Diagnostics, Atlanta, GA, USA.

3. Testes Laboratoriais Utilizados

3.1. Reação em Cadeia pela Polimerase para o VHC (Nested-PCR)

Região 5'NC – VHC

O teste da nested PCR-HCV, método "in-house", que tem por base a região

5'NC do genoma do VHC, foi realizado no Laboratório de Hepatite (LIM 47) do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP. Os casais que apresentaram esta reação positiva foram selecionados para a participação no estudo.

Para a PCR, foram utilizados iniciadores de seqüência da região 5'NC do genoma viral; os dois pares de iniciadores, internos e externos, utilizados na reação foram os relatados por Garson JA et al. 1990, como descritos abaixo. (99, 100)

PTC1- 5'CGT TAG TAT GAG TGT CGT G3'

NCR2-5'ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT3'

PTC3- 5'AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG3'

NCR4-5'CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT3'

3.1.1. Extração do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA) do VHC

O RNA do VHC foi extraído a partir de 100µl de soro somados a 250 µl de Trizol LS (Gibco BRL). Após rápida agitação, acrescentou-se 50µl de Clorofórmio (ChCl₃) e o tubo foi submetido novamente a agitação vigorosa. Em seguida, a solução foi centrifugada por 5 minutos. Com a separação da fase aquosa, transferida para um novo tubo contendo 300µl de Isopropanol, houve uma centrifugação de 10 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado resultante lavado com Etanol. Após a retirada do volume líquido, com a secagem completa do Etanol residual, o precipitado de RNA foi submetido a uma reação de Transcrição Reversa para obtenção do cDNA. Os componentes da solução para a Transcrição Reversa foram:

5µl de tampão 5x concentrado para enzima Transcrição Reversa (Gibco BRL)

2µl de dithiothreitol (DTT) 0,1 M (Gibco BRL)

2 μ l de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM (Pharmacia Biotech)

1 μ l de inibidor de ribonuclease clonado (Gibco BRL) 10U/ μ l

1 μ l de enzima Transcrição Reversa (Super Script II - Gibco BRL)

0,5 μ l de iniciador NCR2 a 50pmol/ μ l

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 25 μ l

A reação de Transcrição Reversa ocorreu a uma temperatura de 42°C por 60 minutos, seguido por 15 minutos a 95°C.

O cDNA resultante foi submetido a nested-PCR nas seguintes condições:

3.1.2. Primeira amplificação

Ao volume de 10 μ l de cDNA, foi adicionado 40 μ l de uma solução contendo:

5 μ l de tampão da enzima Taq-DNA-polimerase 10x concentrado (Gibco BRL)

2 μ l de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM (Pharmacia Biotech)

1,2 μ l de MgCl₂, 50mM (Gibco BRL)

0,5 μ l de iniciador (externo) PTC1 á 50pmol/ μ l

0,5 μ l de iniciador (externo) NCR2 á 50pmol/ μ l

0,5 μ l de enzima Taq-DNA-polimerase (Gibco BRL)

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 40 μ l

Este cDNA foi submetido ao primeiro ciclo de amplificação, em termociclador automático (Pharmacia LKB-Gene ATAQ Controler), de acordo com as seqüências de tempo e temperatura descritas a seguir na TABELA 2.

TABELA 2 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA REAÇÃO NESTED-PCR

Temperatura	Tempo	
94°C	40seg	25 vezes
55°C	40seg	
Seguidos por		
72°C	7min	1 vez

3.1.3. Segunda amplificação

Ao volume de 5µl resultante da primeira amplificação, foi adicionado 45µl de uma solução contendo:

5µl de tampão da enzima Taq-DNA-polimerase 10x concentrado (Gibco BRL)

3µl de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM (Pharmacia Biotech)

1,2µl de MgCl₂, 50mM (Gibco BRL)

0,5µl de iniciador (interno) PTC3 á 50pmol/µl

0,5µl de iniciador (interno) NCR4 á 50pmol/µl

0,5µl de enzima Taq-DNA-polimerase (Gibco BRL)

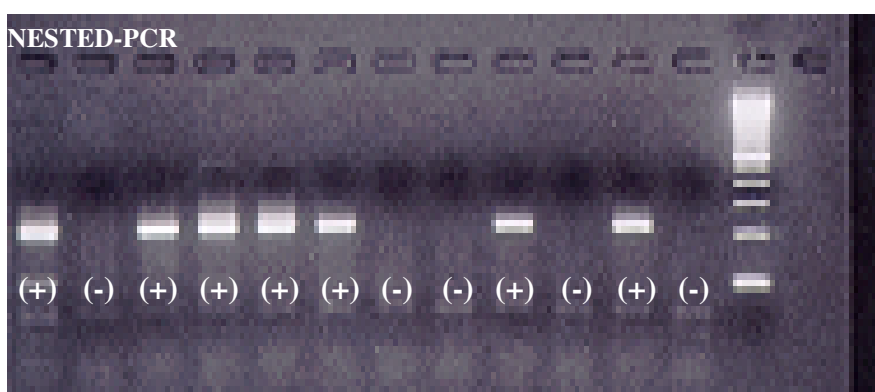
Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 45µl

Os ciclos de temperatura foram os sugeridos para o primeiro ciclo de amplificação (TABELA 2).

Somente o produto da segunda amplificação foi submetido à corrida eletroforética, em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo (Gibco BRL) e visualizado através de radiação ultravioleta. A positividade, ou seja, a presença de

fragmentos amplificados foi evidenciada com a visualização de uma banda fluorescente localizada a altura de 187pb. Foi utilizado, como referência, padrão de peso molecular de 100pb (FIGURA 3). (99 - 101)

FIGURA 3 - RESULTADOS DA PCR EM GEL DE AGAROSE CORADOS COM BROMETO DE ETÍDEO



3.2. Genotipagem do VHC

Todas as amostras foram genotipadas por duas diferentes reações e regiões do VHC, a região 5'NC do domínio estrutural e NS5b do domínio não-estrutural do genoma do VHC. As reações de genotipagem do VHC foram feitas pelo Laboratório de Desenvolvimento e Pesquisa Bayer Health Care Diagnostics, em Atlanta, GA, USA.

Na seqüência estão descritas separadamente as reações de PCR-VHC para obtenção dos produtos e as reações de PCR-VHC-genotipagem.

3.2.1. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-VHC)

Região NS5b-VHC

Para esta reação de PCR foi utilizado o Protocolo Titan One Step (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) para a geração de produtos que foram base para a genotipagem utilizando a Região NS5b do VHC. Os mesmos produtos foram alvo de análises para a construção da Árvore Filogenética.

3.2.1.1. Extração do RNA

Foi utilizado o Protocolo de extração QIAGEN descrito abaixo:

Adicionou-se 5 volumes de tampão de lise para 1 de amostra de soro e posterior centrifugação a 400g/10min./4°C. Descartado o sobrenadante, foi ressuspensionado o sedimento e após 2 lavagens em tampão RLT, foi transferido 2ml desta solução para tubo contendo a coluna de purificação (QIAshredder, QIAGEN) e centrifugado por 2 minutos.

À solução resultante foi somado, volume a volume, Etanol 70% e homogenizado.

Cuidadosamente esse volume foi pipetado sobre uma nova coluna QIAamp (QIAGEN), centrifugado por 15seg./8.000g.

Descartado o material que passou, a coluna QIAamp (QIAGEN) foi lavada com 700µl de tampão RW1 e centrifugado por 15 segundos/8000g.

Descartado o líquido resultante, foi feita nova lavagem com 500µl de tampão RPE e centrifugado por 15seg./8000g. Repetida a lavagem com o tampão RPE, porém a 20.000g/3min.

Para eluir o RNA, foi adicionado 50µl de água Milli-Q livre de RNase sobre a

membrana QIAamp (QIAGEN) com centrifugação de 1 min./8.000g.

3.2.1.2. Transcrição Reversa (RT) e Amplificação da Partícula VHC

Tampão 1:

dATP 10mM	1µl
dCTP 10mM	1µl
dGTP 10mM	1µl
dTTP 10mM	1µl
iniciadores (sentido positivo) 0.4µM	1µl
iniciadores (sentido negativo) 0.4µM	1µl
template RNA (extração QIAGEN)	0.5µl
DTT 100mM	2.5µl
Inibidor de Rnase 40U/µl	1µl

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 25µl

Tampão 2:

Solução de Mg ₂₊ (1.5mM MgCl ₂)	10µl
Enzima AMV	1µl

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 25µl

Foi adicionado a um tubo de 0.2ml, 25µl de cada tampão 1 e 2, agitado e centrifugado gentilmente.

Em seguida foram utilizadas as seguintes temperaturas em para a reação de RT-PCR-HCV :

**TABELA 3 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA REAÇÃO
TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR-HCV**

		Temperatura	Tempo	
Transcrição Reversa	Anelamento/Extensão	50°C	30min	
		94°C	2min	
		Seguidos por		
	Desnaturação	94°C	10seg	10 vezes
	Anelamento	55°C	30seg	
	Extensão	68°C	2min	
PCR	Desnaturação	94°C	10seg	25 vezes
	Anelamento	55°C	30seg	
	Extensão	68°C	2min	
		Seguidos por		
	68°C	7min	1 vez	

termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

O produto foi analisado em gel de agarose 2%.

3.2.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-VHC)

Região 5'NC-VHC

Para esta reação de PCR foi utilizado o Protocolo Amplicor ROCHE Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA para a geração de produtos que foram base para a genotipagem utilizando a Região 5'NC do VHC. (89, 102)

3.2.2. 1. Extração do RNA

Foi distribuído 400µl de solução de lise por tubo de amostra.

Adicionou-se 200µl de amostra de soro para cada tubo contendo solução de lise.

Foram preparados controles negativo e positivo simultaneamente.

Todos os tubos foram incubados á 60°C/10min.

Adicionado 600µl de Isopropanol, temperatura ambiente, a cada amostra e centrifugado a 13.000rpm/15min.

Retirado sobrenadante e acrescentado 1ml de Etanol 70%. Centrifugado à 13.000rpm/5min.

Retirado o sobrenadante, foi dissolvido o sedimento com 200µl de tampão.

3.2.2.2. Transcrição Reversa (RT) e Amplificação da Partícula VHC

Tampão MMX: Tampão de Bicina, 16%DMSO, Glicerol, <0,01% de Tth Polimerase do ADN, Acetato de Potácio, <0,001% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 0,005% de iniciadores KY78 e KY80 (sendo um deles biotilado), <0,01% de AmpErase, 0,05 de Azida sódica. (103)

Transferido 50µl do RNA extraído de cada amostra para um tubo contendo 50µl de tampão MMX, com Mn².

Em seguida as amostras foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas:

TABELA 4 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR-HCV

	Temperatura	Tempo	
	50°C	5min	
	62°C	30min	
	Seguidos por		
Desnaturação	90°C	10seg	37 vezes
Anelamento	58°C	25seg	
Seguido	91°C	3horas	Máximo

termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

Pipetado 100µl de solução de desnaturação para cada amostra, em temperatura de 91°C.

Neste ponto a reação pode ser mantida à 4°C no máximo 1 semana.

3.2.2.3. Detecção do Produto da PCR

Para cada poço da placa de ELISA foi pipetado 100µl de solução de hibridização.

Seguido de 25µl do produto amplificado e desnaturado a cada 2 poços, sendo um teste e outro controle.

Incubação de 37°C por 1 hora e lavagem.

Adicionado 100µl de solução de conjugado de Avidina-Peroxidase de Rábano silvestre e incubado á 37°C por 15 min. Seguido de lavagem.

Adicionado 100µl de substrato TMB (3,3' 5,5' Tetrametilbenzidina) e incubado por 10min. À temperatura ambiente e ausência de luz.

Finalmente, 100µl de reagente de parada (4,9% de Ácido Sulfúrico) em cada poço.

A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro de 450nm.

TABELA 5 - INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Resultado da amostra A450nm	Resultado do Controle Interno A450nm	Interpretação (RNA-VHC)
<0,3	≥0,3	Não detectado
0,3	<0,3	Reação inibida, repetir teste
≥0,3	Qualquer	Detectado
>0,3<1,0	Qualquer	Inconclusivo, solicitar nova coleta.

3.3. Genotipagem do VHC

Nesta etapa, a PCR-HCV-genotipagem tem como objetivo preparar produtos de PCR-HCV, já amplificados anteriormente, para a análise específica pelos equipamentos programados (seqüenciadores) para determinação dos tipos virais do VHC.

3.3.1. Purificação dos produtos da PCR-VHC

Os produtos obtidos pelas reações da PCR-HCV, regiões 5'NC e NS5b, sofreram o mesmo processo de purificação, propostos pelo protocolo QUIAGEN, descrito a seguir:

Foi adicionado 5 volumes de tampão para 1 de produto da PCR-VHC e posterior

agitação.

Transferiu-se 2ml desse volume para o tubo contendo a coluna de purificação QIAquick (QIAquick Spin Handbook QIAGEN) seguido de centrifugação por 30-60 segundos.

Descartado o material que passou, a coluna foi lavada com 0.5ml de tampão PE e centrifugado por 30-60 segundos, por duas vezes.

Descartado o líquido resultante, foi feita centrifugação por 1 minuto adicional.

Para eluir o RNA, foi adicionado 50µl de tampão EB (10mM Tris-HCl, pH8.5) sobre a membrana QIAquick com centrifugação de 1 minuto.

3.3.2. PCR-HCV para o Seqüenciamento e Análise Filogenética

Seguimos com as reações de PCR- genotipagem, onde os produtos anteriormente amplificados serão preparados para o processo de leitura do seqüenciador. Para ambas reações, referentes às regiões 5'NC e NS5b, foram utilizados protocolo CLIP de Seqüenciamento (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA.), porém para cada região os Kits apresentam suas peculiaridades descritas a seguir. (89, 104)

3.3.2.1. Região NS5b-VHC

Tampão CLIP 1: Ao seu volume total de 21 µl, foi acrescentado 3µl do produto da PCR, purificado e diluído.

1 - Tampão CLIP 1, para cada amostra:

12.75 µl água livre de Rnase

2.50 µl Tampão Clip VHC NS5b

2.50 µl DMSO

1.00 µl 5' iniciador PCS5b (3pmol)

1.00 µl 3' iniciador PCAS5b (3pmol)

1.25 µl enzima TS (diluído 1:10)

2 - Volume total de tampão (CLIP 1) por amostra de 21 µl, foi acrescentado 3 µl produto purificado, diluído 1:20. Transferiu-se 5 µl desta solução para tubos contendo 3 µl de tampão de terminação específico para cada base (A, C, T e G), perfazendo uma linha de quatro tubos por amostra com volume total de 8 µl.

3 - Agitado e Centrifugado

4 - Programa de temperaturas programado em para a PCR do seqüenciamento Região NS5b.

TABELA 6 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO PARA GENOTIPAGEM E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Região NS5b do VHC

	Temperatura	Tempo	
	95°C	2min	
	Seguidos por		
Desnaturação	95°C	30seg	30 vezes
Anelamento	55°C	30seg	
	Seguidos por		
Resfriamento	4°C	∞	

termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

5 - A reação foi interrompida com 6µl de solução de parada (formamida 95% e Fucsina), para cada tubo. Seguida de centrifugação e nova desnaturação.

TABELA 7 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA REAÇÃO DE DESNATURAÇÃO

Região NS5b do VHC

	Temperatura	Tempo
Desnaturação	85°C	3min
	Seguidos por	
Resfriamento	4°C	∞

termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1 grau /seg.

6 - As amostras neste ponto poderiam ser seqüenciadas imediatamente ou aguardar em temperatura de 20°C negativos.

3.3.2.2. Região 5'NC-VHC (89, 104, 105)

Tampão CLIP 1: Ao seu volume total de 21 µl, foi acrescentado 4 µl do produto da PCR, purificado.

1 - Tampão CLIP 1, para cada amostra:

12.75 µl água livre de Rnase

2.50 µl Tampão Clip VHC 5'NC

2.50 µl DMSO

1.00 µl 5'iniciador PCS5b (3pmol)

1.00 µl 3'iniciador PCAS5b (3pmol)

1.25 µl enzima TS (diluído 1:10)

2 - Volume total de tampão (CLIP 1) por amostra de 21 µl, foi acrescentado 4 µl produto purificado. Transferiu-se 5 µl desta solução para tubos contendo 3 µl de tampão de terminação específico para cada base (A, C, T e G), perfazendo uma linha de quatro tubos por amostra com volume total de 8 µl.

3 - Agitado e Centrifugado

4 - Programa de temperaturas programado em para a PCR do seqüenciamento Região 5'NC.

TABELA 8 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO PARA GENOTIPAGEM

Região 5'NC do VHC

	Temperatura	Tempo	
Desnaturação	95°C	1min	
	Seguidos por		
Desnaturação	95°C	30seg	30 vezes
Anelamento	45°C	30seg	
	Seguidos por		
Resfriamento	4°C	∞	

termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

5 - A reação foi interrompida com 12 µl de solução de parada (formamida 95% e Fucsina), para cada tubo. Seguida de centrifugação e nova desnaturação.

TABELA 9 - CICLOS DE TEMPERATURA E TEMPO DA REAÇÃO DE DESNATURAÇÃO

Região 5'NC do VHC

	Temperatura	Tempo
Desnaturação	85°C	3min
Seguidos por		
Resfriamento	4°C	∞

termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

3.4. Seqüenciamento: Regiões 5'NC e NS5b do VHC

Nesta etapa, temos o auxílio do seqüenciador para captura e interpretação dos sinais emitidos pelas seqüências, anterior e especialmente processadas. Seguimos com o auxílio de um programa de computador específico (The OpenGene system, Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) que compreende um software de análise das cadeias para cada uma das regiões do VHC, 5'NC e NS5b. (89, 102, 104, 105)

Para as leituras, a eletroforese dos produtos dos seqüenciamento CLIP-HCV foi feita estando conectada ao seqüenciador e ao computador. O Sistema OpenGene inclui o software de análise das cadeias, gel de acrilamida, unidade de fotopolimerização (SureFill) acoplado a torre do seqüenciador em sistema automatizado e sobre as seguintes condições:

Temperatura: 53°C

Voltagem: 1.300V

Potência do Laser: 50%

Amostragem: 0.5 seg/amostra

Heterozigosidade: 50%

Distância entre os picos: 7.5

Tempo de corrida: 25 min.

Pronto o gel de acrilamida, acoplado á torre do seqüenciador, foram aplicadas 1.5 µl das amostras por coluna, 4 colunas por amostra (ACTG).

Para análise dos tipos e subtipos, região NS5b, foi utilizado software OpenGene DNA Sequencing System (Bayer) em conjunto com a biblioteca TRUGENE HCV NS5b, módulo 5.1 (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

Foram analisados 180 pares de base da região NS5b do genoma do VHC.

Para a análise dos tipos e subtipos, pela região 5'NC, foi utilizado software OpenGene DNA Sequencing System (Bayer) em conjunto com a biblioteca TRUGENE HCV 5'NC (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA), que consiste em seqüências do GeneBank e seqüências confirmadas por seqüenciamento de outras regiões do genoma do VHC. As seqüências são referentes à posição de 96 a 282 da região 5'NC do VHC.

4. Análise Filogenética da Região NS5b do VHC

As seqüências, 180 pares de base, referentes aos 3/4 finais da região NS5b do genoma do VHC foram alinhadas utilizando-se o programa de computador Clustal W (Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7, June 1997) e a árvore filogenética foi gerada a partir deste alinhamento, usando-se o método “Neighbor Joining” (Troca de vizinhos mais próximos), parte do programa PHILIP 3,6.

Para cada 1% de diferença na similaridade entre as cadeias genômicas avaliadas, temos um erro de 2 nucleotídeos. Entre os tipos VHC a diferença fica entre 10 e 15 nucleotídeos.

5. Análise dos Dados Coletados

A análise inicial das possíveis vias de aquisição do VHC pelos pacientes incluídos no estudo foi realizada em etapas, descritas a seguir:

1. Cálculo da proporção de pacientes com antecedentes de:

- 1.1. Ter recebido transfusão de sangue e/ou hemocomponentes;
- 1.2. Usar/ter feito uso de droga injetável;
- 1.3. Usar/ter feito uso de droga inalatória;
- 1.4. Ter se submetido à acupuntura;
- 1.5. Ter se submetido à tatuagem.

2. Cálculo da proporção de pacientes com antecedentes de compartilhamento intradomiciliar de:

- 2.1. Escova de dente;
- 2.2. Lâmina de barbear;
- 2.3. Cortador de unhas;
- 2.4. Alicates de manicure.

3. Seqüenciamento e genotipagem das regiões 5'NC e NS5b do genoma do VHC encontrados nos pacientes incluídos no estudo.

4. Descrição conforme itens 1 e 2, de cada casal;

5. Cálculo do tempo de convivência (em anos) e do número de relações sexuais por mês de cada casal.

6. Cálculo (em porcentagem) da similaridade entre as cadeias genômicas, construção e análise da Árvore Filogenética, considerando a região NS5b-VHC, para cada casal analisado.

A análise final para avaliar as vias de aquisição do VHC levou em consideração a similaridade das cadeias genômicas dos VHC entre os casais e a distância filogenética destas cadeias, associadas aos dados epidemiológicos descritos nos itens 1 e 2.

6. Aspectos Éticos

Todos os pacientes, recrutados ou selecionados para o estudo, assinaram termo de consentimento esclarecido antes da participação.

RESULTADO

Foram recrutados 45 casais, 24 cumpriram os critérios de inclusão e exclusão e participaram do estudo.

Para os 21 casais excluídos não foi possível a detecção do VHC no soro para um ou ambos cônjuges, desta forma impossibilitando a continuidade destes pacientes no estudo onde a comparação das cadeias genômicas do VHC foi essencial e necessária.

Dos 48 pacientes estudados, a Média de idade foi de 47,04 anos (24 – 65 anos), com Mediana de 48 anos e Moda 49 anos.

A Média de tempo de convivência foi de 22,04 anos, Moda de 30 e Mediana de 23,5, variando de 2 a 45 anos. O número de relações sexuais mês foi em Média 8,8, com Moda de 12,0 e Mediana de 7,0 anos. Variando de 0 a 30 anos, como mostra a TABELA 10. A renda financeira anual foi em média US\$2.270/ano.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS 24 CASAIS QUANTO A IDADE, TEMPO DE CONVIVÊNCIA E NÚMERO DE RELAÇÕES SEXUAIS AO MÊS

Número do Casal	Táxon	Sexo	Idade (anos)	Tempo Conv. Anos	Nº relações sexo/mês	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
01	1b	M	51	25	1	3a	3a	98.7
	1a	F	45	25	3	3a	3a	
02	2b	M	54	25	30	1b	1b	99.4
	2a	F	48	25	16	1b	1b	
03	3a	M	55	30	10	2b	2b	98.7
	3b	F	49	30	12	2b	2b	
04	4a	M	51	11	3	3a	3a	97.5
	4b	F	31	11	3	3a	3a	
06	6a	M	48	24	6	3a	3a	95.5
	6b	F	53	24	3	3a	3a	
07	7b	M	62	40	12	1b	1b	98.7
	7a	F	59	40	12	1b	1b	

Número do Casal	Táxon	Sexo	Idade (anos)	Tempo Conv. Anos	Nº relações sexo/mês	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
08	8a	M	39	21	15	1a/b	1b	93.0
	8b	F	36	21	16	1b	1b	
09	9a	M	38	11	5	1a	1a	99.4
	9b	F	35	11	5	1a/b	1a	
10	10b	M	56	10	12	1b	1b	70.1
	10a	F	49	10	*	*	2b	
11	11a	M	60	30	6	1b	1b	82.2
	11b	F	52	30	2	1a	1a	
12	12b	M	46	6	10	3a	3a	98.1
	12a	F	36	6	10	3a	3a	
16	16a	M	49	30	0	1b	1b	99.4
	16b	F	49	30	0	1b	1b	
17	17a	M	48	30	12	1b	1b	96.8
	17b	F	44	30	12	1b	1b	

Número do Casal	Táxon	Sexo	Idade (anos)	Tempo Conv. Anos	Nº relações sexo/mês	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
18	18a	M	49	30	6	1b	1b	96.2
	18b	F	48	30	6	1a	1b	
20	20b	M	52	23	10	3a	3a	98.1
	20a	F	45	23	8	3a	3a	
22	22b	M	65	45	4	1b	1b	96.8
	22a	F	59	45	4	1b	1b	
23	23b	M	47	20	3	3a	3a	95.5
	23a	F	40	20	8	3a	3a	
24	24a	M	45	18	4	3a	3a	98.1
	24b	F	43	18	15	3a	3a	
25	25b	M	37	7	20	3a	3a	98.1
	25a	F	32	7	12	3a	3a	
26	26a	M	60	17	7	1b	1b	99.4
	26b	F	42	17	8	1b	1b	

Número do Casal	Táxon	Sexo	Idade (anos)	Tempo Conv. Anos	Nº relações sexo/mês	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
28	28b	M	56	32	4	1b	1b	99.4
	28a	F	54	32	5	1b	1b	
29	29b	M	38	2	4	3a	3a	98.8
	29a	F	37	2	2	3a	3a	
30	30a	M	55	36	20	3a	3a	96.8
	30b	F	55	36	20	3a	3a	
31	31a	M	32	6	7	1a	1a	99.4
	31b	F	24	6	25	1a	1a	
TOTAL CASAIS (24)								
MÉDIA			47,04	22,04	8,8			
MODA			49	30,00	12,0			
MEDIANA			48	23,50	7,0			

*IGNORADO

Os fatores de risco para aquisição do VHC citados foram analisados para os 24 casais. Nove (37,5%) casais mencionaram transfusão de sangue, entre esses um (11,1%) casal, marido e mulher, receberam sangue, os outros 8 (88,9%) apenas um

dos cônjuges. Dezesete (70,8%) casais uso de drogas ilícitas injetáveis sendo 4 (23,5%) afirmativo para ambos e 13 (76,5%) para um dos cônjuges. Uso de drogas inalatórias para 15 (62,5%) casais, onde 5 (33,3%) o casal mencionou já ter feito uso desta modalidade de droga e 10 (66,6%) apenas um dos cônjuges. Para o item acupuntura 4 (16,7%) dos casais sofreram este tipo de intervenção sendo que 1 casal (25%), o marido e esposa fizeram uso de agulhas e 3 (75%) apenas um dos cônjuges. Finalmente 5 (20,8%) dos casais mencionaram ter tatuagem e em 2 (40%) deles, ambos estavam tatuados; os outros 3 (60%) casais apenas um dos cônjuges.

(TABELA 11)

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS 24 CASAIS QUANTO A FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DO VHC: TRANSFUSÃO DE SANGUE, U.D. INJETÁVEL E/OU INALATÓRIA, ACUPUNTURA E TATUAGEM

Casal Número	Táxon	Sexo	Transfusão sangue	U.D. injetável	U.D. inalatória	Acupunt.	Tatuagem	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
01	1b	M	não	não	sim	não	não	3a	3a	98.7
	1a	F	não	não	sim	não	não	3a	3a	
02	2b	M	não	sim	sim	não	não	1b	1b	99.4
	2a	F	não	não	não	não	não	1b	1b	
03	3a	M	não	sim	sim	não	não	2b	2b	98.7
	3b	F	não	não	não	sim	não	2b	2b	

Casal Número	Táxon	Sexo	Transfusão sangue	U.D. injetável	U.D. inalatória	Acupunt.	Tatuagem	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
04	4a	M	sim	sim	sim	não	sim	3a	3a	97.5
	4b	F	não	não	não	não	não	3a	3a	
06	6a	M	não	sim	não	não	não	3a	3a	95.5
	6b	F	sim	não	não	não	não	3a	3a	
07	7b	M	não	não	não	não	não	1b	1b	98.7
	7a	F	não	não	não	não	não	1b	1b	
08	8a	M	sim	sim	sim	não	sim	1a/b	1b	93.0
	8b	F	não	não	não	não	sim	1b	1b	

Casal Número	Táxon	Sexo	Transfusão sangue	U.D. injetável	U.D. inalatória	Acupunt.	Tatuagem	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
22	22b	M	não	sim	sim	não	sim	1b	1b	96.8
	22a	M	não	sim	sim	não	sim	1b	1b	
23	23b	M	sim	não	não	não	não	3a	3a	95.5
	23a	F	não	não	não	não	não	3a	3a	
24	24a	M	não	não	não	sim	não	3a	3a	98.1
	24b	F	não	não	não	não	não	3a	3a	
25	25b	M	não	sim	sim	não	sim	3a	3a	98.1
	25a	F	não	não	sim	não	sim	3a	3a	

Casal Número	Táxon	Sexo	Transfusão sangue	U.D. injetável	U.D. inalatória	Acupunt.	Tatuagem	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
26	26a	M	não	sim	sim	não	não	1b	1b	99.4
	26b	F	não	não	não	não	não	1b	1b	
28	28b	M	não	não	não	sim	não	1b	1b	99.4
	28a	F	não	não	não	sim	não	1b	1b	
29	29b	M	não	sim	sim	não	não	3a	3a	98.8
	29a	F	não	sim	sim	não	não	3a	3a	
30	30a	M	sim	sim	não	não	não	3a	3a	96.8
	30b	F	não	sim	não	não	não	3a	3a	

Casal Número	Táxon	Sexo	Transfusão sangue	U.D. injetável	U.D. inalatória	Acupunt.	Tatuagem	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
31	31a	M	não	sim	sim	não	não	1a	1a	99.4
	31b	F	não	não	não	não	não	1a	1a	
O casal (24 casais)	SIM		1/24 (4,2%)	4/24 (16,7%)	5/24 (20,8%)	1/24 (4,2%)	2/24 (8,3%)			
O casal (24 casais)	NÃO		1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)			
Para apenas um dos cônjuges	SIM		8/24 (33,3%)	13/24 (54,2%)	10/24 (41,7%)	3/24 (12,5%)	3/24 (12,5%)			
Por casal (24 casais)	TOTAL		9/24 (37,5%)	17/24 (70,8%)	15/24 (62,5%)	4/24 (16,7%)	5/24 (20,8%)			
Por indivíduo (48 pacientes)	TOTAL		10/48 (20,8%)	21/48 (43,8%)	20/48 (41,7%)	5/48 (10,4%)	7/48 (14,6%)			

O compartilhar de utensílios de higiene pessoal apresentou altos índices, sendo que 6 (25,0%) dos casais mencionaram já ter feito uso comum de escovas de dentes; entre esses, 2 (33,3%) casais (marido e mulher) assumiram o uso compartilhado e os outros 4 (66,7%) casais apenas um dos cônjuges. Para 16 (66,7%), as lâminas de barbear foram compartilhadas, e em 8 (50%) casais marido e mulher afirmaram ter usado a mesma lâmina e em 8 (50%) casais apenas um dos cônjuges. Cortador de unhas foi o mesmo para 21(87,5%) dos casais e 12 (57,1%), assumiram o uso comum e 9 (42,9%) apenas um dos cônjuges e para 14 (58,3%) casais o alicate de manicure foi compartilhado, sendo que 5 (35,7%) o par mencionou uso comum e 9 (64,3%) apenas um dos cônjuges. (TABELA 12)

TABELA 12: DISTRIBUIÇÃO DOS 24 CASAIS QUANTO AO USO COMPARTILHADO DE UTENSÍLIOS DE HIGIENE PESSOAL: ESCOVA DE DENTE, LÂMINA DE BARBEAR, CORTADOR DE UNHAS E ALICATE DE MANICURE

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicate manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
01	1b	M	não	sim	sim	não	3a	3a	98.7
	1a	F	sim	sim	sim	sim	3a	3a	
02	2b	M	sim	sim	sim	sim	1b	1b	99.4
	2a	F	sim	não	sim	sim	1b	1b	
03	3a	M	não	sim	sim	sim	2b	2b	98.7
	3b	F	não	sim	sim	não	2b	2b	

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicates manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
04	4a	M	não	não	sim	não	3a	3a	97.5
	4b	F	não	sim	sim	não	3a	3a	
06	6a	M	não	sim	sim	não	3a	3a	95.5
	6b	F	não	não	não	não	3a	3a	
07	7b	M	não	não	não	não	1b	1b	98.7
	7a	F	não	não	não	não	1b	1b	
08	8a	M	não	sim	não	sim	1a/b	1b	93.0
	8b	F	sim	sim	sim	sim	1b	1b	

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicates manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
09	9a	M	não	sim	sim	não	1a	1a	99.4
	9b	F	não	não	não	não	1a/b	1a	
10	10b	M	não	não	sim	sim	1b	1b	70.1
	10a	F	não	não	não	sim	-	2b	
11	11a	M	não	não	sim	não	1b	1b	82.2
	11b	F	não	não	não	não	1a	1a	
12	12b	M	não	não	sim	não	3a	3a	98.1
	12a	F	não	não	sim	não	3a	3a	

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicates manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
16	16a	M	*	*	*	*	1b	1b	99.4
	16b	F	não	não	não	não	1b	1b	
17	17a	M	não	sim	não	não	1b	1b	96.8
	17b	F	não	sim	sim	sim	1b	1b	
18	18a	M	sim	sim	sim	não	1b	1b	96.2
	18b	F	não	não	sim	sim	1a	1b	
20	20b	M	sim	sim	sim	sim	3a	3a	98.1
	20a	F	não	sim	sim	sim	3a	3a	

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicate manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
22	22b	M	não	não	não	não	1b	1b	96.8
	22a	F	não	não	sim	sim	1b	1b	
23	23b	M	não	sim	sim	sim	3a	3a	95.5
	23a	F	não	sim	sim	sim	3a	3a	
24	24a	M	não	não	sim	não	3a	3a	98.1
	24b	F	não	não	não	sim	3a	3a	
25	25b	M	não	não	sim	sim	3a	3a	98.1
	25a	F	não	não	sim	não	3a	3a	

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicates manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
26	26a	M	não	não	sim	não	1b	1b	99.4
	26b	F	não	sim	sim	sim	1b	1b	
28	28b	M	não	não	sim	não	1b	1b	99.4
	28a	F	não	sim	sim	não	1b	1b	
29	29b	M	não	sim	sim	não	3a	3a	98.8
	29a	F	não	sim	sim	não	3a	3a	
30	30a	M	sim	sim	sim	sim	3a	3a	96.8
	30b	F	sim	não	não	não	3a	3a	

Casal número	Táxon	Sexo	Compartilhar Escova de dente	Compartilhar Lâmina de Barbear	Compartilhar Cortador de unhas	Compartilhar Alicate manicure	subtipo HCV 5'NC	subtipo HCV NS5B	% homologia (NS5B)
31	31a	M	não	sim	não	não	1a	1a	99.4
	31b	F	não	sim	não	não	1a	1a	
O casal (24 casais)	SIM		2/24 (8,3%)	8/24 (33,3%)	12/24 (50,0%)	5/24 (20,8%)			
O casal (24 casais)	NÃO		1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)	1/24 (4,2%)			
Para apenas um dos cônjuges	SIM		4/24 (16,7%)	8/24 (33,3%)	9/24 (37,5%)	9/24 (37,5%)			
Por casal (24 casais)	TOTAL		6/24 (25,0%)	16/24 (66,7%)	21/24 (87,5%)	14/24 (58,3%)			
Por indivíduo (48 pacientes)	TOTAL		8/48 (16,7%)	24/48 (50,0%)	33/48 (68,8%)	19/48 (39,6%)			

*IGNORADO

Apenas um paciente relatou DST diagnosticada e tratada.

Os dois casais discordantes (10 e 11) mencionaram transfusão de sangue, uso de droga injetável e um deles também droga inalatória.

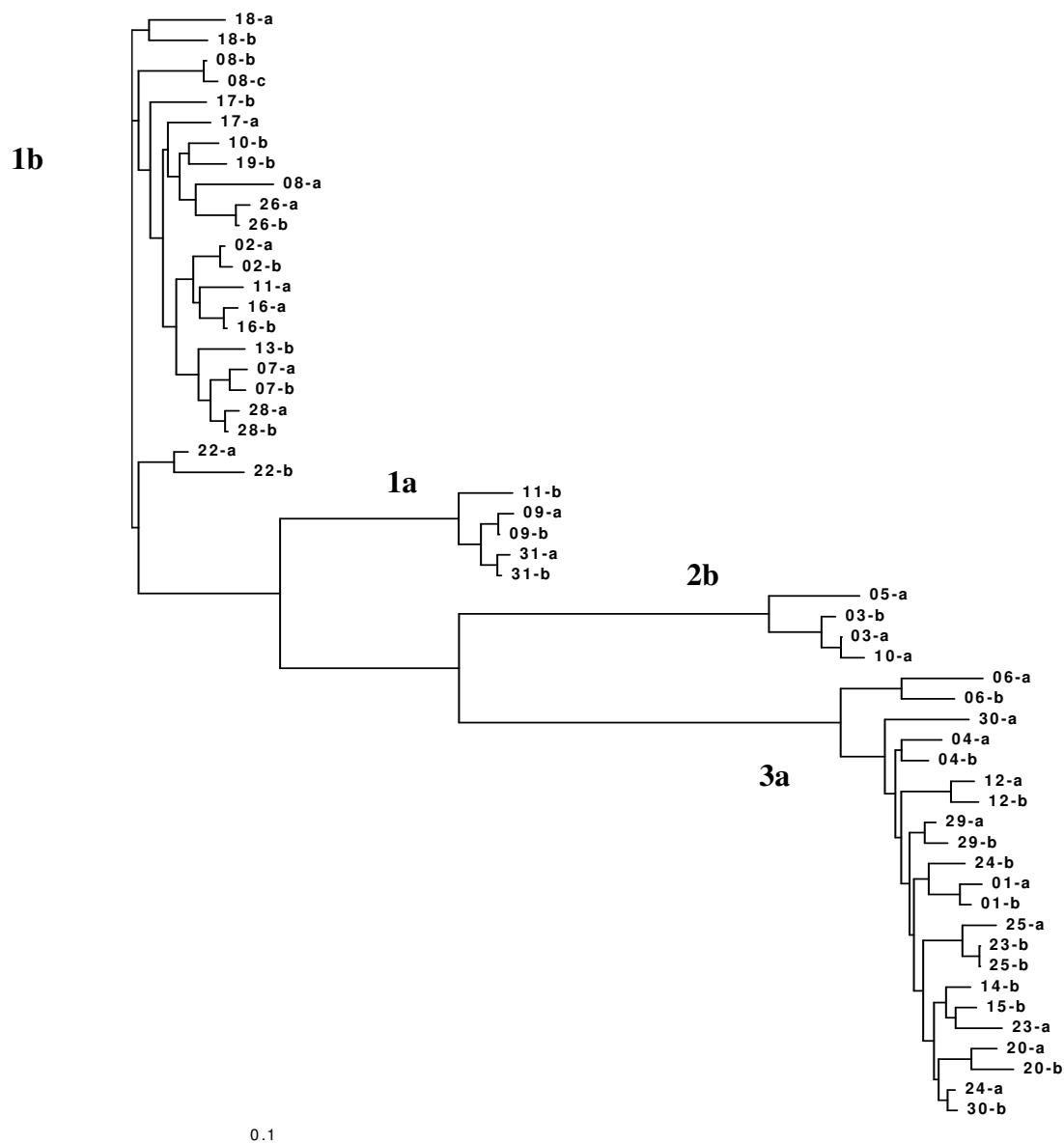
Entre os 24 casais estudados, 22 (91,7%) apresentaram concordância entre os subtipos virais e altos índices de similaridade na Região NS5b-VHC (93,0% a 99,4%). Os subtipos apresentados foram: dois (8,3%) pacientes infectados pelo subtipo 1a, nove (37,5%) com subtipo 1b, um (4,2%) subtipo 2b e dez (41,7%) com o subtipo 3a. Os dois (8,3%) casais que não foram subtipo VHC concordantes apresentaram valores de comparação entre 70,1% e 82,2%, e foram infectados pelos subtipos 2b/1b e 1b/1a, respectivamente. (TABELA 13)

TABELA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS 24 CASAIS QUANTO AOS SUBTIPOS 1a, 1b, 2b E 3a DO VHC E MÉDIAS DE PORCENTAGENS DE SIMILARIDADE

Subtipo HCV 5'NC e NS5B	Número de Casais	Média % homologia (NS5B)
1a	2 (8,3%)	99, 4
1b	9 (37,5%)	97, 7
2b	1 (4,2%)	98, 7
3a	10 (41,7%)	97, 5
Média Geral	22 (91,7%)	98, 3
Não Concordantes	2 (8,3%)	76, 2
Total	24 (100%)	

A árvore filogenética foi construída a partir do seqüenciamento da Região NS5b do genoma do VHC; as seqüências (180 pares de base) foram alinhadas, utilizando-se o programa de computador Clustal W (Clustal W Multiple Sequence Alignment Program, v1.7, June 1997) e a árvore filogenética foi gerada a partir deste alinhamento, usando-se o método Agrupamento de Vizinhos (Neighbor Joining Method), parte do programa PHILIP 3,6. (FIGURA 5)

FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA, CONSTRUÍDA Á PARTIR DO SEQÜENCIAMENTO DE 180PB REFERENTES À REGIÃO NS5B-VHC DOS 24 CASAIS ESTUDADOS



Análise filogenética dos 24 casais participantes do estudo. Árvore filogenética, com base em 180bp, região NS5b do genoma do VHC, Os casais estão identificados com o mesmo número, seguido das vogais a e b. Na família 8, foi incluída uma filha do casal táxon 8c. Para o alinhamento de múltiplas seqüências foi usado o programa Clustal W (Clustal W multiple Sequence Alignment Program v1.7, June 1997) e a árvore filogenética foi gerada a partir do alinhamento, utilizando-se o Método de Agrupamento de Vizinhos (Neighbor Joining Method), parte do programa PHILIP 3,6.

DISCUSSÃO

O grupo de pacientes recrutados para o estudo faz parte da população atendida pelo Ambulatório de Hepatite do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Hospital Guilherme Álvaro, localizado na cidade de Santos, São Paulo. Ambos são hospitais de referência para encaminhamento de pacientes com diagnóstico de Hepatite.

O Ambulatório de Hepatite do HC-FMUSP apresenta um quadro de aproximadamente 4.000 pacientes registrados e destes, cerca de 800 em atendimento e/ou tratamento contínuo da Hepatite C. O Ambulatório de Hepatite do Hospital Guilherme Álvaro atualmente segue com aproximadamente 2.500 pacientes com registro e cerca de 500 em atendimento.

O trabalho publicado por Tengan FM et al. 2001, avaliou a população recebida para doação de sangue, pela Fundação Pró-Sangue, dentro do Hospital das Clínicas da FMUSP e consagra o número de 11,76% de pacientes e seu cônjuge com história atual ou pregressa de hepatite C e sugere que esta prevalência pode estar vinculada com transmissão sexual. Este trabalho nos dá uma idéia da prevalência de casais infectados em nosso meio. (6)

Já os pacientes recrutados para este trabalho não foram selecionados á partir de uma ordem de atendimento contínuo, desta forma não foi possível assim como não

fez parte dos objetivos, estabelecer a prevalência de casais infectados pelo VHC nas populações estudadas.

Entre as publicações brasileiras existe um número muito pequeno de trabalhos onde a união de conceitos epidemiológico e virológico, para avaliar a transmissão do VHC, tenham tido a oportunidade de serem questionados juntos. A discussão deste trabalho segue com o objetivo de unir estes dois parâmetros.

Epidemiologia

A média de duração de convívio mencionada foi de 22,04 anos, variando de 2 a 45 anos e o número de relações mês foi em média 8,8 (variando entre 0 e 30) . A renda financeira anual foi em média US\$2,270/ano e apenas um paciente mencionou DST diagnosticada e tratada. (TABELA 10)

Neste trabalho temos o casal 29, de apenas 2 anos de casamento com 98,8% de similaridade genômica entre os vírus. Porém a grande maioria relatou longos períodos de convivência e altos níveis de similaridade, por exemplo, entre os casais 07, 16 e 28, com porcentagens de 98,7%, 99,4, e 99,4% respectivamente.

O casal 16 que apresenta número de relações sexuais zero mencionou a realidade vivida atualmente. A similaridade das cadeias genômicas, para este casal foi de 99,4%.

A relação tempo de convivência entre os cônjuges e transmissão sexual do VHC é um assunto conflitante. A literatura menciona com ênfase a necessidade de longos períodos de união para justificar a transmissão do VHC, mas encontramos relatos de infecção aguda onde o único fator de risco foi um parceiro sexual VHC positivo. (24, 54, 63, 65, 73)

Além do tempo de convivência, diversos outros fatores devem ser considerados, ou seja: quem transmitiu a infecção para o seu parceiro, o homem ou a mulher, DSTs associadas, número de relações sexuais, traumas durante a relação, compartilhar de utensílios de higiene pessoal, renda per capita, etc.

Na população estudada, apenas um casal relatou DST; com essa informação achamos pouco provável este item como fator de risco neste grupo.

Rooney & Gilson 1998, relatam, em artigo de revisão, uma estimativa de risco associado á infecção pelo VHC de 1.5 (IC 1.05-2.2) por década de casamento, além de que mulheres com parceiros VHC positivo apresentam 3.7 vezes mais chances de contrair a doença.(24)

Capelli C et al. 1997 e Sánchez-Beiza L et al. 1996, relatam infecção aguda pelo VHC em pacientes do sexo feminino onde parceiros sexuais com hepatite C crônica foram os únicos fatores de risco mencionado. Willians IT & Alter MJ 2003, pesquisadores do CDC, também suportam a importância da transmissão sexual do VHC, analisando casos agudos da doença. (54, 63, 73)

Hershow RC et al. 1998, encontraram significativos fatores de risco para a infecção pelo VHC quando mencionada promiscuidade sexual, parceira U.D., DST associada, sexo pago e convívio de longa duração (> que 10 anos) com parceiros VHC positivo. (65)

Para pacientes VHC positivo, não se pode, até o presente distinguir claramente entre os que têm potencial de transmitir o VHC por via sexual ou não. Também, para relações de longa duração onde o caso index claramente apresenta uma baixa viremia e cônjuge discordante, não se pode afirmar que a infecção não será transmitida no futuro.(24)

Com base nos questionários, os fatores de risco parenteral foram analisados para os 24 casais. Nove (37,5%) casais mencionaram transfusão de sangue, entre esses um (11,1%) casal (marido e mulher) recebeu sangue; os outros 8 (88,8%), apenas um dos cônjuges. Dezesete (70,8%) referiram uso de drogas ilícitas injetáveis, sendo 4 (23,5%) afirmativo para ambos e 13 (76,5%) para um dos cônjuges. Uso de droga inalatória foi referido por 15 (62,5%) casais. Destes 5 (33,3%) o casal, marido e mulher, mencionaram já ter feito uso desta modalidade de droga e para 10 (66,6%) casais apenas um dos cônjuges. Para o item acupuntura, 4 (16,7%) casais sofreram este tipo de intervenção, sendo que 1 casal (25%), o marido e esposa, fez uso de agulhas e 3 (75%), apenas um dos cônjuges. Finalmente, 5 (20,8%) dos casais mencionaram ter tatuagem e destes, 2 (40%) casais, marido e mulher, estavam tatuados os outros 3 (60%), apenas um dos cônjuges. O casal de número 7a/7b não apresentou nenhum fator de risco associado a aquisição do VHC. Ver TABELA 11.

É interessante notar que temos 9 (18,8%) casos onde os entrevistados negaram os 5 fatores de risco aqui descritos (transfusão de sangue, U.D. injetável, U.D. inalatória, acupuntura e tatuagem). Todos são mulheres (2a, 4b, 12a, 18b, 20a, 23a, 24b, 26b e 31b), com seus respectivos maridos apresentando um ou mais destes fatores de risco.

A hipótese do sentido provável de transmissão, homem-mulher, fica reforçada com os dados apresentados por estes 9 casais.

A ordem de importância sugerida quando se fala de transmissão do VHC, poderia ser: fatores de risco parenterais como o uso de drogas ilícitas injetáveis, transfusão de sangue, etc, seguido de transmissão sexual e intrafamiliar.(24)

Classicamente, a exposição parenteral reúne fatores de risco relevantes para a transmissão do VHC e muitos trabalhos discutem populações específicas, como pacientes de clínicas de DST, atendimento a usuários de drogas, homossexuais e profissionais do sexo; mostrando achados que diferem da população em geral e em que os riscos de transmissão para o VHC aumentam consideravelmente. (3 - 10, 15, 17, 21 - 24, 106)

No Canadá, ao se investigar o risco de transmissão sexual do VHC e HIV entre usuários de drogas não injetáveis e seus parceiros sexuais pertencentes a grupos de “baixo risco”, notou-se que estes pacientes apresentam potencial de transmissão pela via sexual para o VHC. (29)

A transmissão sexual veiculada pelas secreções sexuais nas doenças virais sugere que existe um potencial maior de transmissão no sentido homem-mulher. Certamente, traumas na mucosa durante o intercurso sexual aumentam os riscos da transmissão viral, assim como a relação de altos níveis de viremia com a presença da partícula viral no sêmen.(12, 57, 73)

Interessantemente, o compartilhar de utensílios de higiene pessoal apresentou altos índices, sendo que 6 (25.0%) dos casais mencionaram já ter feito uso comum de escova de dente, entre esses 2 (33, 3%) casais, marido e mulher, assumiram o uso compartilhado e 4 (66,7%) apenas um dos cônjuges. Para 16 (66,6%), a lâmina de barbear foi compartilhada e metade (50%) marido e mulher afirmaram ter usado a mesma lâmina e o restante (50%) apenas um dos cônjuges. Cortador de unhas foi o mesmo para 21(87,5%) dos casais e 12 (57,1%) casais, marido e mulher, assumiram o uso comum e 9 (42,9%) apenas um dos cônjuges; para 14 (58,3%) casais, o alicate

de manicure foi compartilhado, sendo que 5 (35,7%) casais, marido e mulher, mencionaram uso comum e 9 (64,3%) apenas um dos cônjuges.

Do total de 48 pacientes, apenas 5 (3 mulheres: 6b, 9b, 16b e 2 homens: 11b e 22b) responderam que não compartilharam seus utensílios, porém seus cônjuges assumiram o uso comum de pelo menos um dos itens. Esta observação gera uma grande preocupação, pois o questionamento isolado entre os cônjuges mostra que, se um deles tem o cuidado de não compartilhar seus utensílios para evitar os riscos de transmissão, não necessariamente o par assume a mesma postura.

Não houve coincidência entre os pacientes que não compartilharam seus utensílios com as 9 mulheres que não apresentaram fatores de risco parenteral. Porém, entre as nove mulheres, 7 fazem parte do grupo onde pelo menos um dos cônjuges assumiu o uso comum de lâmina de barbear. Para as outras duas foi notado o uso compartilhado de cortador de unhas e alicate de manicure.

Foi comum mais de um item compartilhado nesta população e apenas o casal número 7 ou seja, 4,2% da casuística estudada não compartilhou seus utensílios.

Acredito que fatores culturais possam nos ajudar a justificar estes altos índices apresentados. O compartilhar de utensílios de higiene pessoal, especialmente a lâmina de barbear, dilui a discussão quanto à transmissão intrafamiliar e sexual do VHC. A cautela nos leva a considerar os hábitos que envolvem o convívio familiar como um fator de confusão, quando se quer discutir a transmissão sexual entre estes parceiros, levando a afirmação categórica de transmissão sexual do VHC fora do alcance.

É comum na literatura a citação do compartilhar de utensílios de higiene pessoal como um fator de confusão na discussão da transmissão sexual e intrafamiliar do

VHC. Rooney & Gilson 1998, além de muitos outros autores evidenciam que somado ao contato familiar e o comportamento sexual, o compartilhar de utensílios pessoais como lâmina de barbear, escova de dente, cortador de unhas e alicate de manicure, podem ser importantes na transmissão intrafamiliar do vírus da hepatite C. (4, 10, 12, 24, 32, 34, 44, 51 - 57)

De todos os casais, apenas um (o casal número 7) que não pertence ao grupo de risco parenteral de aquisição do VHC, também não relatou uso compartilhado de utensílios e tem similaridade de 98,7% entre suas cadeias genômicas do VHC analisadas. Este caso abre precedentes para a possibilidade de transmissão sexual do VHC e justifica a continuidade de estudos mais esclarecedores sobre a questão.

O desenho ideal de estudo para estimar o índice de transmissão sexual do VHC seria uma coorte prospectiva, com o paciente portador da infecção pelo VHC e seu parceiro sexual discordante. A incidência da infecção seria avaliada por repetidos testes onde o parceiro inicialmente negativo para a presença do VHC circulante, ao longo do tempo sendo avaliado, na expectativa de uma positividade nos testes laboratoriais que envolvam o diagnóstico da infecção pelo VHC. Ideal também seria se o comportamento familiar e sexual também fossem monitorados. (24, 12)

Porém, talvez estejamos esbarrando em conceitos éticos para dar andamento em uma pesquisa tecnicamente perfeita. Atualmente sem disponibilidade de animais de experimentação, exceto chimpanzés que inviabilizam pesquisas em grande escala, os pacientes portadores do VHC passam a ser nossa grande fonte de estudo. Assim, toda contribuição científica no que se refere à transmissão do VHC torna-se essencial para um modelo epidemiológico futuro e para o desenvolvimento de estratégias apropriadas de prevenção na prática clínica. (24)

Virologia:

A região NS5b foi escolhida para análise filogenética, uma vez que não é considerada alvo de altos níveis de pressão imune. Norder H et al. 1998, analisaram filogeneticamente, a região NS5b, e mencionam a região como um poderoso instrumento para a investigação nosocomial de transmissão do VHC, ressaltando o fato de que muitas das cadeias analisadas pertenciam ao mesmo subtipo viral. (8)

A discussão sobre a mais adequada região do VHC a ser analisada passou pelo domínio estrutural, onde a região do envelope viral foi considerada, em especial a HVR 1. Esta região, eleita para estudos de quasispécies, apresenta altos níveis de variabilidade, sendo interessante especialmente em casos agudos da infecção. (63, 73, 77, 88, 98)

Também a região 5'NC foi considerada e descartada por motivos opostos aos mencionados para a região HVR 1. Apresentando caracteres extremamente conservados em sua seqüência genômica, a região 5'NC geraria parâmetros insuficientes aos nossos objetivos. (88, 98)

Do total de 45 casais recrutados, 24 preencheram os critérios de inclusão e exclusão e participaram do trabalho. Entre os 24, 22 (91,7%) casais apresentaram concordância entre os subtipos virais e altos índices de similaridade genômica, de 93,0% a 99,4% (média 98,3%). Foi avaliada uma seqüência de 180pb referente à região NS5b do domínio não estrutural do genoma do VHC. A partir destas seqüências os vírus foram genotipados e analisados filogeneticamente. Da região 5'NC, parte do domínio estrutural do genoma do VHC, também foram seqüenciados aproximadamente 200 nucleotídeos para uma segunda genotipagem dos vírus.

Os subtipos apresentados foram: dois (8,3%) pacientes infectados pelo subtipo 1a, nove (37,5%) com subtipo 1b, um (4,2%) subtipo 2b e dez (41,7%) com o subtipo 3a. Os dois casais, número 10 e 11, que não apresentaram concordância entre os seus subtipos virais, com valores de comparação entre 70,1% e 82,2% (média 76,2%), e infecção pelos subtipos 2b/1b e 1b/1a respectivamente.

A distribuição dos tipos VHC encontrada foi compatível com a da população brasileira, segundo Cavalheiro NP et al. 2002. (106, 107)

A alta percentagem de similaridade observada entre 22 casais, com média de 98,3%, nos leva a pressupor que estes cônjuges estejam infectados pelo mesmo vírus ou que a infecção apresenta uma fonte comum de aquisição e, se pode ousar dizer que houve transmissão de um cônjuge para o outro.

Relatos de diferentes autores mencionam altas taxas de similaridade genômica, avaliando o VHC em diferentes domínios, para casais portadores do VHC.

A região hipervariável 1 (HVR 1), entre E1 e E2/NS1 do genoma do VHC foi seqüenciada e filogeneticamente estudada pelos seguintes autores: Thomas DL et al. 1995, que trabalharam com 3 pacientes de uma clínica de DST, encontrando em média 94% de similaridade entre as cadeias virais, Morsica G et al. 2001 e Capelli C et al. 1997, relatam infecção aguda de apenas uma paciente, com similaridades de 94,9% e 93,4% respectivamente, onde o único fator de risco apresentado, nos dois trabalhos, foi o parceiro sexual VHC positivo. Ross RS et al. 1999 também relata um caso agudo com 100% de similaridade entre os cônjuges, porém avaliando a região do Core – VHC e Chayama K et al. 1995, com 8 casos que apresentaram similaridade entre 91,4% e 99,8%, em um serviço e hepatologia. (63, 77 - 79, 81)

A região NS5b foi alvo das pesquisas de Zylberberg H et al. 1999 em um serviço de hepatologia onde para 7 casais com mesmo genótipo, 3 mostraram similaridade de 98% o que representa de 1 a 3 nucleotídeos de diferença entre eles.(17)

Williams IT e Alter MJ 2003, pesquisadores do CDC, Divisão de Hepatites Virais, acompanharam 263 casos de hepatite C aguda e 13% destes reportaram exposição sexual como única fonte de risco para aquisição da doença. Amostras de soro de 7 entre 24 parceiros positivos foram analisadas e 5 apresentaram concordância no genótipo e identidade na seqüência genômica entre 97,8% e 99,3%. Foi avaliada a HVR 1. As relações encontradas entre estes cônjuges suportam que a atividade sexual como um modo de transmissão do VHC no EUA. (73)

Altas taxas de homologia foram relatadas, porém podemos notar que o número de casos apresentado foi pequeno, mesmo assim, estes autores sugerem fortemente a transmissão sexual entre estes parceiros avaliados. (17, 63, 73, 77 - 79, 81)

Kumar RM 1998, mostraram um importante trabalho, oriundo de área endêmica de infecção pelo VHC, o Egito. Selecionaram em clínica obstétrica, parturientes portadoras do VHC e avaliaram a região NS3 do genoma, filogeneticamente. Localizaram entre 699 atendimentos consecutivos 94 infectadas pelo VHC, entre estas 33 tinham marido também portador do vírus. O estudo revelou 30 destes casais com 100% de similaridade em suas cadeias genômicas. (45)

A homologia entre as seqüências apenas sugere uma mesma fonte de infecção em ambos parceiros, porém não permite confirmar onde ou como a infecção foi contraída, se por uma fonte externa como o compartilhar de utensílios de higiene pessoal ou se no intercurso da relação sexual.(12)

A Árvore Filogenética nos mostra 6 amostras solteiras, ou seja, são amostras isoladas e não fazem parte da coorte de casais avaliados. Estão duas no clado subtipo VHC 1a (OTUs 08c, 19b e 13b), uma no clado subtipo VHC 2b (OTU 5a) e duas no clado subtipo VHC 3a (OTUs 14b e 15b). Estas seqüências poderiam ser consideradas como controles selecionados na população geral, não pertencentes a população envolvida no estudo. São amostras tipadas por três diferentes metodologias; a sorotipagem (região NS4-VHC) e genotipagem com base nas regiões 5'NC e NS5b do VHC, para confirmação de seus tipos e subtipos virais.

Os pares de OTUs 19b/10b, 3a/10a, 23b/25b, 15b/23a e 24a/30b, que na topologia da árvore obtida, compartilham um mesmo ancestral comum, par a par, possivelmente representem táxons virais com seqüências bastante similares decorrentes de processos evolutivos randômicos.

Os pares de OTUs 30a/30b, 24a/24b e 23a/23b com similaridades de 96,8%, 98,1% e 95,5% respectivamente, apresentam posições em diferentes clados terminais da árvore filogenética apesar de valores de similaridade alto entre suas cadeias genômicas. Notadamente o táxon 30a apresenta-se como táxon-irmão das demais seqüências do clado subtipo VHC 3a, com exceção de 6a e 6b. Possivelmente estes resultados possam ser em decorrência de viés da metodologia ou, de fato os casais mencionados infectaram-se a partir de diferentes fontes. Novas análises poderão ser realizadas empregando-se os critérios qualitativos da máxima parcimônia para uma verificação mais acurada do clado subtipo 3a do VHC.

A comparação de seqüências genéticas entre casais concordantes tem sido usada como evidência de que a transmissão tenha ocorrido, mas nem sempre é suporte para

poder confirmar a rota de transmissão. Porém, ela sugere fortemente a transmissão sexual quando não se foca nenhum outro fator de risco associado. (24)

O estudo filogenético do VHC é uma poderosa e precisa ferramenta no estudo virológico, principalmente quando se avalia transmissão. Porém, como a PCR, deve ser usada com critério, discernimento e sabedoria para que realmente seja útil no entendimento da infecção pelo VHC.

Se nosso estudo estivesse baseado unicamente na interpretação virológica, sem o respaldo das informações epidemiológicas, poderíamos chegar a discussões muito diferentes das aqui consolidadas. Também, um trabalho com bases unicamente epidemiológicas, corre o risco de ser incompleto nas suas discussões e conclusões.

Finalmente, levando-se em conta que se estima a existência do VHC a pelo menos 2.000 anos, pode-se supor que em um mundo onde práticas modernas de disseminação viral, como transfusão de sangue, transplante de órgãos, uso compartilhado de agulhas para drogas ilícitas ou mesmo quando as seringas descartáveis não estavam em voga, que a transmissão sexual possa ter sido extremamente importante para a manutenção da infecção na raça humana, logicamente hoje, perdendo seu brio para concorrentes de transmissão parenteral muito mais evidentes.

CONCLUSÃO

1. Alta similaridade encontrada entre as cadeias genômicas do VHC pode dar suporte a hipótese de transmissão do VHC entre esses casais.
2. O uso compartilhado de utensílios de higiene pessoal dificulta a interpretação dos dados em relação à transmissão sexual do VHC.
3. A hipótese do sentido mais provável de transmissão do VHC, de homem para mulher, foi reforçada neste trabalho.

PERSPECTIVAS

A família documentada pelas OTUs 8a (pai), 8b (mãe) e 8c (filha), está aqui representada como um exemplo de transmissão intrafamiliar, onde o casal, marido e mulher, (OTUs 8a e 8b) apresenta similaridade de 93,0%; pai e filha (OTUs 8a e 8c) 93,6% e mãe e filha (OTUs 8b e 8c) 99,4%. Nas questões abordadas pelo questionário temos o perfil do pai e esposo como U.D., somado ao fato de a tríade familiar assumir o compartilhamento de utensílios de higiene pessoal, ressaltando o uso comum de lâmina de barbear. Estes fatos somados podem estar justificando a rota de transmissão intrafamiliar neste núcleo.

Famílias que apresentaram mais de um portador do VHC no mesmo domicílio, sem referência de contato sexual, não foi um fato isolado entre os pacientes recrutados, direcionando a perspectiva de continuidade na investigação da transmissão do VHC quanto à possibilidade de disseminação intrafamiliar.

A parceria entre a análise virológica e epidemiológica no estudo da transmissão do VHC, é fundamental e deve necessariamente fazer parte desde a concepção de novos projetos envolvendo a infecção pelo VHC.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
APTO:
BAIRRO:.....CIDADE
.....
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Hepatite C: transmissão entre casais.
PESQUISADOR: Norma de Paula Cavalheiro
CARGO/FUNÇÃO: Biologista
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 5581 CRBM
UNIDADE DO HCFMUSP: LIM-47 - Laboratório de Hepatites
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- | | | | | | |
|-------------|--------------------------|--------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| SEM RISCO | X | RISCO MÍNIMO | <input type="checkbox"/> | RISCO MÉDIO | <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO | <input type="checkbox"/> | RISCO MAIOR | <input type="checkbox"/> | | |
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 5 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1 - Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Estamos estudando a transmissão do VHC pois trata-se de uma doença que acontece em todo o mundo e muitas dúvidas pairam sobre como este vírus é transmitido de uma pessoa para outra. Trata-se de uma doença grave e normalmente crônica que pode levar o paciente a quadros de cirrose e câncer de fígado. Esta pesquisa pretende avaliar a possível transmissão sexual entre casais onde o homem e a mulher apresentem diagnóstico para hepatite C. Para isso vamos analisar o VHC destes casais para tentar saber se é mesmo vírus ou não. Um questionário com perguntas sobre como poderiam também ter adquirido o VHC será utilizado. Precisamos de sua ajuda para tentarmos investigar a provável rota de transmissão sexual da hepatite C.

2 - Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Se você tem hepatite C, deverá fazer exames de sangue de rotina para acompanhamento clínico, para esta pesquisa precisaremos de um pouco mais de sangue (20ml). Esse procedimento não irá mudar seu atendimento normal. Um questionário com perguntas sobre prováveis formas de como você “pegou” a hepatite C será feito, porém em entrevista única e sigilosa.

Os exames de sangue que serão feitos serão os seguintes:

- Nested-PCR-HCV - Diagnóstico da presença do vírus circulante no soro (sangue).
- Genotipagem do VHC - Diagnóstico do tipo do VHC, pode ser de 1 a 6.
- Sequenciamento do genoma do VHC - Para saber se o vírus infectante é o mesmo para o (a) paciente e seu (a) companheiro(a).

3 - Desconfortos e riscos esperados:

Serão os mesmos de qualquer coleta de sangue como dor no local ou inchaço.

4 - Benefícios que poderão ser obtidos:

Você estará ajudando a melhor entender as rotas de transmissão do VHC e principalmente na investigação da provável transmissão sexual. Desta forma também ajudando a melhor entender a doença causada pelo VHC.

5 - Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

Colaborando com este estudo você não terá nenhuma vantagem a mais. Pois será atendido normalmente no Ambulatório de Hepatites ou em qualquer outro setor do Hospital das Clínicas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
 4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
 5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Antonio Alci Barone, Dra. Fátima Mitiko Tengan.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2000

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Laboratório de Hepatites
LIM-47

- 22) Costuma/costumava ter relação anal?.....
- 1) Sim, pelo menos uma vez por mês
2) Sim, às vezes (menos que uma vez por mês, porém mais que uma vez por ano)
3) Raramente (menos que uma vez por ano)
4) Nunca *(Se nunca, passe para o item 32)*
- 23) Quando tinha/tem relação anal, costuma/costumava usar camisinha?.....
- 1) Nunca
2) Sim, às vezes
3) Sim, mais da metade das vezes
4) Sempre
- 24) Já teve relação sexual com parceiro(a) do mesmo sexo (ativo ou passivo).....
- 1- Sim 2- Não *(se não, passe para o item 32)*
- 25) Costuma/costumava ter relação sexual oral com parceiro(a) do mesmo sexo?.....
- 1- Sim 2- Não
- 26) Quantos parceiros(a) do mesmo sexo teve no último ano?.....
- 27) Quantos parceiros(a) do mesmo sexo teve em toda a sua vida?.....
- 28) Quando tinha/tem relação sexual parceiro(a) do mesmo sexo, costuma/costumava usar camisinha.....
- 1) Nunca
2) Sim, às vezes
3) Sim, mais da metade das vezes
4) Sempre
- 29) Já teve relação sexual com travesti?.....
- 1- Sim 2- Não *(se não, passe para o item 32)*
- 30) Com quantos travestis teve relação sexual no último ano?.....
- 31) Com quantos travestis teve relação sexual em toda a sua vida?.....
- 32) Com quantas pessoas teve relação sexual no último ano?.....
- 33) Com quantas pessoas teve relação sexual durante toda sua vida?.....
- 1) 1
2) 2 a 3
3) 4 a 10
4) 11 a 20
5) 21 a 50
6) 51 a 99
7) ≥ 100
- 34) Tem parceiro(a) no momento?.....
- 1- Sim 2- Não *(se não, passe para o item 57)*
- 35) Há quanto tempo vocês estão juntos?..... Anos Meses

Laboratório de Hepatites
LIM-47

- 36) Mora com ele(a)
- 1- Sim 2- Não (*se não, passe para o item 38*)
- 37) Há quanto tempo vocês moram juntos?..... Anos Meses
- 38) Costuma/costumava ter relação anal com seu(sua) parceiro(a) atual?.....
- 1) Sim, pelo menos uma vez por mês
2) Sim, às vezes (menos que uma vez por mês, porém mais que uma vez por ano)
3) Raramente (menos que uma vez por ano)
4) Nunca
- 39) Qual o número médio de relações sexuais por mês com seu(sua) parceiro(a) atual?.....
- 40) Usa camisinha na relação sexual com seu(sua) parceiro(a) atual?.....
- 1) Nunca
2) Sim, às vezes
3) Sim, mais da metade das vezes
4) Sempre
- 41) Que saiba, com quantas pessoas seu(sua) atual parceiro(a) teve relação sexual, no último ano?.....
- 42) Que saiba, com quantas pessoas seu(sua) atual parceiro(a) teve relação sexual na vida toda?.....
- 43) Seu(sua) atual parceiro(a) já usou droga injetável (na veia)?.....
- 1- Sim 2- Não
- 44) Seu(sua) atual parceiro(a) já utilizou droga inalatória?.....
- 1- Sim 2- Não
- 53) Seu(sua) atual parceiro(a) já fez tratamento com diálise?.....
- 1- Sim 2- Não
- 54) Seu(sua) atual parceiro(a) possui alguma tatuagem?.....
- 1- Sim 2- Não
- 55) Seu(sua) atual parceiro(a) já fez acupuntura?.....
- 1- Sim 2- Não
- 56) Seu(sua) atual parceiro(a) já fez recebeu transfusão de sangue?.....
- 1- Sim 2- Não
- 57) Já teve parceiro(a) que usasse droga injetável (na veia)?.....
- 1- Sim 2- Não

Laboratório de Hepatites
LIM-47

- 58) Já teve parceiro(a) que possuísse alguma tatuagem?.....
- 1- Sim 2- Não
- 59) Já teve parceiro(a) que fez acupuntura?.....
- 1- Sim 2- Não *(se não passe para o item 61)*
- 60) Era parceiro(a):.....
- 1) Regular
2) Casual
3) Outro _____
- 61) Já teve parceiro(a) que usasse droga inalatória?.....
- 1- Sim 2- Não *(se não passe para o item 63)*
- 62) Era parceiro(a):.....
- 1) Regular
2) Casual
3) Outro _____
- 63) Já teve parceiro(a) que fizesse tratamento com diálise (problema nos rins)?.....
- 1- Sim 2- Não *(se não passe para o item 65)*
- 64) Era parceiro(a):.....
- 1) Regular
2) Casual
3) Outro _____
- 65) Já teve parceiro(a) que tenha recebido transfusão de sangue?.....
- 1- Sim 2- Não *(se não passe para o item 67)*
- 66) Era parceiro(a):.....
- 1) Regular
2) Casual
3) Outro _____
4) Não teve parceiro que recebeu transfusão de sangue
- 67) Quantas pessoas moram na sua casa?.....
- 68) Alguém que mora na sua casa (exceto esposa/companheira) já recebeu transfusão de sangue (sangue na veia)?.....
- 1- Sim 2- Não
- 69) Alguém que mora na mesma casa (exceto esposo(a)/companheiro(a)) usa ou já usou droga injetável?.....
- 1- Sim 2- Não
- 70) Alguém que mora na mesma casa (exceto esposo(a)/companheiro(a)) já fez tratamento com acupuntura?.....
- 1- Sim 2- Não

Laboratório de Hepatites
LIM-47

71) Alguém que mora na mesma casa (exceto esposo(a)/companheiro(a)) já fez tratamento com diálise (problema nos rins)?.....

1- Sim 2- Não

72) Alguém que mora na mesma casa (exceto esposo(a)/companheiro(a)) usa ou já usou droga inalatória?.....

1- Sim 2- Não

73) Alguém que mora na mesma casa (exceto esposo(a)/companheiro(a)) usa ou já usou tatuagem?.....

1- Sim 2- Não

74) Faz uso compartilhado com seu espos(a)/companheiro(a) dos seguintes objetos:

- 1) Escova de dentes
- 2) Lâmina de barbear
- 3) Barbeador elétrico
- 4) Cortador de unha
- 5) Utensílios de manicure

75) Somando os salários e rendimentos de todas as pessoas da casa, qual foi a renda do último mês?

R\$, ou

Número de salários mínimos:

76) Quantas pessoas dependem desse salários?

77) COMUNICANTES:

DOMICILIARES

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

Laboratório de Hepatites
LIM-47

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

Nome Completo	
Idade	
Tipo de Parentesco	
Tempo de Convivência	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosenberg W. Sex and drugs and HCV? *GUT* 1999; 45: 7-8.
2. Gross JB. Hepatitis C: a sexually transmitted disease? *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3051-3.
3. Filippini P, Coppola N, Scolastico C, Rossi G, Onofrio M, Sagnelli E, Piccinino F. Does HIV infection favor the sexual transmission of hepatitis C? *Sex Transm Dis* 2001; 28:725-9.
4. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 2002; 9: 84-100.
5. Roy E, Haley N, Leclerc P, Boivin JF, Cédras L, Vincelette J. Risk factors for hepatitis C virus infection among street youths. *CMAJ* 2001; 165: 557-60.
6. Tengan FM, Eluf-Neto J, Cavalheiro NP, Barone AA. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43: 133-7.

7. Walsh K, Alexander GJ. Update on chronic viral hepatitis (Review). *Postgrad Med J* 2001; 77: 498-505.
8. Norder H, Bergstrom A, Uhnoo I, Aldén J, Weiss L, Czajkowski J, Magnus L. Confirmation of nosocomial transmission of hepatitis C virus by phylogenetic analysis of the NS5-B region. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3066-9.
9. Thomas DL, Lemon SM. Hepatitis C. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5rd ed. New York; 2000, p:1736-53.
10. Focaccia R, Baraldo DCOM, Souza FV. Epidemiologia. In: Focaccia R, editor. Tratado de hepatites virais. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. p: 221-30.
11. Pinho JRR. O vírus da hepatite C. Silva LC editor. Hepatites agudas e crônicas. 3rd ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p: 26-37.
12. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S99-105.

13. Figueiredo VM, Cruz CN, Oliveira PM. Evidência de Transmissão Sexual do Vírus da Hepatite C: Estudo Sorológico em Cônjuges. *GED* 1995, 14. p:150.
14. Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramer E, Miller JK, Mandel E, Hadler SC, Margolis HS. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* 1989; 262:1201-15.
15. Daikos GL, Lai S, Fischl MA. Hepatitis C virus infection in a sexually active inner city population. The potential for heterosexual transmission. *Infection* 1994; 22:72-6.
16. Mello IM, Medeiros-Filho JE, Rebelo Pinho JR, Anjos LL, Carrilho FJ. Evidence of intrafamilial transmission of hepatitis C virus: analysis of relatives and spouses of hepatitis C virus patients. In: XIIth International Congress of Virology. Paris: International Union of Microbiological Societies World Congress; 2002. Abstract n. V-344. 27th July to 1st August.
17. Zylberberg H, Thiers V, Lagorce D, Squadrito G, Leone F, Berthelot P, Brechot C, Pol S. Epidemiological and virological analysis of couples infected with hepatitis C virus. *GUT* 1999; 45:112-6.
18. Tanaka K, Stuver SO, Ikematsu H, Okayama A, Tachibana N, Hirohata T, Kashiwagi S, Tsubouchi H, Mueller NE. Heterosexual transmission of

- hepatitis C virus among married couples in southwestern Japan. *Int J Cancer* 1997; 72: 50-5.
19. Marincovich B, Castilla J, del Romero J, Garcia S, Hernando V, Raposo M, Rodriguez C. Absence of hepatitis C virus transmission in a prospective cohort of heterosexual serodiscordant couples. *Sex Transm Infect* 2003; 79:160-2.
 20. Gunn RA, Murray PJ, Ackers ML, Hardison WG, Margolis HS. Screening for chronic hepatitis B and C virus infections in an urban sexually transmitted disease clinic: rationale for integrating services. *Sex Transm Dis* 2001; 28:166-70.
 21. Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36:47-53.
 22. Flamm SL. Chronic hepatitis C virus infection. *JAMA* 2003; 289:2413-7.
 23. Page-Shafer KA, Cahoon-Young B, Klausner JD, Morrow S, Molitor F, Ruiz J, McFarland W; Young Women's Survey Team. Hepatitis C virus infection in young, low-income women: the role of sexually transmitted infection as a potential cofactor for HCV infection. *Am J Public Health* 2002; 92:670-6.

24. Rooney G, Gilson RJ.. Sexual transmission of hepatitis C virus infection. *Sex Transm Infect* 1998; 74: 399-404.
25. Quer J, Esteban JI. Epidemiology. In: Zuckerman AJ, Howard CT, editors. *Viral hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998. p: 271-83.
26. Bodsworth NJ, Cunningham P, Kaldor J, Donovan B. Hepatitis C virus infection in a large cohort of homosexually active men: independent associations with HIV-1 infection and injecting drug use but not sexual behaviour. *Genitourin Med* 1996; 72:118-22.
27. Brook MG. Sexually acquired hepatitis. *Sex Transm Infect* 2002; 78:235-40.
28. Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. *Arch Intern Med* 2000; 160:3365-73.
29. Neaigus A, Miller M, Friedman SR, Des Jarlais DC. Sexual transmission risk among noninjecting heroin users infected with human immunodeficiency virus or hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2001; 184:359-63.
30. Dore GJ, Law M, MacDonald M, Kaldor JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *J Clin Virol* 2003; 26: 171-84.

31. Neumayr G, Propst H, Schwaighofer H, Judmaier G, Vogel W. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *QJM* 1999; 92: 505-8.
32. De Mercato R, Cantiello JP, Celentano U, Guarnaccia D, Ciannella G. Hepatitis C virus infection in family members of chronic carriers. *Minerva Med* 1996; 87: 335-7.
33. Garcia-Bengoechea M, Cortes A, Lopez P, Vega JL, Emparanza JI, Sarriugarte A, Santos E, Arenas JI. Intrafamilial spread of hepatitis C virus infection. *Scand J Infect Dis* 1994; 26:15-8.
34. Kao JH, Hwang YT, Chen PJ, Yang PM, Lai MY, Wang TH, Chen DS. Transmission of hepatitis C virus between spouses: the important role of exposure duration. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:2087-90.
35. Fiscus SA, Kelly WF, Battigelli DA, Weber DJ, Schoenbach VJ, Landis SE, Wilber JC, Van der Horst CM. Hepatitis C virus seroprevalence in clients of sexually transmitted disease clinics in North Carolina. *Sex Transm Dis* 1994; 2:155-60.
36. Soto B, Rodrigo L, Garcia-Bengoechea M, Sanchez-Quijano A, Riestra S, Arenas JI, et al. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the

- index case. A multicentre study of 423 pairings. *J Intern Med* 1994; 235: 515-9.
37. McKenna JG, Evans G, Lyttle PH, Couper A. Hepatitis C virus seroprevalence in patients attending a sexual health centre. *N Z Med J* 1994; 107:8-10.
38. Passos EP, Silveira TR, Salazar CC, Facin AC, Souza CA, Guerin YL, Gratao AA, Cunha-Filho JS. Hepatitis C virus infection and assisted reproduction. *Hum Reprod* 2002; 17: 2085-8.
39. Chang TT, Liou TC, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Shin JS, Wu HL. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: the important role of inapparent transmission. *J Med Virol* 1994; 42: 91-6.
40. Mele A, Stroffolini T, Tosti ME, Corona R, Santonastasi F, Gallo G, Ragni P, Balocchini E, Bernacchia R, Moiraghi A. Heterosexual transmission of hepatitis C in Italy. *J Med Virol* 1999; 57: 111-3.
41. Salleras L, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Dominguez A, Salleras M, Navas E, Gali N. Importance of sexual transmission of hepatitis C virus in seropositive pregnant women: a case-control study. *J Med Virol* 1997; 52: 164-7.

42. Tanzi E, Romano L, Zanetti AR. Hepatitis type C: modes of transmission and preventive measures. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13 Suppl 13:S13-6.
43. Diago M, Zapater R, Tuset C, Carbonell P, Gonzalez C, Cors R, Casas E. Intrafamily transmission of hepatitis C virus: sexual and non-sexual contacts. *J Hepatol* 1996; 25:125-8.
44. Saltoglu N, Tasova Y, Burgut R, Dundar IH.. Sexual and non-sexual intrafamilial spread of hepatitis C virus: intrafamilial transmission of HCV. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 225-8.
45. Kumar RM. Interspousal and intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a myth or a concern? *Obstet Gynecol* 1998; 91: 426-31.
46. Okayama A, Stuver SO, Tabor E, Tachibana N, Kohara M, Mueller NE, Tsubouchi H. Incident hepatitis C virus infection in a community-based population in Japan. *J Viral Hepat* 2002; 9: 43-51.
47. Kim YS, Chi HS, Ahn YO, Lee HS, Klag MJ. Lack of familial clustering of hepatitis C virus infection. *Int J Epidemiol* 1998; 27:525-9.
48. Bell, B.P., Sofair, A., Manos, M.M., Zaman, A., Thomas, A., Murphy, R.C., Durante, A., Wurtzel, H.L., Bower, W., Terrault, N. The Epidemiology of Newlydiagnosed Chronic Liver Disease in the United State. In: 11th

International Hepatitis & Liver Disease, Sydney, Austrália, 6 – 10 Apr 2003.
p.58.

49. Ideo G, Bellati G, Pedraglio E, Bottelli R, Donzelli T, Putignano G. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335: 353.
50. Hou CH, Chen WY, Kao JH, Chen DS, Yang Y, Chen JJ, Lee SH, Wu DJ, Yang SC. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in hemodialysis patients. *J Medical Virol* 1995; 45: 381-5.
51. Silverman AL, Puccio JE, Kulesza GW, McCray DG, Gordon SC. HCV RNA is present in the menstrual blood of women with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1201-2.
52. Nakashima K, Ikematsu H, Hayashi J, Kishihara Y, Mutsutake A, Kashiwagi S. Intrafamilial transmission of hepatitis-C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA* 1995; 274: 1459-61.
53. Shev S, Hermodsson S, Lindholm A, Malm E, Widell A, Norkrans G. Risk factor exposure among hepatitis C virus RNA positive Swedish blood donors - the role of parenteral and sexual transmission. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 99-104.

54. Sanchez-Beiza L, Bravo R, Toribio R, Navarro S, Soriano V. Sexual transmission of two different HCV types causing acute hepatitis C. *Vox Sang* 1996; 71: 244-5.
55. Coltorti M, Caporaso N, Morisco F, Suozzo R, Romano M, D'Antonio M. Prevalence of hepatitis C virus infection in the household contacts of patients with HCV-related chronic liver disease. *Infection* 1994; 22:183-6.
56. Nyamathi A, Robbins WA, Fahey JL, Wiley D, Pekler VA, Longshore D, Robins TA, Singh J, Saab S. Presence and predictors of hepatitis C virus RNA in the semen of homeless men. *Biol Res Nurs* 2002; 4:22-30.
57. Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2625-30.
58. Clemente CM, Carrilho FJ. Epidemiologia. Caetano LC editor. Hepatites agudas e crônicas. 3rd ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p: 109-34.
59. Scotto G, Savastano AM, Fazio V, Conte PE, Ferrara S, Mangano A, Tantimonaco G. Sexual transmission of hepatitis C virus infection. *Eur J Epidemiol* 1996; 12:241-4.

60. Herrine SK. Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2002; 136: 747-57.
61. Stroffolini T, Lorenzoni U, Menniti-Ippolito F, Infantolino D, Chiaramonte M. Hepatitis C virus infection in spouses: sexual transmission or common exposure to the same risk factors? *Am J Gastroenterol* 2001; 96:3138-41.
62. Riestra S, Fernandez E, Rodriguez M, Rodrigo L. Hepatitis C virus infection in heterosexual partners of HCV carriers. *J Hepatol* 1995; 22:509-10.
63. Capelli C, Prati D, Bosoni P, Zanuso F, Pappalettera M, Mozzi F, De Mattei C, Zanella A, Sirchia G. Sexual transmission of hepatitis C virus to a repeat blood donor. *Transfusion* 1997; 37: 436-40.
64. Quer J, Murillo P, Esteban JI, Martell M, Esteban R, Guardia J. Sexual transmission of hepatitis C virus from a patient with chronic disease to his sex partner after removal of an intrauterine device. *Sex Transm Dis* 2003; 30:470-1.
65. Hershov RC, Kalish LA, Sha B, Till M, Cohen M. Hepatitis C virus infection in Chicago women with or at risk for HIV infection: evidence for sexual transmission. *Sex Transm Dis* 1998; 25:527-32.

66. Alberti A, Benvegna L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1:S104-18.
67. Houghton M. Hepatitis C virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincourt–Raven; 1996, v.1, p.1035-58.
68. Souto FJ, Fontes CJ, Martinelli CM, Turchi MD, Martins RM, Andrade AL. Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 719-23.
69. Mesquita PE, Granato CF, Castelo A. Risk factors associated with hepatitis C virus (HCV) infection among prostitutes and their clients in the city of Santos, Sao Paulo State, Brazil. *J Med Virol* 1997; 51: 338-43.
70. Utsumi T, Hashimoto E, Okumura Y, Takayanagi M, Nishikawa H, Kigawa M, Kumakura N, Toyokawa H. Heterosexual activity as a risk factor for the transmission of hepatitis C virus. *J Med Virol* 1995; 46: 122-5.
71. Nakashima K, Kashiwagi S, Hayashi J, Urabe K, Minami K, Maeda Y. Prevalence of hepatitis C virus infection among female prostitutes in Fukuoka, Japan. *J Gastroenterol* 1996; 31: 664-8.

72. Laurent C, Henzel D, Mulanga-Kabeya C, Maertens G, Larouze B, Delaporte E. Seroepidemiological survey of hepatitis C virus among commercial sex workers and pregnant women in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 872-7.
73. Willians IT, Nainan O, Aragon T, Fleenor M, Judson F, Mottram K, Homan H, Gill J, Gao F, Zhang X, Alter MJ. Hepatitis C virus (HCV) infected sex partners as a source for infection among persons with acute hepatitis C. In: 11th International Hepatitis & Liver Disease, Sydney, Austrália, 6 – 10 Apr 2003. p. 57.
74. Cassuto NG, Sifer C, Feldmann G, Bouret D, Moret F, Benifla JL, et al. A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Hum Reprod* 2002; 17: 3153-6.
75. Meisel H, Reip A, Faltus B, Lu M, Porst H, Wiese M, Roggendorf M, Krüger DH. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. *Lancet* 1995; 345: 1209-11.
76. Fabris P, Infantolino D, Biasin MR, Marchelle G, Venza E, Terribile Wiel Marin V, Benedetti P, Tositti G, Manfrin V, de Lalla F. High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but

no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection* 1999; 27: 86-91.

77. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, Quinn TC. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted disease clinics in Baltimore – an analysis of 309 sex partnership. *J Infect Dis* 1995; 171: 768-75.
78. Morsica G, Sitia G, Bernardi MT, Tambussi G, Novati R, De Bona A, et al. Acute self-limiting hepatitis C after possible sexual exposure: sequence analysis of the E-2 region of the infected patient and sexual partner. *Scand Journal Infect Dis* 2001; 33: 116-20.
79. Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Molecular analysis of intraspousal transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1995; 22: 431-9.
80. Piazza M, Sagliocca L, Tosone G, Guadagnino V, Stazi MA, Orlando R, Borgia G, Rosa D, Abrignani S, Palumbo F, Manzin A, Clementi M. Sexual transmission of the hepatitis C virus and efficacy of prophylaxis with intramuscular immune serum globulin. A randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1537-44.

81. Ross RS, Viazov S, Varenholz C, Roggendorf M. Inquiries on intraspousal transmission of hepatitis C virus: benefits and limitations of genome sequencing and phylogenetic analysis. *Forensic Sci Int* 1999; 100: 69-76.
82. McGarvey MJ, Houghton M, Weiner AJ. Structure and Molecular Virology. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, editors. *Viral hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998, p: 253-70.
83. Choo Q-L, Pinho JRR. Virologia molecular. Variabilidade viral. In: Focaccia R, editor. *Tratado de hepatites virais*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. p:195-204.
84. Choo Q-L, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:2451-5.
85. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244:362-4.
86. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 1998;143:2493-503.

87. Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, Beyou A, Monnet A, Mazure C, Roggendorf M. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3581-4.
88. Maertens G, Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: Harrison TJ, Zuckerman AJ, editors. *The molecular medicine of viral hepatitis*. London: John Wiley & Sons; 1997. p: 183-233.
89. Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi G. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol* 2001; 63:17-21.
90. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19:1321-4.
91. Smith DB, Simmonds P. Hepatitis C virus. types, subtypes and beyond. Lau, Johnson Yiu-Nam editor. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.11, p.133-46.
92. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21:570-83.
93. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus:

- quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15:41-63.
94. McGarvey MJ, Houghton M, Weiner AJ. Structure and Molecular Virology. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, editors. *Viral hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998, p: 253-70.
95. Simmonds P, Mellor J, Craxi A, Sanchez-Tapias JM, Alberti A, Prieto J, et al. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *J Hepatol* 1996; 24:517-24.
96. Miyaki, C. Y., Russo, C.A.M., Pereira, S.L. Reconstrução Filogenética. Introdução e o Método da Máxima Parcimônia. Capítulo 9. *Biologia Molecular e Evolução*, ed. Sérgio Russo Matiolo, editora Holos, p. 97-107, 2001.
97. Mizokami M, Ohno T. Determination of HCV quasispecies by cloning and sequencing. In: Lau JY-N editor. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa: Humana Press; 1998. p: 207-11.
98. Russo CA. Como Escolher Genes para Problemas Filogenéticos Específicos. In: Matioli SR, editor. *Biologia Molecular e Evolução*. 1th ed. Ribeirão Preto: Holos Editora; 2001. p. 130-136.
99. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D,

- Barbara JA, Contreras M, Aloysius S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990; 335:1419-22.
100. Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1990a; 336:878-9.
101. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
102. Shirota Y, Luo H, Qin W, Kaneko S, Yamashita T, Kobayashi K, Murakami S. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 2002; 277:11149-55.
103. Young KK, Resnick RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol.* 1993 Apr;31(4):882-6.
104. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, de Ledinghen V, Couzigou P, et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol* 2001; 39:1771-3.

105. Mizokami M, Ohno T. Determination of HCV quasispecies by cloning and sequencing. In: Lau JY-N editor. Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine. Totowa: Humana Press; 1998. p: 207-11.
106. Cavaleiro NP, Barone AA, Tengan FM. HCV Serotypes in brazilian patients. *Int J Infect Dis* 2002; 6: 228-32.
107. Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, De Bortholi Santos E, Mitre HP, De Mendonca JS, De Paula Cavaleiro N, Barone AA, Wendel S. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. *J Clin Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2645-7.