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

Infecção pelo vírus da hepatite C na população de Londrina e região norte do Paraná: aspectos soroepidemiológicos e moleculares

Ingridt Hildegard Vogler

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Adelaide Jose Vaz

São Paulo
2003

Ingridt Hildegard Vogler

Infecção pelo vírus da hepatite C na população de Londrina e região norte do Paraná: aspectos soroepidemiológicos e moleculares

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Adelaide Jose Vaz
orientador/presidente

Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino
1º. examinador

Profa. Dra. Kioko Takei
2º. examinador

São Paulo, 03 de outubro de 2003.

A Deus

- *aos meus pais Udo e Mathilde pela dedicação e amor constantes.*
- *a minha orientadora Prof. Dra. Adelaide Jose Vaz pela paciência, confiança e pelas lições ensinadas durante todo este período.*
- *às professoras Edna Maria Vissoci Reiche e Helena Kaminami Morimoto do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia da Universidade Estadual de Londrina pelo incentivo e apoio sem os quais este trabalho não seria possível.*
- *às Dra. Denise Akemi Mashima e Dra. Cristina Faune, da direção do Hemocentro Regional de Londrina, e ao Dr. André Luiz Bortoliero, do ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hemocentro pelo apoio junto à coleta de amostras e dados dos doadores de sangue.*
- *aos funcionários do HURNP e Hemocentro Regional de Londrina pelo auxílio prestado. O meu agradecimento especial ao Osmar (Hemocentro), Henrique (Arquivo/HU), Antônio (Arquivo/AHC) e Luciano (LAC) pela dedicação exemplar com que realizam suas funções.*
- *aos funcionários dos setores de Imunologia / Radioimunoensaio / SIDA pela paciência e compreensão durante todo o período de estudos.*
- a Dra. *Adriana A. F. S. Georgeto e Dr. Arilson Akira Morimoto pelo auxílio na obtenção das amostras.*
- *à Dra. Ester Cerdeira Sabino pela preciosa colaboração na realização dos testes moleculares, pela confiança depositada e por todas as sugestões apresentadas no Exame de Qualificação para a melhoria do trabalho.*
- *à Prof. Dra. Kioko Takei pela participação no Exame de Qualificação e pelo auxílio na correção do trabalho.*
- *a Anna Nishiya pela ajuda preciosa na realização dos exames de Biologia Molecular. Também a Suzete Cleusa Ferreira, Walter Kleine Neto, Cláudia Barreto e Sabri Said Sabadane que ajudaram em tudo o que estivesse ao alcance.*
- *a Tiemi Matsuo pelo auxílio na análise estatística.*
- *aos professores da FCF/USP e colaboradores que ministraram aos alunos do MINTER e acreditaram no potencial do grupo.*
- *a Maria Luiza Trotta do Carmo, da biblioteca do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela confecção da ficha catalográfica.*
- *a minha prima Sandra Unbehaum, e ao Jefferson, Marco Antônio e Luis Guilherme pelo carinho com que me acolheram nesta cidade.*

SUMÁRIO

Página

Lista de figuras..... viii
Lista de tabelas..... ix
Lista de abreviaturas e siglas..... x
Resumo xii
Abstract xiii

I. INTRODUÇÃO..... 01
1. O vírus da hepatite C..... 01
2. Aspectos epidemiológicos..... 03
3. Aspectos clínicos..... 08
4. Diagnóstico laboratorial..... 12
1. Diagnóstico sorológico e bioquímico..... 12
2. Diagnóstico molecular..... 16
3. Genotipagem..... 19
5. Tratamento..... 22
6. Justificativa e relevância..... 25
II. OBJETIVOS..... 28
III. MATERIAL E MÉTODOS..... 29
1. Casuística..... 29
1. Pacientes..... 29
1. Caracterização das amostras anti-HCV reagente quanto aos aspectos de sexo e idade..... 30
2. Amostras de sangue..... 31
2. Instrumentos de medida..... 31
1. Reações sorológicas para pesquisa de anticorpos anti-HCV..... 31
1. Testes imunoenzimáticos..... 31

1. Metodologia automatizada MEIA..... 33
2. Metodologia de ELISA em microplaca..... 33
2. Immunoblot (IB)……. 34
2. Detecção do HCV-RNA..... 35
1. Extração do HCV-RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)..... 36
2. Reação de amplificação por PCR..... 37
3. Detecção do produto de PCR..... 39
3. Genotipagem..... 39
1. Purificação do produto amplificado..... 40
2. Reação de Seqüenciamento..... 40
3. Determinação dos genótipos..... 41
1. Seqüências padrão..... 41
2. Classificação pelo painel de posições de nucleotídeos..... 42
3. Análise estatística..... 45
IV. RESULTADOS..... 46
1. Avaliação da freqüência de anticorpos anti-HCV utilizando o enzimaimunoensaio de micropartículas (MEIA)..... 46
1. Doadores de sangue..... 46
2. Indivíduos infectados pelo HIV..... 46
3. Avaliação da freqüência de anticorpos anti-HCV utilizando o ELISA e a PCR para confirmação dos resultados reagentes no MEIA..... 47
2. Análise dos testes sorológicos e PCR..... 48
1. Avaliação da relação DO/CO no teste imunoenzimático (MEIA)..... 48
2. Avaliação pelo teste imunoenzimático em microplaca (ELISA)..... 48
3. Pesquisa de anticorpos anti-HCV pelo teste suplementar *immunoblot* (IB)..... 49
4. Detecção do HCV-RNA por PCR..... 50

5. Análise conjunta dos testes sorológicos e PCR... 50
3. Genotipagem..... 53
4. Aspectos epidemiológicos..... 54
1. Fatores de risco associados à infecção pelo HCV.... 54
V. DISCUSSÃO..... 57
1. Freqüência de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue.... 57
2. Freqüência de anticorpos anti-HCV em indivíduos HIV positivos..... 59
3. Avaliação dos testes sorológicos e moleculares..... 59
4. Genotipagem do HCV..... 63
5. Aspectos epidemiológicos..... 66
VI. CONCLUSÕES..... 70
VII. ANEXOS..... 72
1. Modelo do Questionário para avaliação dos fatores de risco, utilizado na entrevista com os pacientes..... 72
2. Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelos pacientes..... 75
3. Caracterização das amostras submetidas a genotipagem do HCV, avaliadas quanto aos aspectos de sexo e idade..... 76
4. Perfil sorológico e molecular das amostras anti-HCV reagentes avaliadas..... 77
5. Freqüência de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue e indivíduos HIV soropositivos..... 78
6. Perfil sorológico e molecular das amostras submetidas ao IB... 79
7. Freqüência dos fatores de risco associados à infecção pelo HIV entre os indivíduos infectados pelo HCV..... 80
8. Valor Preditivo Positivo (VPP) dos testes imunoenzimáticos, avaliado pelos resultados conclusivos pelo IB e/ou pela PCR... 80
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 81

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Diagrama representativo da casuística empregada no trabalho e dos métodos laboratoriais utilizados para avaliação da mesma..... 32

Figura 2: Região 5' NCR do HCV. Comparação entre seqüências dos genótipos 1 a 6, identificadas (à esquerda) pelo número de acesso no GenBank seguido do subtipo do HCV correspondente..... 43

Figura 3: Foto ilustrativa do produto da *nested*-PCR para HCV detectado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo..... 50

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Freqüência de positividade para anticorpos anti-HCV em diferentes grupos populacionais..... 04

Tabela 2: Distribuição dos genótipos do HCV em grupos populacionais de diferentes países..... 05

Tabela 3: Caracterização dos diferentes grupos de pacientes soropositivos para HCV, avaliados quanto aos aspectos de idade e sexo..... 31

Tabela 4: Descrição dos *primers* utilizados na reação de PCR para amplificação de um fragmento da região 5' NCR do RNA do HCV..... 38

Tabela 5: Posição dos nucleotídeos específicos para identificação dos subtipos do HCV por seqüenciamento da região 5' NCR do genoma viral..... 44

Tabela 6: Avaliação do desempenho das amostras reativas pelo MEIA nos ensaios de ELISA e PCR..... 52

Tabela 7: Perfil sorológico de 15 amostras avaliadas por dois testes imunoenzimáticos de detecção de anticorpos anti-HCV (MEIA e ELISA) comparado com o teste suplementar (IB).... 52

Tabela 8: Freqüência dos genótipos e subtipos do HCV em doadores de sangue, pacientes com hepatite C crônica e indivíduos infectados com o HIV..... 54

Tabela 9: Freqüência dos fatores de risco associados à infecção pelo HIV entre os indivíduos com HCV-RNA detectável pela PCR 55

Tabela 10: Freqüência subtipos do HCV nos diversos grupos de risco identificados em 61 amostras da população estudada..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5' NCR	Região não codificadora da extremidade 5' do genoma do HCV
ALT	Alanina aminotransferase
bDNA	DNA ramificado (*branched DNA*)
bp	Pares de bases
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, instituição sediada em Atlanta (EUA)
cDNA	DNA complementar
core	Nucleocapsídeo do HCV
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfatado
DO/CO	Relação entre densidade óptica (DO) da amostra e o *cut-off* (CO) do ensaio
DTT	Dithiothreitol
E1	Região 1 do envelope do genoma do HCV
E2	Região 2 do envelope do genoma do HCV
ELISA	Ensaio imunoenzimático de fase sólida
ELISA-1	ELISA de 1ª geração
ELISA-2	ELISA de 2ª geração
ELISA-3	ELISA de 3ª geração
GL	Graus de liberdade
HAV	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HCV-RNA	Genoma do HCV constituído de uma fita de RNA
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HURNPR	Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná
HVR-1	Região hipervariável 1 (*hypervariable region*) do envelope do HCV

HVR-2	Região hipervariável 2 (*hypervariable region*) do envelope do HCV
IB	*Immunoblot*
IDU	Usuário de drogas injetáveis
IFN	Interferon
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LiPA	Ensaio de hibridização por sonda linear (*line probe assay*)
MEIA	Enzimaimunoensaio de micropartículas
MMWR	Publicação do CDC (Atlanta, EUA)
MS	Ministério da Saúde (Brasil)
NAT	Ensaio de biologia molecular aplicado em bancos de sangue (*nucleic acid tests*)
nested-PCR	PCR realizada em 2 etapas de amplificação consecutivas
NIH	National Institutes of Health
NS1	Região não-estrutural 1 do genoma do HCV
NS2	Região não-estrutural 2 do genoma do HCV
NS3	Região não-estrutural 3 do genoma do HCV
NS4	Região não-estrutural 4 do genoma do HCV
NS5A	Região não-estrutural 5A do genoma do HCV
NS5B	Região não-estrutural 5B do genoma do HCV
PCR	Reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
primer	Seqüência de oligonucleotídeos iniciadora, utilizada na PCR
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)
RIBA	Ensaio de detecção de proteínas recombinantes do HCV no formato de *Immunoblot* (*recombinant immunoblot assay*)
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SSCP	Polimorfismo de conformação de fita simples (*single-strand conformation polymorfism*)
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	Organização Mundial de Saúde

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em indivíduos de Londrina e regiões circunvizinhas. Amostras de doadores de sangue e de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram analisadas pela metodologia de enzimaimunoensaio de micropartículas (MEIA), obtendo-se a freqüência de positividade para anticorpos anti-HCV de 0,8% e de 20,2%, respectivamente.

Um conjunto de 185 amostras soropositivas para anti-HCV pelo MEIA foi submetido a outros testes laboratoriais, para avaliação da correlação entre os diferentes métodos empregados. Apenas 79% destas amostras apresentaram resultado reagente em um segundo teste imunoenzimático (ELISA) empregado, sendo que a maior proporção de resultados discordantes ocorreu entre doadores de sangue. O mesmo ocorreu na pesquisa do RNA viral, onde 111 (67%) das 166 amostras analisadas apresentaram resultado positivo, sendo que a positividade foi maior entre indivíduos HIV soropositivos e pacientes com hepatite crônica do que entre os doadores de sangue. Quinze amostras foram submetidas ao *immunoblot* (IB), tendo-se obtido resultados positivos neste teste apenas nas amostras reagentes nos dois métodos imunoenzimáticos utilizados. Também pudemos verificar um grande número de amostras com resultado indeterminado no IB, inclusive entre amostras que eram negativas no segundo teste sorológico.

Embora a amostragem fosse pequena, com apenas 61 amostras analisadas, a genotipagem do HCV revelou que os genótipos circulantes em nossa região são o tipo 1 (77,1%), seguido do tipo 3 (21,3%) e o tipo 2 (1,6%).

Finalmente, avaliamos alguns fatores de risco associados à infecção pelo HCV, sendo que o principal fator de risco encontrado em indivíduos co-infectados pelo HIV/HCV foi o uso de drogas injetáveis, e em indivíduos sem infecção pelo HIV foi a transfusão sangüínea.

O presente estudo contribuiu para a avaliação do perfil da infecção pelo HCV em indivíduos da nossa população, permitindo inclusive verificar a distribuição dos genótipos do HCV nesta região.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate hepatitis C virus (HCV) infection in individuals of Londrina, Paraná State, Brazil, and adjacent areas. Samples of blood donors and individuals infected with Human Immunodeficiency virus (HIV) were analyzed by microparticle enzyme immunoassay (MEIA). Anti-HCV antibody frequency was 0.8% in blood donors, and 20.2% in HIV patients.

A group of 185 anti-HCV positive samples by MEIA was submitted to other laboratorial tests, in order to access the correlation among different methods used. Only 79% of samples were reactive by a second antibody-screening test (enzime-linked immunosorbent assay - ELISA), and a great proportion of discordant results was verified among blood donors. The same happened at HCV-RNA detection by polymerase chain reaction (PCR), where 111/166 (67%) of samples showed positive results, which was greater among HIV positive individuals and patients with chronic hepatitis than among blood donors. Only 15 samples were submitted to immunoblot (IB): positive results were obtained only at samples which were also reactive by the two antibody-screening tests used. We could also verify a great number of anti-HCV indeterminate results by IB, which also happened among samples tested negative by the second serologic assay.

Although the small number of samples used in genotype determination of HCV, only 61, our data revealed that the circulating genotypes in our region are type 1 (77.1%), followed by type 3 (21.3%) and type 2 (1.6%).

Finally, we evaluated some risk factors associated to HCV infection, and we found that intravenous drug use was the most common risk factor among patients HIV/HCV co-infected, while blood transfusion was the most important risk factor in the group without HIV infection.

The present study contributed to the evaluation of HCV infection in our population, so that the distribution of HCV genotypes in the region could be accessed.