

I. INTRODUÇÃO

O vírus da Hepatite C (HCV) foi clonado por CHOO e colaboradores (1989) antes mesmo da sua identificação ou da sua visualização. A extração do RNA, seguida de cópia em um DNA complementar e clonagem do ácido nucléico, foi realizada no plasma de um chimpanzé que havia sido infectado pela hepatite não-A não-B através da administração de concentrado de fator XIII contaminado. A descoberta do HCV ocorreu após um período de intensas pesquisas na busca do agente responsável por 80% das hepatites pós-transfusionais não-A não-B (VARDAS *et al.*, 1999).

1. O vírus da hepatite C

O HCV é um vírus da família *Flaviviridae*, contendo envelope e uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 9.400 nucleotídeos, constituída por uma região não codificadora na porção 5' terminal (5' NCR) contendo 341 bases, uma grande região de leitura aberta que codifica a poliproteína de 3011 aminoácidos e uma região 3' terminal contendo cerca de 27 bases. Semelhante às funções conhecidas da maioria das proteínas dos flavivírus, as três proteínas da porção 5' terminal (C, E1, e E2/NS1) são estruturais e as quatro proteínas não estruturais da porção 3' terminal (NS2, NS3, NS4 e NS5) são responsáveis pela replicação viral (ZEIN & PERSING, 1996).

Humanos e chimpanzés são as únicas espécies susceptíveis à infecção pelo HCV, desenvolvendo doenças similares (WHO, 2000). A grande dificuldade no estudo da hepatite C reside no fato de não haver meios de cultura adequados à pesquisa do vírus ou mesmo animais de experimentação, exceto o chimpanzé, porém com custos proibitivos. Nas poucas investigações realizadas, estudos demonstram que chimpanzés se reinfectam com vírus homólogos ou heterólogos, mesmo na presença de anticorpos neutralizantes (FARCI *et al.*, 1992). Ratos transgênicos que conseguem expressar a proteína do core desenvolvem esteatose hepática no início da infecção pelo HCV, evoluindo posteriormente para carcinoma

hepatocelular. Já as proteínas E1/E2, nesse mesmo modelo animal, provocam o desenvolvimento de manifestações extra-hepáticas, em glândulas salivares e lacrimais, semelhantes à síndrome de Sjögren (JOO & HABN, 2000, *apud* STRAUSS, 2001).

O HCV é caracterizado por uma alta heterogeneidade genética. Algumas regiões do genoma, como 5' NCR e *core*, são bastante conservadas, enquanto as regiões do envelope (E) e não-estrutural 5A (NS5A) apresentam alta variabilidade (BASSIT *et al.*, 1999; FARCI & PURCELL, 2000). A região E2 é a mais variável de todo o genoma viral e apresenta duas regiões específicas, denominadas de regiões hipervariáveis (*hypervariable region*) HVR-1 e HVR-2, que sofrem freqüentes substituições de nucleotídeos durante a infecção persistente e o tratamento com interferon (IFN) (TAYLOR *et al.*, 2000). Acredita-se que a região HVR-1 deva conter um dos principais epítomos de neutralização do HCV, sendo um dos principais alvos dos anticorpos anti-HCV (THELU *et al.*, 2001). Mutações nesta região devem servir para a evasão da resposta imune. Além disso, trata-se de uma região altamente variável entre os pacientes e que pode ser usada para identificar isolados individuais de HCV, com particular interesse em estudos epidemiológicos (GRAHOVAC *et al.*, 2001).

A variação na seqüência de ácidos nucléicos ocorre na faixa de 30-35% sobre todo o genoma do HCV como conseqüência da alta propensão a erro da polimerase RNA-dependente dos vírus RNA. A taxa de substituição de bases é estimada em $1,5 \times 10^{-3}$ por sítio por ano (SIMMONDS, 1995 *apud* ERENDOY, 2001). Isso determina quatro níveis de variabilidade genética entre os isolados: tipos, subtipos, isolados e *quasispecies* (FARCI & PURCELL *et al.*, 2000). Genótipos distintos apresentam divergência de nucleotídeos maiores do que 25% em todo o genoma, enquanto que os subtipos dentro de um mesmo genótipo apresentam homologia de 75-86%. Divergências mais estreitas dentro de uma mesma cepa, variando em apenas 1-9% dos nucleotídeos, constituem as *quasispecies* (SCHIFF *et al.*, 1999; OLIVEIRA M. *et al.*, 1999). *Quasispecies* são definidas como uma mistura variável de uma seqüência

de nucleotídeos mestre, ou ainda como um espectro de moléculas mutantes isoladas de um mesmo indivíduo, resultante das elevadas taxas de erro na replicação do RNA (HOLLAND *et al.*, 1992 *apud* GINABREDA *et al.*, 1997). *Quasispecies* mudam no indivíduo ao longo do tempo, enquanto que o genótipo não. A maior ou menor diversidade das *quasispecies* parece estar relacionada com a pressão imunológica, já que costuma haver pouca heterogeneidade nas fases iniciais da infecção, com aminotransferases normais, e muita nos casos de infecção hepática avançada e/ou baixa resposta terapêutica (STRAUSS, 2001).

O primeiro sistema de classificação dos genótipos foi proposto por Okamoto e colaboradores e incluía os tipos I, II, III, IV, V e VI, identificados por algarismos romanos. Um segundo sistema foi proposto por Simmonds e colaboradores e consistia em 6 genótipos principais e 11 subtipos: 1a, 1b e 1c, 2a, 2b e 2c, 3a e 3b, 4a, 5a, e 6a. Este último sistema passou a ser recomendado para classificação do HCV em estudos realizados a partir de 1994 por permitir a adição de novos genótipos, identificados por algarismos arábicos, e novos subtipos, identificados por letras minúsculas, de forma fácil e com um mínimo de confusão que outros sistemas poderiam causar (SIMMONDS *et al.*, 1994; ZEIN & PERSING, 1996). O grande número de isolados já descritos, contando com mais de 50 subtipos diferentes do HCV, comprovou a necessidade desta padronização (BUKH *et al.*, 1995 *apud* CDC, 1998; NIH, 2002).

2. Aspectos epidemiológicos

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, estima-se que 3% da população mundial (cerca de 170 milhões de pessoas) esteja infectada pelo HCV, ocorrendo 3 a 4 milhões de novos casos por ano (WHO, 1999). É relevante o número de pessoas que desconhecem o fato de albergar o vírus (STRAUSS, 2001). No Brasil, a prevalência do HCV é estimada em 1,5%, com cerca de 2 milhões de infectados (COELHO *et al.*, 1998). Um estudo populacional realizado na cidade de São Paulo mostrou

uma prevalência de 1 a 4% de anticorpos anti-HCV, variando conforme a faixa etária (FOCACCIA *et al.*, 1998). Entre doadores de sangue do estado do Paraná, CARVALHO & DIAS (1995) encontraram soropositividade de 0,5%.

Na tabela 1 são apresentados alguns dados de literatura de freqüência de positividade para anticorpos anti-HCV em diferentes grupos populacionais no Brasil e em alguns outros países.

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

População	Local	N	Freqüência (%)	Referência
Geral	Brasil		1,5	COELHO <i>et al.</i> , 1998
	Sul da Amazônia	780	2,4	SOUTO <i>et al.</i> , 1999
	Seychelles	1006	0,3	BOVET <i>et al.</i> , 1999
	Estados Unidos	21241	1,8	ALTER <i>et al.</i> , 1999
Doadores sangue	Campinas - SP	13427	2,6	GONÇALES Jr <i>et al.</i> , 1993
	Goiânia - GO	2350	1,4	MARTINS <i>et al.</i> , 1994
	Rio de Janeiro - RJ	4762	2,9	PATIÑO-SARCINELLI <i>et al.</i> , 1994
	Campo Grande - MS	552	2,5	AGUIAR <i>et al.</i> , 2001
	Naníbia	1941	0,9	VARDAS <i>et al.</i> , 1999
Diálise Hemodiálise	Goiânia - GO	173	26,0	NAGHETTINI <i>et al.</i> , 1997
	Rio de Janeiro - RJ	391	64,7	VANDEBORGHT <i>et al.</i> , 1995
	São Paulo - SP	40	42,5	GÓNGORA, 1998
	Goiânia - GO	428	39,0	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2001
IDU*	Rio de Janeiro - RJ	102	69,6	OLIVEIRA M. <i>et al.</i> , 1999a
HIV positivos	São Paulo - SP	1457	17,7	MENDES-CORREA <i>et al.</i> , 2000
Alcoólatras	Uberlândia - MG	365	3,8	OLIVEIRA L. <i>et al.</i> , 1999
	Uberlândia - MG	131	4,2	OLIVEIRA L. <i>et al.</i> , 2001
Gestantes	Goiânia - GO	1273	0,9	MARTINS <i>et al.</i> , 1995
	Londrina - PR	1006	0,8	REICHE <i>et al.</i> , 2000
Presidiários	Manhuaçu - MG	63	6,3	CATALAN-SOARES <i>et al.</i> , 2000

* IDU: usuários de drogas injetáveis

Em muitos casos, devido à ausência de dados, a estimativa da prevalência de uma região é feita a partir de uma população selecionada como os doadores de sangue. Porém, este dado não reflete a prevalência

na população em geral, uma vez que mesmo doadores novos representam um grupo altamente selecionado que sofreu triagem para fatores de risco associados a várias doenças infecciosas (ALTER *et al.*, 1999). Muitos estudos são baseados em resultados repetidamente reagentes no ELISA, sem o uso de um teste confirmatório, o que resulta na superestimação da prevalência da infecção na população estudada (WASLEY & ALTER, 2000). A distribuição dos diferentes genótipos varia de acordo com a região geográfica e parece estar relacionada com o tempo de divergência das variantes, o que se acredita ter ocorrido 500-2.000 anos atrás (SMITH *et al.*, 1997). Na América do Sul, Europa, Estados Unidos e Japão, os genótipos 1, 2 e 3 respondem pela maioria das infecções, sendo o subtipo 1b o mais prevalente (BASSIT *et al.*, 1999).

Na tabela 2 são apresentados alguns dados de literatura sobre a distribuição dos genótipos do HCV em grupos populacionais de diferentes países.

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

Local	n	População	Frequência dos genótipos (%)						Referência
			1	2	3	4	5	6	
Arábia Saudita	140	Hepatite crônica	24,2	1,4	-	69,2	1,4	-	OSOBA <i>et al.</i> , 2000
Áustria	250	Hepatite crônica	74,8	2,8	16,0	5,2	0,4	-	GERVAIS <i>et al.</i> , 2001
Brasil	113	Doadores de sangue	70,0	2,9	25,7	-	-	-	MARTINS <i>et al.</i> , 1998
Brasil	250	Pacientes	72,0	2,0	25,3	0,7	-	-	OLIVEIRA M. <i>et al.</i> , 1999
Brasil	102	IDU*	56,4	7,7	35,9	-	-	-	OLIVEIRA M. <i>et al.</i> , 1999a
Estados Unidos	98	Hepatite crônica	74,0	15,0	6,0	1,0	-	-	MAHANEY <i>et al.</i> , 1994
Estados Unidos	250	Geral	73,7	14,9	7,4	0,9	-	3,2	ALTER <i>et al.</i> , 1999

* IDU : usuários de drogas injetáveis

Há uma considerável variação geográfica e temporal na incidência e

prevalência da infecção pelo HCV. Esta variabilidade pode ser explicada por diferenças na frequência e extensão em que os fatores de risco contribuíram para a transmissão da infecção na comunidade (WASLEY & ALTER, 2000).

Os fatores de risco associados com a transmissão do HCV são a transfusão sanguínea, uso de drogas injetáveis, trabalho em laboratório clínico ou na assistência ao paciente, exposição a parceiro sexual ou a contactante familiar com história de hepatite, exposição a múltiplos parceiros sexuais, e baixo nível sócio-econômico (CDC, 1998).

O HCV é transmitido de forma bastante eficiente por via parenteral e é considerado o principal agente causal da hepatite pós-transfusional (COELHO *et al.*, 1998). Desde 1990, com a introdução dos testes para detecção de anticorpos anti-HCV, o risco de transmissão do HCV por transfusão ou transplante de órgãos praticamente foi eliminado. O risco de hepatite pós-transfusional encontra-se na faixa de 1 em 100.000 unidades transfundidas. Diferente das hepatites A e B, não há uma vacina efetiva para prevenir a hepatite C (NIH, 1997).

Em contraste com o perfil de uma década atrás, o uso de drogas injetáveis responde por 60% dos casos atuais de HCV nos Estados Unidos (CDC, 1998). Nos usuários de drogas injetáveis (IDU), a infecção é adquirida rapidamente, com 50-80% dos novos usuários infectando-se dentro de um período de 6-12 meses (ALTER *et al.*, 1997; NIH, 1997), e mais de 90% apresentam anticorpos anti-HCV após cinco anos de uso de drogas. A infecção pelo HCV é adquirida mais rapidamente após o início do uso de drogas injetáveis do que no caso de outros vírus (HIV e HBV) e as taxas de infecção pelo HCV em jovens usuários de drogas são quatro vezes maiores do que as de infecção pelo HIV (CDC, 1998).

O uso de cocaína intranasal como rota de transmissão do HCV ainda precisa ser mais bem estabelecido. Embora biologicamente plausível que a transmissão possa ocorrer pelo compartilhamento de canudos contaminados com sangue, novos estudos demonstrando a associação do uso da cocaína intranasal e o HCV independentemente do uso de drogas injetáveis devem ser realizados (WASLEY & ALTER, 2000).

Pacientes submetidos à hemodiálise estão sob alto risco de infecção pela hepatite C devido a fatores como transfusão sanguínea, imunossupressão parcial, e freqüentes intervenções parenterais (CARNEIRO *et al.*, 2001). O risco de contaminação pode estar relacionado ao próprio procedimento, por transmissão horizontal, por via percutânea durante a punção das fístulas, acidentes da diálise com derramamento de sangue e contato com material contaminado (NAGHETTINI *et al.*, 1997). A prevalência da infecção varia entre diferentes áreas geográficas, o que pode refletir diferenças não apenas nos índices basais como também nas práticas de controle de infecções adotadas. As menores taxas são encontradas no Reino Unido e África do Sul (1-5%) e as maiores no leste da Europa (20-91%), passando por índices intermediários (10-50%) na América do Norte, Brasil, Escandinávia, sul e oeste da Europa e Ásia (VANDERBORGHT *et al.*, 1995; NAGHETTINI *et al.*, 1997; GÓNGORA, 1998; WASLEY & ALTER, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2001).

Dados obtidos a partir de diversos estudos demonstram que a transmissão perinatal ocorre exclusivamente no caso de mães HCV-RNA positivas no momento do parto. Se a transmissão é ausente quando a mãe não apresenta viremia, por outro lado ela ocorre mais freqüentemente quando a carga viral da mãe é maior que 1 milhão de cópias por mL. O risco é menor que 5%, a menos que a mãe seja co-infectada com HIV. Material compilado de vários estudos mostrou que 18% das crianças nascidas de mães co-infectadas com HIV desenvolveram a infecção pelo HCV enquanto que apenas 4,5% das crianças nascidas de mães infectadas apenas pelo HCV desenvolveram a infecção (DIENSTAG, 1997). Não há evidências de transmissão através da amamentação, bem como também não há evidências de haver diferença no risco de transmissão dependente do tipo de parto (TOVO *et al.*, 1997; CDC, 1998).

A importância da transmissão sexual do HCV ainda é controversa. Observa-se uma baixa prevalência da infecção em parceiros fixos de indivíduos com infecção crônica, o que levanta dúvidas sobre a transmissão sexual do HCV (WASLEY & ALTER, 2000). Esta forma de transmissão é

difícil de ser provada uma vez que outras rotas de infecção podem estar presentes entre os membros do casal, como o uso de utensílios compartilhados que podem causar lesão e transmissão viral (TENGAN *et al.*, 2001). Portanto, mais estudos são necessários para determinar se realmente ocorre transmissão sexual ou existe falha na detecção de uma possível exposição percutânea (WHO, 1999).

Há alguma evidência de transmissão ocupacional ou nosocomial. Porém, como a maioria dos indivíduos infectados com o HCV apresenta sintomas leves ou ausentes, a constatação dos casos de transmissão nosocomial é difícil, e os episódios detectados representam uma pequena proporção dos casos. Portanto, é possível que eles ocorram mais frequentemente do que geralmente detectados. Embora os profissionais da área da saúde estejam sujeitos a exposição ao sangue contaminado, o risco de infecção nesta população não parece ser maior do que o encontrado na população geral de sua região de origem (WASLEY & ALTER, 2000).

Além das formas de transmissão mais frequentes, existe a possibilidade de contaminação através de procedimentos médicos, odontológicos, de acupuntura ou de tatuagem, uma vez que qualquer material cortante ou perfurante pode ser veículo transmissor do vírus de uma pessoa para outra. Objetos como alicate da manicura, lâmina do barbeiro ou mesmo a escova de dente compartilhada por cônjuges ou filhos podem ser potenciais formas de transmissão (STRAUSS, 2001).

Em cerca de 40-45% dos casos, a fonte de infecção permanece indeterminada, o que demonstra a dificuldade na identificação das formas de exposição envolvidas na transmissão do vírus (AL-FALEH & RAMIA, 1997; NIEDERAU *et al.*, 1998 *apud* HAUSHOFER *et al.*, 2001).

3. Aspectos clínicos

O período de incubação varia de 15-150 dias e os sintomas mais comuns são cansaço e icterícia. No entanto, 60-70% dos casos cursam de forma assintomática. A importância clínica da infecção pelo HCV está na

capacidade do vírus persistir no organismo do hospedeiro e causar infecção hepática crônica, o que ocorre em cerca de 80% dos infectados (WHO, 2000). A produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes contra os epítomos virais do HCV gera um estímulo para a formação de uma população de *quasispecies* altamente complexa, capaz de iludir o ataque imune e resultar em persistência viral. A importância dos anticorpos em modular a diversidade viral é ilustrada nos pacientes com agamaglobulinemia, nos quais a ausência de anticorpos está relacionada com uma população viral homogênea. A resposta imune é tão tipo-específica que mesmo pacientes ou animais recuperados da infecção são susceptíveis a reinfecção por outro genótipo (FARCI *et al.*, 1992; ALTER & SEEFF, 2000; TAYLOR *et al.*, 2000).

Nos Estados Unidos, a hepatite C é responsável por 20% de todos os casos de hepatite aguda na atualidade, sendo que dos 35.000 novos casos de hepatite C que ocorrem todos os anos, apenas 25-30% chegam a ser diagnosticados. Também são computadas cerca de 10.000-12.000 mortes anualmente, devendo este número triplicar nas próximas duas décadas (NIH, 2002).

A história natural da infecção varia de acordo com a geografia, uso de álcool, características do vírus como genótipo e carga viral, co-infecção com outros vírus e outros fatores ainda não esclarecidos (SEEFF, 1997). Dentre os pacientes que progridem para hepatite crônica, 10-20% evoluem para a cirrose e 1-5% desenvolvem carcinoma hepatocelular. Trabalhos retrospectivos, utilizando grandes casuísticas de hepatite pós-transfusional, estipularam o tempo médio para o desenvolvimento de hepatite crônica em 10-13 anos, sendo que para a cirrose este tempo é de aproximadamente 21 anos e para o carcinoma hepatocelular pode alcançar 29 anos (KIYOSAWA *et al.*, 1990; TONG *et al.*, 1995).

Admite-se que o processo inflamatório contínuo e ineficiente, em termos de eliminação total do vírus, constitui o principal responsável pela fibrogênese. Entretanto, como não existe uma correlação direta entre processo inflamatório e fibrogênese, outros fatores como, por exemplo, a

idade do indivíduo quando este se infectou, a duração da infecção, o sexo do indivíduo ou ainda a transfusão de sangue como causa da infecção, parecem contribuir na progressão para a fibrose hepática (HAUSHOFER *et al.*, 2001). Ainda assim, o fator mais importante relacionado ao hospedeiro parece ser o seu estado imunológico. Uma resposta imunológica vigorosa pode eliminar o HCV em 15% dos indivíduos que entram em contato com ele, enquanto que nos pacientes crônicos ou nos imunossuprimidos a infecção evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos imunocompetentes (STRAUSS, 2001).

Os mecanismos de lesão na hepatite aguda e crônica não estão completamente esclarecidos, mas por haver pouca evidência de citopatogenicidade do HCV, acredita-se que o dano seja causado pela resposta imune celular do hospedeiro contra a infecção (WHO, 1999). Assim, altas cargas virais no soro e no fígado são compatíveis com mínimas alterações enzimáticas e histológicas. Ainda não está claro se células T citotóxicas são as responsáveis, uma vez que os piores graus de infecção são freqüentemente observados em pacientes co-infectados com HIV. Então, o dano celular é provavelmente uma interação complexa entre o efeito viral direto, a citotoxicidade mediada por células, o efeito de citocinas, eventos apoptóticos e outros eventos intracelulares que ainda não foram elucidados (ALTER & SEEFF, 2000).

A infecção pelo HCV é considerada atualmente como uma das principais causas de internação ou morte entre indivíduos infectados pelo HIV. A co-infecção HCV/HIV acarreta importantes conseqüências no prognóstico e tratamento de ambas as infecções. Indivíduos co-infectados pelo HCV e HIV apresentam níveis mais elevados de alanina aminotransferase (ALT), quadro de fibrose hepática mais grave, e índices mais elevados de cirrose, falência hepática ou carcinoma hepatocelular do que os indivíduos infectados apenas pelo HCV (DIETERICH, 1999). Também há um maior risco de hepatotoxicidade relacionada ao uso da terapia HAART (*highly active antiretroviral therapy*) entre os indivíduos co-infectados pelo HIV e HCV do que entre os infectados apenas pelo HIV

(DEN BRINKER *et al.*, 2000; SULKOWSKI *et al.*, 2000).

A infecção pelo HCV é caracterizada pela replicação viral nos hepatócitos, mas outros órgãos e células também podem estar envolvidos na infecção, como é o caso das células linfóides (TAYLOR *et al.*, 2000). O HCV também já foi encontrado na medula óssea e nas células mononucleares do sangue periférico (SCHIMIDT *et al.*, 1997).

O HCV-RNA pode ser detectado no sangue 1-3 semanas após a exposição. Num período de 15-150 dias, praticamente todos os pacientes apresentam lesão nos hepatócitos, evidenciado pela elevação da ALT. Porém, apenas 25-35% dos pacientes apresentam algum sintoma como mal-estar, fraqueza, anorexia e icterícia. Anticorpos anti-HCV são detectados durante o curso da infecção, sendo que, em 50-70% dos casos podem ser detectados já no início dos sintomas, e em 90% após três meses do início da infecção (NIH, 2002).

A convalescença é caracterizada pelo desaparecimento do HCV-RNA do sangue e normalização das enzimas hepáticas (NIH, 1997). Quando tal fato não ocorre, tem lugar a hepatite crônica que freqüentemente cursa de forma silenciosa e às vezes só é descoberta quando da realização de exames sorológicos e bioquímicos de rotina, como no caso da doação de sangue ou exames periódicos. Os sintomas são tipicamente ausentes ou mínimos, a menos que a infecção seja grave ou a cirrose esteja presente (HOOFNAGLE & DI BISCEGLIE, 1997). As alterações nos níveis de ALT podem variar grandemente e um terço dos pacientes mantém níveis persistentemente normais (HOOFNAGLE, 1997).

GONÇALES Jr. *et al.* (2000) encontraram importantes alterações clínicas, laboratoriais e histopatológicas características de hepatite C crônica na maioria dos doadores de sangue anti-HCV reagente estudados e ainda sugerem que estes indivíduos infectados poderiam estar sendo identificados pela triagem médica e não apenas pelos testes sorológicos.

Dentre as manifestações extra-hepáticas associadas à infecção crônica, encontram-se a crioglobulinemia essencial mista, e a glomerulonefrite com ou sem síndrome nefrótica. São fenômenos mediados

imunologicamente, com a presença de auto-anticorpos ou complexos imunes circulantes. Cerca de 40% dos pacientes HCV soropositivos apresentam crioglobulinas detectáveis. Os crioprecipitados destes pacientes contêm imunoglobulinas anti-HCV, fator reumatóide e HCV-RNA. Manifestações cutâneas (porfiria cutânea tarda ou *líquen planus*), lesões oculares, e linfoma de célula B também podem ser observados (HOOFNAGLE, 1997; WHO, 1999).

4. Diagnóstico laboratorial

Por muito tempo a infecção pelo HCV foi diagnosticada por exclusão baseado na ausência de marcadores de infecção aguda do vírus da hepatite A (HAV) e hepatite B (HBV), sendo atualmente diagnosticada por ensaios sorológicos para anticorpos vírus-específicos (AL-FALEH & RAMIA, 1997). O desenvolvimento de testes diagnósticos para HCV só foi possível após a clonagem do genoma e a produção de um primeiro antígeno (URDEA *et al.*, 1997). A heterogeneidade genética do HCV tem importantes implicações na utilização clínica dos testes diagnósticos (LAU *et al.*, 1995). Diferenças genótipo-dependentes podem ser a maior implicação para o uso dos testes diagnósticos atuais, especialmente em populações com alta prevalência de genótipos filogeneticamente distantes do genótipo 1a, que é a seqüência protótipo utilizada no desenvolvimento destes ensaios (GERMER & ZEIN, 2001).

4.1. Diagnóstico sorológico e bioquímico

O teste imunoenzimático (EIA), sobretudo o ELISA, é utilizado na triagem de anticorpos anti-HCV (URDEA *et al.*, 1997). Este teste tornou-se obrigatório no Brasil a partir de 1993, em candidatos à doação de sangue (MS, 1993). Atualmente, este teste detecta mais de 97% dos pacientes cronicamente infectados, mas o grande intervalo entre a infecção e o aparecimento dos anticorpos resulta em uma menor freqüência na detecção dos casos agudos, em taxas de apenas 50-70% (CD SUMMARY, 2000; WHO, 2000).

O ELISA tem muitas vantagens no campo diagnóstico, incluindo facilidade de automação e de uso, custo acessível, baixa variabilidade e alta sensibilidade na triagem de doadores de sangue e órgãos. As principais desvantagens são a abundância de falso-positivos em populações de baixo risco e baixa sensibilidade verificada em amostras de pacientes após transplante hepático e outras situações de imunossupressão (SCHIFF *et al.*, 1999). A reatividade falsa pode ocorrer devido à ligação não específica das imunoglobulinas do soro ou plasma a contaminantes presentes nas preparações de antígeno do HCV, partes de fusão ou regiões não específicas dos antígenos recombinantes, ou aos reagentes de revestimento ou de bloqueio (GRETCH, 1997).

O diagnóstico sorológico não distingue entre infecção aguda, crônica ou passada (CDC, 1998). Os primeiros *kits* que surgiram no mercado em 1990 foram denominados de 1ª geração e detectavam apenas anticorpos para o antígeno recombinante c100-3. O inconveniente destes testes era a falha em detectar todos os pacientes infectados (VAN DER POEL *et al.*, 1990), grande período de janela antes da soroconversão (que podia chegar a 12 meses) e a alta taxa de falso-positivos (FUSCONI *et al.*, 1990). Posteriormente surgiram os ensaios de 2ª geração que acrescentaram os antígenos c33c (da região NS3) e c22-3 (do nucleocapsídeo ou *core*) (ZEIN & PERSING, 1996). Atualmente os *kits* de 3ª geração detectam anticorpos contra quatro proteínas recombinantes do HCV. Eles diferem dos ensaios de 2ª geração pela substituição da proteína NS5 no lugar do antígeno 5-1-1 (SCHIFF, 1999), e a substituição de alguns antígenos recombinantes por peptídeos sintéticos. Esse desenvolvimento metodológico resultou na diminuição da janela sorológica de 16 semanas no ELISA-1 para 10 semanas no ELISA-2 e 7-8 semanas no ELISA-3, avaliados através do acompanhamento de casos de soroconversão após transfusão sanguínea. Embora tenha havido uma melhora na sensibilidade do ensaio, a questão da especificidade ainda permanece aberta (GRETCH, 1997).

Os ensaios de 1ª geração significaram a prevenção de 40.000 novos casos de infecção pelo HCV por ano através de transfusão sanguínea. Os

testes de 2ª geração levaram à prevenção de outros 10.000-15.000 casos por ano pela melhora na sensibilidade e especificidade. Contudo, ainda podia-se verificar altas taxas de resultados falso-positivos entre populações de baixo risco, exigindo o uso de testes complementares (URDEA *et al.*, 1997). Em populações de baixo risco, um resultado de ELISA negativo é suficiente para descartar a infecção; porém um teste positivo deve ser confirmado por testes suplementares devido ao baixo valor preditivo de cerca de 60-80% em doadores de sangue (NIH, 1997).

Cerca de 4% das bolsas de sangue de doadores são descartadas por resultados positivos na triagem sorológica, sendo que apenas uma em cada 10 unidades é positiva no teste suplementar. Isto representa uma grande perda de doadores pela não especificidade dos testes. A maioria dos indivíduos que apresentam resultados positivos na triagem e testes confirmatórios negativos ou indeterminados e que se mantêm inalterados por longos períodos, são provavelmente não infectados (OWNBY *et al.*, 1997).

As últimas gerações do ELISA contêm múltiplos antígenos do HCV das regiões do *core* e não-estrutural que melhoraram a sensibilidade e a especificidade do teste nas populações de alta prevalência da infecção. Este aumento na sensibilidade é atribuído muito mais a reconfiguração dos antígenos do *core* e NS3 do que à adição do antígeno NS5 (GRETCH, 1997). Ainda assim, nem todos os pacientes com infecção ativa são detectados, uma vez que pacientes em imunossupressão após transplante ou imunocomprometidos pela infecção pelo HIV podem apresentar infecção pelo HCV sem anticorpos detectáveis (HOUGHTON, 1996 *apud* ERENDOY, 2001). No entanto, nas populações de alto risco, a eficácia dos testes de 3ª geração é muito boa, o que levou alguns autores a sugerirem que o teste suplementar pode ser dispensado para a confirmação de resultados positivos nestes casos (PAWLOTSKY *et al.*, 1998 *apud* SCHIFF *et al.*, 1999).

Os testes suplementares para anti-HCV são baseados na técnica de *immunoblot* (IB) e permitem a confirmação da reatividade dos anticorpos

contra as proteínas individuais do HCV, empregando as mesmas proteínas presentes no ELISA. Assim, o ensaio de IB também sofreu aprimoramento tecnológico que resultou em *kits* de 1ª, 2ª ou 3ª geração (SCHIFF *et al.*, 1999).

A interpretação do IB depende do tipo e versão do ensaio e dos critérios do fabricante. Os resultados são reportados como positivo, quando duas ou mais bandas estão presentes, indeterminado, quando há apenas uma banda, e negativo, na ausência de bandas. Um teste positivo confirma a reatividade específica dos anticorpos anti-HCV. Um teste indeterminado ou negativo pode ocorrer no período pré-conversão, em recém-nascidos de mãe positiva, em pacientes transplantados que apresentam resposta de anticorpos insuficiente, ou ainda numa reação cruzada (ERENSOY, 2001). Os genótipos menos freqüentes nos Estados Unidos (2a, 2c, 3a, 4a e 5a) são os que mais freqüentemente determinam resultados indeterminados no IB-2, sugerindo que a detecção sorológica de anticorpos associados a estes genótipos pode ser menos eficiente do que a detecção de anticorpos específicos para o genótipo 1 (GERMER & ZEIN, 2001).

Um teste anti-HCV positivo com confirmação pelo IB não é um marcador verdadeiro de infecção ativa, uma vez que pacientes restabelecidos podem permanecer anti-HCV positivos por longos períodos (SCHIFF *et al.*, 1999; ERENZOY, 2001).

A ALT (alanina aminotransferase) está presente em grandes quantidades na célula hepática e o aumento dos níveis da enzima no soro é observado no dano hepático inflamatório. Os níveis de ALT estão aumentados na hepatite aguda e crônica assim como em condições não-infecciosas como obesidade, diabetes, abuso de álcool, reações a drogas hepatotóxicas e em raros casos de deficiência enzimática (HULTCRANTZ *et al.*, 1986 *apud* GONÇALES Jr. *et al.*, 1998). A ALT é o teste mais barato e não invasivo para avaliar a atividade da infecção. Porém, uma única determinação nem sempre é capaz de refletir a gravidade do quadro (NIH, 1997), uma vez que os níveis das transaminases podem oscilar durante a infecção crônica, e, portanto não exclui a possibilidade de

dano hepático (CDC, 1998). O acompanhamento a longo prazo, com determinações seriadas, é necessário para avaliação do estado clínico e prognóstico (GRETCH *et al.*, 1992).

A relação custo-benefício dos marcadores indiretos diminuiu drasticamente com a introdução dos testes para anti-HCV em bancos de sangue. Por esta razão, vários países recomendaram a descontinuação do uso da triagem para ALT em doadores de sangue (GONÇALES Jr. *et al.*, 1998). A partir do final do ano de 2002, deixou de ser obrigatória a determinação da ALT em bancos de sangue do Brasil (MS, 2002).

4.2. Diagnóstico molecular

A detecção qualitativa direta do HCV-RNA, através da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), é considerado como *gold standard* no diagnóstico da infecção pelo HCV e na avaliação da resposta antiviral (SCHIFF *et al.*, 1999).

O HCV-RNA pode ser detectado, mesmo em quantidades mínimas, uma semana após transfusão de sangue contaminado ou infecção experimental em chimpanzés. O teste do HCV-RNA é indicado em algumas situações: infecção aguda antes da soroconversão, pacientes imunocomprometidos ou imunodeficientes com sorologia negativa, monitoramento de pacientes em terapia, resultados sorológicos indeterminados, e investigação da infecção em recém-nascidos (ERENSOY, 2001).

Alguns indivíduos infectados podem apresentar HCV-RNA positivo apenas intermitentemente, especialmente aqueles com hepatite C aguda ou infecção hepática em estágio final. Para minimizar resultados falso-negativos, o soro deve ser separado dos componentes celulares dentro de 2-4 horas após a coleta e armazenado a -20°C ou -70°C (CDC, 1998). O HCV é instável no soro, principalmente se em contato com células sanguíneas (DAVIS *et al.*, 1994 *apud* NAKAMUTA *et al.*, 2001).

Um dos mais importantes problemas nos ensaios de biologia molecular é a positividade falsa devido à contaminação, especialmente

devido ao carregamento dos produtos de amplificação. Inibidores de PCR nas amostras ou RNases causam resultados falso-negativos. Também o desenho dos *primers* é importante devido à heterogeneidade do genoma do HCV (ERENSOY, 2001). O alto nível de conservação da região 5' NCR em todos os genótipos, faz com que ela seja o alvo de escolha para os ensaios diagnósticos baseados na amplificação por RT-PCR (HALFON *et al.*, 2001).

Amostras anti-HCV positivas podem apresentar resultado negativo na pesquisa do HCV-RNA em alguma das seguintes situações: infecção passada, infecção crônica com flutuações do HCV-RNA, infecção suprimida por terapia, resultado do anti-HCV falso-positivo, resultado do HCV-RNA falso-negativo por presença de inibidores, nível de RNA abaixo do limite de detecção, ou ainda soro de recém-nascido de mãe positiva e não infectado. Por outro lado, as possíveis condições para que amostras anti-HCV negativas apresentem HCV-RNA positivo são: período de janela pré soroconversão na infecção aguda, soronegatividade devido a imunossupressão ou imunodeficiência, resultado falso-negativo no anti-HCV ou falso-positivo no HCV-RNA (ERENSOY, 2001).

As técnicas de PCR são realizadas através do isolamento do RNA da amostra, seguido da transcrição reversa para gerar o cDNA, da amplificação específica da seqüência de ácido nucléico e a detecção do produto amplificado por métodos diversos (URDEA *et al.*, 1997).

A determinação do HCV-RNA por PCR pode ser útil no diagnóstico inicial, mas a repetição do teste para acompanhamento de indivíduos não-tratados nem sempre ajuda, pois uma negatificação pode refletir uma queda transitória abaixo dos níveis de detecção do método e não uma eliminação permanente do vírus. O teste pode ser útil durante a terapia antiviral, porque o desaparecimento do HCV-RNA durante o tratamento é um forte preditor de resposta sustentada (NIH, 1997).

O NAT (*nucleic acid tests*) foi introduzido nos centros de transfusão sanguínea para diminuir o período de janela para 10-30 dias, reduzindo a transmissão viral. O European Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) exige que após 1º de julho de 1999 todos os derivados de plasma,

distribuídos na União Européia, sejam testados negativos para HCV pelo NAT. As amostras de soro ou plasma são testadas em *pool* após ultracentrifugação para concentrar os vírus; esta etapa é crucial e recomenda-se que seja automatizada. É importante o uso de controles internos em cada tubo individual para testar a eficiência do NAT. O NAT requer um quadro de pessoal treinado e experiente em biologia molecular (ERENSOY, 2001).

Uma alternativa que vem sendo sugerida para bancos de sangue que não dispõem de estrutura para a implementação de ensaios de biologia molecular seria a pesquisa do antígeno *core* do HCV por metodologia de ELISA. Trata-se de um ensaio de fácil manipulação e baixo custo, e que pela alta sensibilidade e especificidade poderia ser aplicável na triagem em larga escala de doadores de sangue (NAKAMUTA *et al.*, 2001). A pesquisa do antígeno *core* é positiva em 94% dos doadores PCR positivos no período de janela sorológica, sendo detectável cerca de 33 dias antes do aparecimento dos anticorpos anti-HCV (ICARDI *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2001)

Determinações quantitativas (carga viral) mostram-se interessantes antes do início do tratamento, juntamente com a determinação do genótipo viral, para definição da duração do tratamento, monitorar a resposta terapêutica ou para acompanhamento de casos não tratados. Duas técnicas são utilizadas na quantificação do HCV-RNA em amostras clínicas. A primeira é baseada na técnica de PCR e detecta baixas quantidades de vírus. A segunda técnica é baseada na tecnologia de bDNA (*branched DNA*) que detecta diretamente as moléculas de ácido nucléico pela amplificação do sinal luminoso (URDEA *et al.*, 1997). O ensaio de bDNA de 2ª geração não requer a extração do RNA. A concentração do HCV-RNA é calculada a partir de uma curva de padrões externos criada com quatro transcritos de RNA, que são usados como padrões e incluídos em cada corrida. Os resultados são expressos em HCV-RNA Meq/mL (ERENSOY, 2001).

O nível plasmático de HCV-RNA resulta da produção e eliminação das partículas virais. Por isso, a quantificação no soro pode não fornecer

uma indicação confiável da replicação viral, que ocorre principalmente no fígado (SCHMIDT *et al.*, 1997; GERVAIS *et al.*, 2001). A carga viral não se correlaciona necessariamente com a gravidade da hepatite ou com o prognóstico, mas sim com a probabilidade de resposta à terapia antiviral (NIH, 2002).

4.3. Genotipagem

A maior área de aplicação clínica da genotipagem do HCV tem sido o estudo do significado dos tipos e subtipos no prognóstico e na resposta ao tratamento antiviral da infecção com interferon e ribavirina, assim como na identificação de pacientes com infecção mista. Também tem sido de grande aplicação na pesquisa e desenvolvimento de vacinas (OSOBA *et al.*, 2000).

A genotipagem requer a amplificação do genoma viral por RT-PCR. Uma vez amplificado, diferentes métodos de análise do produto podem ser aplicados como, por exemplo, o uso de um conjunto de enzimas de restrição no RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), a hibridação reversa a *probes* de oligonucleotídeos genótipo-específicos aderidas a tiras de nitrocelulose no LiPA (*line probe assay*) e o uso de *primers* tipo-específicos na nested-PCR. Porém, todos os métodos estão sujeitos aos mesmos problemas como, por exemplo, resultados errôneos por mutações não usuais em sítios críticos e a possibilidade de que algumas amostras não sejam classificáveis. O seqüenciamento de nucleotídeos seguido da análise do genoma viral é o método definitivo na identificação dos vários genótipos (GINABREDA *et al.*, 1997; OSOBA *et al.*, 2000).

O sistema de classificação dos genótipos proposto por Simmonds *et al.* (1994), considerado como *gold standard*, é baseado no seqüenciamento de nucleotídeos da região NS5 (SCHRÖTER *et al.*, 2001). Diferentes regiões do genoma podem ser utilizadas para fins de genotipagem, mas as regiões do *core* e 5' NCR são menos efetivas na distinção entre genótipos, subtipos e isolados (SHUKLA *et al.*, 1995).

A genotipagem baseada na amplificação da região 5' NCR tem a vantagem de ser realizada utilizando os produtos de PCR obtidos nos testes

de triagem para HCV-RNA. Porém, esta região não permite a distinção entre o subtipo 1a e 1b em 5-10% dos casos e também não distingue entre subtipos 2a e 2c. Nestes casos, o seqüenciamento de outra região como NS5A pode ser necessário. (GERMER *et al.*, 1999; ERENZOY, 2001).

O ensaio INNO-LiPA™ (Innogenetics, Bélgica) utiliza *probes* tipo-específicas da região 5' NCR (SCHRÖTER *et al.*, 2001). A segunda versão do INNO-LiPA é capaz de discriminar entre os subtipos 1a, 1b, 2a-2c, 3a-3c, 4a-4h, 5a e 6a (STUYVER *et al.*, 1996 *apud* ERENZOY, 2001).

O ensaio de sorotipagem é um método indireto e simples de tipagem baseada na produção de anticorpos tipo-específicos por parte do hospedeiro. É um ensaio aplicável a pacientes com carga viral abaixo do limite de detecção dos métodos baseados na PCR. Contudo, o método sorológico não é aplicável a pacientes com baixa produção ou mesmo ausência de anticorpos e assim algumas amostras podem não ser tipáveis pelo método (SCHRÖTER *et al.*, 2001). Dois ensaios são disponíveis comercialmente: RIBA HCV *serotyping* SIA (Chiron corp., EUA), que utiliza cinco seqüências peptídicas da região NS4 e duas do *core*, e Murex HCV *serotyping* 1-6 EIA (Murex - Abbott, Reino Unido), que utiliza peptídeos NS4, sem discriminar subtipos (ERENZOY, 2001). Não há *kits* de sorotipagem comercialmente disponíveis capazes de determinar subtipos, porém a discriminação entre subtipos pode não ser necessária no uso rotineiro (SCHRÖTER *et al.*, 2001). A determinação da prevalência de genótipos em grandes populações infectadas pelo HCV, utilizando métodos baseados na PCR, é caro e demorado, então, a sorotipagem poderia ser um método rápido e de custo competitivo na determinação de genótipos em estudos de coorte (BELD *et al.*, 1998).

No RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), *primers* universais são usados para amplificar um fragmento de PCR de uma região do genoma. Os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição no fragmento de DNA geralmente mostram uma distribuição tipo- ou subtipo-específica. Então, fragmentos de restrição de tamanhos variados

são criados após o corte com uma ou mais endonucleases de restrição. O padrão de separação eletroforética destes fragmentos permite a identificação do genótipo (SCHIFF *et al.*, 1999). O RFLP realizado na região 5' NCR apresenta problemas na distinção dos subtipos 1a e 1b (DAVIDSON *et al.*, 1995).

O seqüenciamento de nucleotídeos é o método de referência para a identificação dos diferentes genótipos do HCV. Contudo, por ser um método de elevado custo, de execução demorada, e que requer equipamentos especiais, seu emprego está restrito à pesquisa e é ainda considerado pouco prático em grandes estudos clínicos. A região 5' NCR tem baixo poder de discriminação entre determinados subtipos (ex. 2a e 2c) devido ao alto nível de conservação desta região. Diferenças de apenas um ou dois nucleotídeos distinguem subtipos entre si, como por exemplo, a troca de bases na posição -99 (A para G) que caracteriza os genótipos 1a e 1b (HALFON *et al.*, 2001). O seqüenciamento apresenta como vantagem sobre outros métodos a possibilidade de detectar subtipos raros (SCHRÖTER *et al.*, 2001).

A determinação do genótipo do HCV com métodos confiáveis tornou-se uma questão importante nos laboratórios clínicos. O padrão de referência é o seqüenciamento de uma porção específica do genoma do HCV amplificada por PCR seguida de análise filogenética. Para a identificação de um novo genótipo ou subtipo é necessário o seqüenciamento do genoma completo ou pelo menos de duas regiões codificantes diferentes. Para a genotipagem de isolados clínicos, as regiões mais freqüentemente utilizadas são NS5, *core*, E1 ou 5' NCR. O seqüenciamento destas regiões é representativo de todo o genoma para seus genótipos (ERENSOY, 2001).

A análise por SSCP (*single-strand conformation polymorfism*) permite a detecção de seqüências minoritárias (5-10%) na população viral, identificando subpopulações do genoma do HCV dentro de cada isolado como bandas específicas. A técnica é altamente reprodutível quando diferentes produtos de extração do mesmo soro são usados, e é uma

ferramenta confiável na avaliação da complexidade genética de variantes maiores do HVR-1 (THELU *et al.*, 2001). Tanto o seqüenciamento dos produtos de PCR clonados, quanto o seqüenciamento direto de todas as fitas de RNA ou o SSCP são usados para detectar e quantificar *quasispecies*. Uma seqüência de 40 aminoácidos dentro da proteína NS5A (aa 237-276) foi sugerida ser a região determinante de sensibilidade ao IFN (ISDR-*interferon sensitivity determining region*) (ERENSOY, 2001).

5. Tratamento

A determinação do genótipo, associada à análise histológica da biópsia hepática e à determinação da carga viral, é utilizada para o aconselhamento do paciente quanto risco-benefício do tratamento (McHUTCHISON *et al.*, 1998; POYNARD *et al.*, 1998; HALFON *et al.*, 2001). A realização da genotipagem antes do tratamento é importante pelas implicações no diagnóstico, acompanhamento e resposta à terapia (OSOBA *et al.*, 2000). A duração do tratamento depende do genótipo apresentado pelo paciente. A portaria nº 639 do Ministério da Saúde (MS, 2000) determina que a duração do tratamento seja de seis meses para os genótipos 2 e 3, relativamente sensíveis ao tratamento, e de 12 meses para os genótipos 1, 4, 5 e 6, mais resistentes ao tratamento com IFN. Uma vez que o genótipo foi identificado, não há necessidade de repetir o teste, uma vez que o genótipo não se altera durante o curso da infecção (<http://www.hepcnet.net/>).

O tratamento da hepatite C objetiva deter a progressão da infecção hepática pela inibição da replicação viral. A redução da atividade inflamatória costuma impedir a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular, havendo também melhora na qualidade de vida dos pacientes. A precocidade do diagnóstico leva ao tratamento de pacientes freqüentemente assintomáticos, impedindo que quase a metade deles evolua para fases sintomáticas da infecção, de mais difícil controle. Os medicamentos disponíveis até o momento, entretanto, nos mais diversos

esquemas em termos de doses, duração ou associações conseguem atingir os objetivos propostos em menos da metade dos pacientes tratados (STRAUSS, 2001). As melhores respostas são alcançadas com o uso do IFN ligado à molécula de polietilenoglicol (PEG-IFN), que permite a administração de uma única dose semanal, alcançando níveis plasmáticos mais elevados devido à sua meia-vida mais prolongada no organismo do que o IFN normal (DIETERICH & SULKOWSKI, 2001).

O protocolo do consenso do NIH recomenda tratamento preferencialmente para indivíduos com infecção crônica em risco de progressão para cirrose: níveis de ALT persistentemente elevados, HCV-RNA detectável e biópsia hepática indicando fibrose ou pelo menos grau moderado de inflamação e necrose (NIH, 2002). A presença de marcadores do HCV, tanto o anticorpo anti-HCV como o HCV-RNA, mesmo que por tempo superior a seis meses, porém, sem concomitante aumento de transaminases ou história sugestiva de hepatite aguda, não caracteriza hepatite crônica. Não se indica biópsia ou tratamento aos pacientes com níveis persistentemente normais de ALT (STRAUSS, 2001).

Os problemas relacionados com a terapia pelo IFN incluem o custo elevado da droga, os efeitos colaterais e a longa duração do tratamento (KAKUMU *et al.*, 2002). Os interferons são proteínas com efeitos tanto imunomodulatórios como antivirais. Eles são parte da primeira linha de defesa do hospedeiro contra vírus, bactérias, e componentes estranhos. Nas células infectadas com vírus, os interferons induzem a produção de proteínas antivirais, inibindo a síntese do DNA ou RNA viral (GRAHOVAC *et al.*, 2001). Os efeitos antivirais dos interferons são exercidos por diversas vias, incluindo aumento da expressão das proteínas do complexo de histocompatibilidade principal para facilitar o reconhecimento dos antígenos virais pelo sistema imune, ativação de células (*natural killer* e macrófagos) com habilidade de destruir alvos infectados e inibição direta da replicação viral (TAYLOR *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que o alfa-IFN diminui a carga viral, melhora a função hepática pela diminuição dos níveis de ALT e pode diminuir o risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma (YOSHIDA *et*

al., 1999 *apud* TAYLOR *et al.*, 2000). Porém, o tratamento com IFN tem baixos índices de eficácia, melhorando quando combinado a ribavirina. O tratamento com alfa-IFN resulta em taxas de resposta sustentada de 50-70% na hepatite viral aguda, caindo para 30% em pacientes com hepatite crônica moderada ou leve e para cerca de 10% em indivíduos com cirrose (WHO, 2000). A ribavirina, um agente antiviral oral, quando usado isoladamente reduz os níveis de ALT em cerca de 50% dos pacientes, sem alterar os níveis de HCV-RNA (NIH, 1997).

A eficácia do tratamento com alfa-IFN é definida bioquimicamente como a normalização dos níveis de ALT sérico e virologicamente como o desaparecimento do HCV-RNA no soro. Estes parâmetros são testados ao final do tratamento e seis meses após o término do mesmo (NIH, 1997). A resposta sustentada é definida como a normalização dos níveis de ALT persistentemente durante um ano após tratamento e níveis de HCV-RNA indetectáveis durante todo o acompanhamento do tratamento. Por outro lado, verifica-se a falha no tratamento quando ocorre aumento da ALT e/ou níveis de HCV-RNA detectáveis após o final da terapia (GERVAIS *et al.*, 2001).

Utilizando regressão logística, POYNARD *et al.* (1998) identificaram cinco fatores independentes associados de forma significativa com a resposta à terapia com IFN: genótipos 2 e 3, carga viral menor que 2 milhões de cópias/mL, idade menor que 40 anos, fibrose hepática em estágio mínimo e sexo feminino. O genótipo 1 está associado com pior prognóstico, sendo que pacientes cirróticos infectados com o subtipo 1b tem maior risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (BRUNO *et al.*, 1997 *apud* HAUSHOFER *et al.*, 2001).

Os efeitos adversos do IFN incluem fadiga, confusão, incapacidade de concentração e irritabilidade. O IFN pode exacerbar os sintomas de depressão, o que contra-indica o tratamento nestes casos. Sintomas semelhantes à gripe ocorrem no início do tratamento com IFN e diminuem com o prosseguimento do mesmo. Outros efeitos colaterais incluem alopecia, *rash*, hipo- ou hipertireoidismo e supressão da medula óssea.

Efeitos mais graves são observados em menos de 2% dos pacientes e incluem doenças auto-imunes (principalmente da tireóide), depressão com risco de suicídio, insuficiência renal, retinopatia, fibrose pulmonar intersticial e sepsis (NIH, 1997; CDC, 1998).

O principal efeito colateral da ribavirina é a anemia hemolítica dose-dependente. Mas o efeito mais grave é o teratogênico, pois a ribavirina é transportada para o interior de todas as células do corpo, inclusive óvulos e espermatozóides, e os efeitos da droga só cessam seis meses após a sua descontinuidade. Pacientes, tanto do sexo masculino como feminino, em idade fértil devem usar métodos anticoncepcionais seguros durante todo o tratamento e nos seis meses seguintes ao término do mesmo (STRAUSS, 2001).

O monitoramento clínico inclui determinações seriadas das enzimas hepáticas (2-4 vezes ao ano), determinações de carga viral (1-2 vezes ao ano) e realização de biópsias a intervalos de um a cinco anos (NIH, 1997). Os efeitos da terapia podem ser monitorados pela determinação dos níveis de ALT, e, caso os valores não estejam normais após três meses de tratamento, uma resposta favorável será pouco provável e a terapia deve ser interrompida. O monitoramento dos níveis de HCV-RNA pode ser um meio mais acurado de acessar a resposta à terapia; se o RNA viral ainda for detectável após dois ou três meses de terapia, uma resposta de longo período é improvável e o tratamento deve ser encerrado (HOOFNAGLE & DI BISCEGLIE, 1997). Ainda é controverso se o desaparecimento do HCV-RNA no período inicial do tratamento serve como fator preditivo dos efeitos a longo prazo. Contudo, o HCV-RNA geralmente torna-se negativo mais cedo nos pacientes com baixos títulos, indicando que o desaparecimento do vírus depende dos níveis iniciais (KAKUMU *et al.*, 2002).

6. Justificativa e relevância

O Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do

Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (HURNP), em Londrina, PR, realiza testes sorológicos de pacientes atendidos pelos diversos ambulatórios e enfermarias do hospital, bem dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina.

Em situações como a de um doador de sangue sem qualquer manifestação clínica sugestiva de hepatite viral, a sorologia reagente para anti-HCV torna-se um problema de difícil elucidação, uma vez que se pode estar diante de um resultado falso-positivo ou de uma infecção assintomática. Um resultado falso-positivo em um indivíduo saudável gera transtornos não só para o Sistema Único de Saúde devido ao descarte de bolsas de sangue de indivíduos não infectados, exclusão de possíveis doadores habituais, diminuição dos estoques de sangue nos Bancos e elevação desnecessária dos custos de processamento e transfusão do sangue, mas também causa transtornos para o doador/paciente, pela angústia diante de um resultado inesperado, com conseqüências emocionais, psicológicas, sociais e financeiras. O esclarecimento, com a confirmação ou não do diagnóstico, faz-se necessário para melhor conduta médica e orientação adequada ao paciente. Por outro lado, em indivíduos sabidamente infectados pelo HCV, os testes laboratoriais, a quantificação do HCV-RNA, e a genotipagem do vírus HCV, são imprescindíveis no acompanhamento e tratamento da infecção. Digno de nota é a importância cada vez maior da infecção pelo HCV em indivíduos infectados pelo HIV, uma vez que os índices de co-infecção são elevados e os efeitos dessa associação resultam em significativas implicações no tratamento de ambas as infecções.

Dentro deste panorama, poucos dados acerca da infecção pelo HCV são disponíveis na região de Londrina. O presente estudo visa avaliar os fatores epidemiológicos relacionados à infecção nos indivíduos envolvidos na pesquisa, bem como avaliar a freqüência em que os diferentes genótipos ocorrem nesta população. Espera-se que ao final deste estudo tenha-se alcançado subsídios que permitam a melhoria na qualidade do diagnóstico laboratorial realizado na Instituição, bem como a implantação de técnicas

moleculares que permitam melhor esclarecimento de casos e monitoramento de pacientes em tratamento.

II. OBJETIVOS

1. GERAL

Avaliar aspectos soroepidemiológicos e laboratoriais na infecção pelo HCV em indivíduos com sorologia reagente para anticorpos anti-HCV da cidade de Londrina e região norte do Estado do Paraná.

2. ESPECÍFICOS

- Determinar a soroprevalência de anticorpos anti-HCV na população de doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina.
- Determinar a soroprevalência de anticorpos anti-HCV entre os indivíduos infectados pelo HIV residentes na região de Londrina.
- Caracterizar os indivíduos com sorologia positiva quanto à faixa etária, sexo e fatores de risco predisponentes.
- Correlacionar os resultados obtidos na triagem sorológica por métodos imunoenzimáticos com o método suplementar da presença de anticorpos específicos por *immunoblot* e pelo método de detecção da viremia (PCR).
- Verificar a frequência dos genótipos do HCV na população de doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e entre os indivíduos infectados pelo HIV residentes na região de Londrina.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

1.1. Pacientes

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, tendo obtido parecer favorável dos Comitês de Ética em Pesquisa aos quais foi submetido: da Universidade Estadual de Londrina, com parecer favorável emitido em 09/01/2002, da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, emitido em 26/04/2002 e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, emitido em 03/09/2002.

A amostragem foi constituída de indivíduos submetidos à triagem sorológica para anticorpos anti-HCV, realizada pelo Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP, Londrina – PR. A amostra foi obtida de doadores de sangue e pacientes provenientes do Hemocentro Regional de Londrina, do ambulatório de hepatites do HURNP e do Centro de Referência Dr. Bruno Piancastelli da Secretaria da 17ª. Regional de Saúde de Londrina.

Dois grupos populacionais específicos, o primeiro constituído por doadores de sangue e o segundo por indivíduos infectados pelo HIV, foram utilizados para a verificação da soroprevalência de anticorpos anti-HCV em indivíduos sob baixo ou alto risco de infecção pelo HCV. Assim, a frequência de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue da nossa região foi avaliada em 4.044 indivíduos que doaram sangue pela primeira vez no Hemocentro Regional de Londrina no período de março a agosto de 2002. Entre os pacientes soropositivos para HIV, a frequência de anticorpos anti-HCV foi avaliada a partir de 628 amostras de sangue, colhidas no período de dezembro de 2001 a setembro de 2002, gentilmente cedidas pelas Professoras Helena Kaminami Morimoto e Edna Maria Vissoci Reiche do Laboratório de Imunologia Clínica do HURNPR.

Parâmetros sorológicos, moleculares e epidemiológicos foram

estudados nos pacientes que apresentaram sorologia reagente para anticorpos anti-HCV. Foram incluídos 50 doadores de sangue que apresentaram sorologia reagente para anti-HCV no ato da doação, 127 pacientes soropositivos para HCV e para HIV, e outros oito pacientes que apresentavam hepatite C crônica em acompanhamento no ambulatório do HURNP. Entre os doadores de sangue, apenas 31 retornaram para novos exames e avaliação clínica. Por isso, as amostras de sangue dos outros 19 doadores que não atenderam à re-convocação foram utilizadas apenas para avaliação dos testes de triagem sorológica, uma vez que a amostra disponível havia ficado vários dias a 4-8°C, antes de ser congelada, não sendo recomendado seu uso para a realização da PCR, já que resultados negativos nesses casos não seriam confiáveis. A figura 1 traz uma representação esquemática da casuística e métodos empregados no trabalho.

1.1.1. Caracterização das amostras anti-HCV reagente quanto aos aspectos de sexo e idade

No conjunto de pacientes com sorologia reagente para 122 (65,9%) eram do sexo masculino e 63 (34,1%) eram do sexo feminino. Houve diferença na distribuição por sexo entre os grupos estudados ($\chi^2 = 6,93$ com 2 graus de liberdade; $p=0,031$), verificando-se maior frequência de indivíduos do sexo masculino em pacientes infectados pelo HIV. Com relação à idade dos pacientes, esta variou de 17 a 60 anos, sendo a média de $35,2 \pm 8,4$ anos. A idade dos doadores de sangue foi menor do que dos demais grupos avaliados, conforme análise pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$) com complementação pelo teste de Dunn. Na tabela 3 é apresentada a caracterização de sexo e idade dos diferentes grupos estudados e no anexo 3 encontra-se a caracterização das amostras submetidas a genotipagem do vírus HCV.

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

	Masculino	Feminino	Total	
	N (%) ¹	N (%) ¹	Faixa etária (anos)	Média ± DP
Doadores de sangue	28 (56,0)	22 (44,0)	18 a 58	32,0 ± 9,8 [#]
Pacientes crônicos	3 (37,5)	5 (62,5)	22 a 60	41,8 ± 10,6
HIV (+)	91 (71,6)*	36 (28,4)*	17 a 56	36,0 ± 7,2

¹número de indivíduos (porcentagem no grupo)

DP = desvio padrão

* $\chi^2 = 6,93$; 2GL; p = 0,031

Kruskal-Wallis / Dunn: p<0,05

1.2. Amostras de sangue

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubo seco (10 mL) com gel separador, em sistema a vácuo do tipo *Vacutainer*. As alíquotas de soro foram armazenadas a -20 °C em tubo cônico do tipo *Eppendorf*.

2. INSTRUMENTOS DE MEDIDA

2.1. Reações sorológicas para pesquisa de anticorpos anti-HCV

2.1.1. Testes imunoenzimáticos

As amostras de soro foram analisadas no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HURNP. Foram empregados dois *kits* comercialmente disponíveis, sendo que a metodologia automatizada MEIA (enzimaimunoensaio de micropartículas) foi aplicada a todas as amostras e um segundo ELISA por metodologia manual foi utilizado para comparação dos resultados reagentes obtidos pelo primeiro método.

	4044 doadores de		628 pacientes HIV +			
	32 HCV +				127 HCV +	
	19 não retornaram para exames	13 retornaram para novos	18 ex-doadore s	8 pacientes hepatite C		
Método						TOTAL amostras analisadas
MEIA	19	13	18	8	127	185
ELISA	17	13	18	8	127	183
PCR	0	13	18	8	127	166
IB	4	3	3	0	5	15
Genotipagem	0	2	5	8	46	61
Pacientes entrevistados para avaliação de fatores de risco (assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido)						

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

2.1.1.1. Metodologia automatizada MEIA

As amostras foram analisadas pela metodologia MEIA empregando *kit* comercialmente disponível AXSYM HCV *version* 3.0, contendo os antígenos recombinantes HCr43, c200, c100-3 e NS5 (AXSYM®, ABBOTT Laboratórios, EUA) segundo protocolo estabelecido pelo fabricante.

MEIA é uma derivação do princípio do ELISA, desenvolvido em sistema de processamento automático. As micropartículas revestidas com antígenos recombinantes são adicionadas à amostra previamente diluída e o sistema é incubado para a formação do complexo antígeno-anticorpo. Uma parte da mistura é transferida para uma matriz de fibra de vidro, na qual a micropartícula adere de forma irreversível. Após lavagem para retirada de materiais não aderidos, ocorre a adição do conjugado anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina que se liga ao complexo. Após nova lavagem, ocorre a adição do substrato 4-metil-umbeliferil fosfato, que, por ação enzimática, perde o grupamento fosfato, resultando no produto fluorescente 4-metil-umbeliferona que é medido fotometricamente. O resultado é expresso por comparação da taxa de formação do produto fluorescente pela taxa do *cut off* calculado previamente por um Calibrador *Index* corrido em duplicata.

Interpretação dos resultados: os resultados são automaticamente expressos pelo aparelho como relação DO/CO, onde a densidade óptica (DO) da amostra é avaliada em relação ao *cut off* (CO) previamente calculado. Considera-se não reagente toda amostra com relação DO/CO inferior a 1,00 e reagente toda amostra com relação DO/CO superior a 1,00. Para efeito de análise, foi considerada como fracamente reagente a amostra com relação DO/CO entre 1,00 e 5,00 e reagente a amostra com relação DO/CO igual ou superior a 5,00 (GOUBAU *et al.*, 1997).

2.1.1.2. Metodologia de ELISA em microplaca

As amostras repetidamente reagentes pelo MEIA foram submetidas a um segundo teste imunoenzimático para avaliação quanto a possíveis resultados falso-positivos no primeiro método. Para tanto, empregou-se *kit* comercialmente disponível Murex anti-HCV (versão 4.0) contendo antígenos das regiões do *core*, NS3, NS4 e NS5 do vírus (ABBOTT - Murex Biotech, África do Sul) segundo protocolo estabelecido pelo fabricante.

A amostra diluída é incubada em microcavidades revestidas com antígenos altamente purificados do HCV. Durante a primeira incubação ocorre a ligação dos anticorpos anti-HCV presentes na amostra aos antígenos imobilizados na placa. Após lavagens para remoção do material não ligado, ocorre nova incubação com conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase. Segue-se nova série de lavagens e adição de solução contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio, que sofre alteração de coloração em decorrência da reação enzimática. A reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico, seguindo-se de leitura fotométrica.

Interpretação dos resultados: as amostras que apresentaram leitura de densidade óptica (DO) superior ao valor de corte (*cut off* - CO) estabelecido pelo fabricante foram consideradas reagentes, e as que apresentaram resultados inferiores a este valor foram consideradas não-reagentes. Para efeito de análise, as amostras com relação DO/CO entre 1,0 e 3,0 foram consideradas como fracamente reagentes e as amostras com relação DO/CO igual ou superior a 3,0 foram consideradas fortemente reagentes (GRETCH *et al.*, 1992; GONÇALES *et al.*, 2000).

2.1.2. Immunoblot (IB)

Algumas amostras de soro foram submetidas à metodologia *immunoblot*, que detecta a reatividade específica dos anticorpos anti-HCV da classe IgG contra antígenos recombinantes representativos das regiões estrutural (*core*) e não-estrutural (NS3, NS4, NS5) do genoma viral. As amostras foram analisadas no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP. O ensaio foi executado segundo o

protocolo estabelecido pelo fabricante (Wellcozyme HCV Western Blot, Murex Diagnostics, Singapura). Resumidamente, os anticorpos presentes no soro do paciente reconhecem especificamente os antígenos fixados à membrana de nitrocelulose. Após lavagem para remoção de anticorpos não ligados, ocorre a adição do conjugado anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina. Segue-se um novo ciclo de lavagens e a adição do substrato precipitável, bromo-cloro-indol-fosfato (BCIP) e *nitro blue tetrazolium* (NBT), resultando no aparecimento de bandas de cor púrpura onde houve o reconhecimento pelos anticorpos.

Interpretação dos resultados: a amostra foi considerada positiva quando apresentou reatividade específica em 2 ou mais bandas, com pelo menos uma banda apresentando reatividade equivalente ou superior ao controle positivo fraco. A amostra foi considerada negativa em caso de ausência de bandas, e foi considerada indeterminada quando apresentou apenas uma banda específica do HCV. Estes critérios encontram-se estabelecidos pelo fabricante do *kit*.

O ensaio foi aplicado apenas a amostras suspeitas de resultado falso-positivo no teste imunoenzimático.

2.2. Detecção do HCV-RNA

A presença do HCV-RNA (viremia) no soro dos pacientes com sorologia positiva foi avaliada pela amplificação da porção 5' NCR do genoma viral, utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) do HCV-RNA extraído. A técnica foi realizada utilizando duas etapas de amplificação (*nested-PCR*), o que garante maior sensibilidade ao método. Esta etapa foi realizada no setor de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, com a colaboração da Dra. Ester Cerdeira Sabino.

Para evitar resultados falso-positivos decorrentes de contaminação pelo produto amplificado ou resultados falso-negativos por perda de material durante o processamento da amostra, por interferentes ou

presença de inibidores, foram empregados os seguintes cuidados: processamento das amostras em três laboratórios separados, cada um contendo equipamentos e materiais próprios, sendo o primeiro destinado à preparação de reagentes (sala de pré-amplificação 1), o segundo destinado à manipulação de amostras para extração e precipitação do RNA (sala de pré amplificação 2) e o terceiro somente para amplificação e manipulação do produto amplificado (sala de pós amplificação). Em cada laboratório utilizou-se um jogo de pipetas automáticas, ponteiros com filtro livres de DNases e RNases, aventais e luvas descartáveis, tubos estéreis, água altamente purificada (Milli-Q, Millipore), evitando-se assim os riscos de contaminação entre os laboratórios.

2.2.1. Extração do HCV-RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)

O RNA do HCV foi obtido a partir de 100 μL de soro, utilizando-se 300 μL do reagente para isolamento de RNA a partir de amostras líquidas Trizol[®] (GIBCO-BRL, EUA). Após incubação de cinco minutos a temperatura ambiente, adicionou-se 80 μL de clorofórmio (Merck, Brasil) para promover a separação da fase orgânica da aquosa, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação a 20.800 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 40 μL de Dextran T500 (Pharmacia Biotec, EUA), na concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, utilizado como carreador de ácidos nucléicos. O RNA foi, então, precipitado utilizando-se 200 μL de isopropanol (Sigma Chemical Company, EUA) numa incubação de 10 minutos, seguido de centrifugação a 20.800 x g por 10 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 400 μL de etanol a 70% (Merck, Brasil), seguido de nova centrifugação a 20.800 x g por cinco minutos, aspiração completa do sobrenadante e secagem do precipitado de RNA.

O precipitado de RNA foi dissolvido em uma solução composta de água purificada (Milli-Q, Millipore) tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e oligonucleotídeos de seqüência randômica (150ng/ μL *random primer*, Pharmacia Biotech, Suécia), num volume final de 12,0 μL . Após

desnaturação do material a 70°C por 10 minutos, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA, durante 90 minutos a 42°C, utilizando-se 8,0 µL da solução de síntese de cDNA contendo a enzima transcriptase reversa, cuja composição é a seguinte:

- 4,0 µL de tampão 5X concentrado para a enzima transcriptase reversa (Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM; GIBCOBRL, EUA)
- 2,0 µL de dithiothreitol (DTT) 0,1 M (GIBCOBRL, EUA)
- 1,0 µL de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs) 10 mM (GIBCOBRL, EUA)
- 0,5 µL de inibidor de ribonuclease clonado (10 U/µL; GIBCOBRL, EUA)
- 0,5 µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse transcriptase armazenada em tampão Tris-HCl 20 mM (pH7,5), NaCl 100mM, EDTA 0,1 mM, dithiothreitol (DTT) 1,0 mM, NP-40 0,01% (v/v), glicerol 50% (v/v); GIBCOBRL, EUA)

Após a síntese do cDNA, a enzima transcriptase reversa foi desnaturada por aquecimento a 70°C por 10 minutos, e o cDNA foi submetido à reação de PCR.

2.2.2. Reação de amplificação por PCR

Para a detecção do vírus amplificou-se a região 5' NCR do genoma, utilizando os iniciadores NCR1 e NCR2 na primeira amplificação seguida de uma segunda reação (*nested*) com os iniciadores NCR3 e NCR4 (INNO LiPA™ HCV II Amplification - Innogenetics, Bélgica). Na tabela 4 encontra-se a descrição da seqüência dos *primers* utilizados.

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

Primers	Seqüência de nucleotídeos
NCR1 (<i>outer</i>) ¹	5'- GTA TCT CGA GGC GAC ACT CCA CCA TAG -3'
NCR2 (<i>outer</i>) ¹	5'- ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC -3'
NCR3 (<i>inner</i>) ²	5'- CCA CCA TAG ATC TCT CCC CTG T -3'
NCR4 (<i>inner</i>) ²	5'- CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT -3'

¹*Outer*

: Primers utilizados na primeira reação de amplificação, gerando um fragmento base para a *nested*-PCR.

²*Inner*:

Primers utilizados na segunda reação de amplificação (*nested*), gerando um fragmento interno menor.

Para a primeira amplificação, o cDNA foi amplificado em termociclador *Eppendorf* utilizando um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 94°C (desnaturação) por 30 segundos, 55°C (hibridação) por 30 segundos e 72°C (polimerização) por 30 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Utilizou-se um volume de 5,0 µL de cDNA adicionado à solução de amplificação que tinha a seguinte composição:

- 4,5 µL de tampão da enzima Taq-DNA polimerase 10X concentrado (Tris-HCl 200mM (pH 8,4), KCl 500mM; GIBCOBRL, EUA)
- 1,0 µL dos primers externos NCR1 e NCR2 (Innogenetics, Bélgica)
- 0,75 µL de desoxirribonucleosídeos trifosfatados 10mM - dNTPs (GIBCOBRL, EUA)
- 2,0 µL de MgCl₂ 50 mM (GIBCOBRL, EUA)
- 0,2 µL da enzima Taq-DNA-polimerase - 5U/µL (Tris HCl 20mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM em glicerol 50%; GIBCOBRL, EUA)

- 35,55 µL de água Milli-Q tratada com DEPC (Sigma)

Após a amplificação, o produto da PCR foi submetido a uma segunda fase de amplificação (*nested*-PCR) em termociclador automático, segundo o mesmo protocolo de amplificação utilizado na primeira fase. Empregou-se um volume de 3,0 µL do produto da primeira PCR adicionado à seguinte solução:

- 5,0 µL de tampão da enzima Taq-DNA polimerase 10X concentrado (Tris-HCl 200mM (pH 8,4), KCl 500mM; GIBCOBRL, EUA)
- 1,0 µL dos primers internos NCR3 e NCR4 (Innogenetics, Bélgica)
- 1,0 µL de desoxirribonucleosídeos trifosfatados 10mM - dNTPs (GIBCOBRL, EUA)
- 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (GIBCOBRL, EUA)
- 0,2 µL da enzima Taq-DNA-polimerase - 5U/µL (Tris HCl 20mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM em glicerol 50%; GIBCOBRL, EUA)
- 39,3 µL de água Milli-Q tratada com DEPC (Sigma)

2.2.3. Detecção do produto de PCR

Para a detecção do fragmento amplificado, 5,0 µL do produto da PCR e 2,0 µL do tampão de corrida (azul de bromofenol; Sigma) foram aplicados em gel de agarose ultrapura (GIBCOBRL, EUA), na concentração de 1,5% em tampão TBE 0,5X concentrado (ácido bórico 5,5%, EDTA 0,9%, Tris-Cl 10,8%; GIBCOBRL, EUA), previamente corado com brometo de etídio (GIBCOBRL, EUA). Em cada corrida, foi adicionado um padrão de peso molecular (DNA Mass Ladder 100 bp; GIBCOBRL, EUA). A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem de 80 V, em tampão TBE 0,5X. A visualização do produto amplificado foi feita em trans-iluminador de radiação ultravioleta (Stratagene Eagle Eye II). A positividade para o HCV-RNA foi evidenciada pela presença de uma banda com localização de aproximadamente 250 bp, em relação ao peso molecular.

2.3. Genotipagem

As amostras que apresentaram partículas virais detectáveis por PCR foram submetidas a genotipagem do HCV (região 5' NCR). Esta etapa foi realizada no setor de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo.

2.3.1. Purificação do produto amplificado

O produto da amplificação de PCR da região 5' NCR, de aproximadamente 250 bp foi purificado com o *kit* de purificação para produtos de PCR QIAquick (QUIAGEN, Alemanha), conforme protocolo do fabricante. O sistema utiliza propriedades de ligação seletiva a uma membrana de sílica-gel adaptada em uma coluna. Tampões especiais fornecidos pelo *kit* permitem a recuperação do DNA e a remoção dos contaminantes presentes (resíduos de *primers*, nucleotídeos, polimerases ou sais). Na presença de alta concentração salina dos tampões, o DNA permanece adsorvido à membrana, enquanto os contaminantes atravessam a coluna e são eliminados por lavagem. Então, o DNA purificado sofre eluição em tampão Tris, fornecido pelo *kit*.

2.3.2. Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento, empregou-se a seguinte composição de reagentes, num volume final de 10,0 µL de reação:

- 4,0 µL do *mix* do *kit* ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems)
- 2,0 pmol dos *primers* NCR3 ou NCR4
- 1,0 µL ou 2,0 µL do produto purificado da segunda amplificação, equivalente a 15-45 ng de DNA, quantificado pelo *Low DNA mass Ladder* (GIBCO) conforme protocolo do fabricante

A reação foi amplificada em termociclador automático Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus, EUA), utilizando 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado com uma mistura de 2,0 µL de acetato de sódio 3M (pH 4,6), 10 µL de água Milli-Q e 50 µL de etanol 95%. Após agitação e precipitação por 15 minutos a temperatura ambiente, a placa foi centrifugada por 20 minutos em velocidade máxima. A seguir, o sobrenadante foi aspirado e o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol a 70%.

Depois de seco, adicionou-se ao *pellet* 6 µL de uma mistura de formamida mais *loading* (5+1). As amostras foram desnaturadas a 95°C por dois minutos e logo a seguir resfriadas em banho de gelo, e 2 µL do produto foi aplicado em sequenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer Biosystems,).

2.3.3. Determinação dos genótipos

Na determinação dos genótipos das amostras analisadas, procedeu-se à comparação das seqüências obtidas com seqüências padrão do GenBank (região 5' NCR) e à classificação das mesmas utilizando um painel contendo as posições variáveis dos nucleotídeos entre os genótipos e subtipos.

2.3.3.1. Seqüências padrão

As seqüências padrão foram obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a partir dos isolados descritos na literatura e relacionadas a seguir com respectivo número de acesso entre parênteses (BERNIER, *et al.*, 1996; ZEIN & PERSING, 1996; MAERTENS & STUYVER, 1997 *apud* ARENS, 2001; GERMER *et al.*, 1999; SCHRÖTER, *et al.*, 2001):

- 1a, HCV-1 (M62321) e HC-J1 (D10749)
- 1b, HCV-J (D90208)
- 1c, HC-G9 (D14853)
- 2a, HC-J6 (D00944)
- 2b, HC-J8 (D10998)
- 3a, HCV-K3a (D28917)

- 3b, HCV-Tr (D49374)
- 3c, NE048 (D16612)
- 4a, HCV4APOLY (Y11604)
- 5a, EUH1480 (Y13184)
- 6a, EUHK2 (Y12083)

A título de ilustração, as seqüências do HCV na porção 5' NCR estão demonstradas na figura 2, onde pode-se verificar as principais semelhanças e diferenças entre os genótipos.

2.3.3.2. Classificação pelo painel de posições de nucleotídeos

As seqüências padrão anteriormente relacionadas foram utilizadas para compor um painel contendo as principais posições de nucleotídeos da região 5' NCR que caracterizam os diferentes genótipos e subtipos (tabela 5).

As seqüências das amostras foram editadas pelo programa SEQUENCHER e alinhadas pelo programa BIOEDIT. A seguir, elas foram classificadas nos genótipos e subtipos do HCV por análise comparativa com o painel de nucleotídeos obtido.

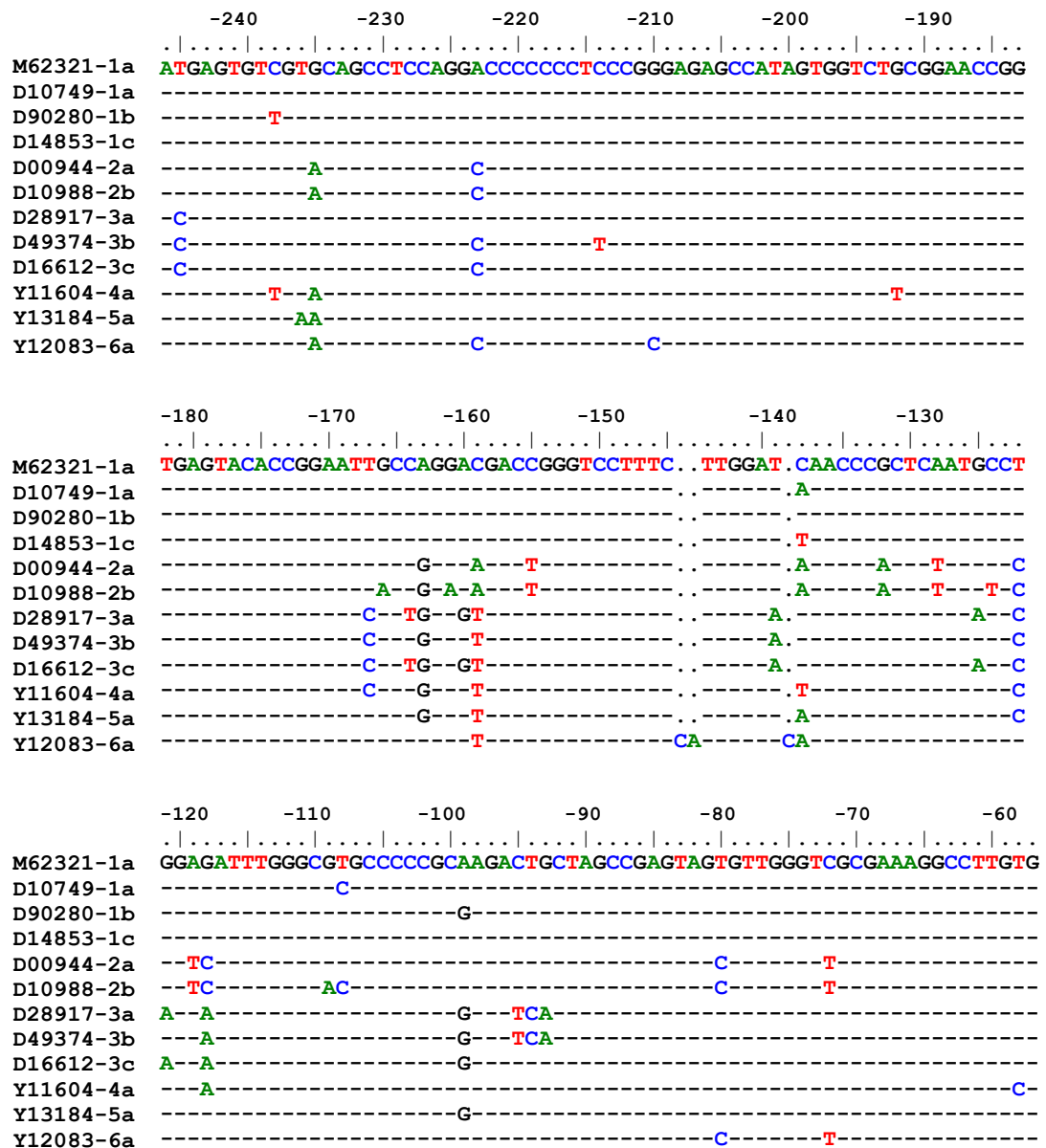


Figura 2: Região 5' NCR do HCV. Comparação entre seqüências dos genótipos 1 a 6, identificadas (à esquerda) pelo número de acesso no GenBank seguido do subtipo do HCV correspondente. Todas as seqüências foram comparadas com o isolado HCV-1 (M62321) e as bases iguais foram substituídas por traços. Pontos foram usados para acomodar inserções no subtipo 6a. Os nucleotídeos foram numerados a partir do códon de iniciação da região do *core*.

Fonte: <http://www.bioafrica.net/GDElinux/GDEmicrobial.html>

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

Posição do nucleotídeo	Subtipos do HCV										
	1a	1b	1c	2a	2b	3a	3b	3c	4a	5a	6a
-245	T	T	T	T	T	C	C	C	T	T	T
-235	G	G	G	A	A	G	G	G	A	A	A
-223	A	A	A	C	C	A	C	C	A	A	C
-214	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
-210	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C
-192	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	G
-167	T	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T
-166	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
-164	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	C
-163	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	A
-161	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
-160	A	A	A	A	A	G	A	G	A	A	A
-159	C	C	C	A	A	T	T	T	T	T	T
-155	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C
-139	T	T	T	T	T	A	A	A	T	T	T
-138	M*	C	T	A	A	C	C	C	T	A	A
-132	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G
-128	A	A	A	T	T	A	A	A	A	A	A
-125	G	G	G	G	G	A	G	A	G	G	G
-124	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
-122	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	T
-121	G	G	G	G	G	A	G	A	G	G	G
-119	A	A	A	T	T	A	A	A	A	A	A
-118	G	G	G	C	C	A	A	A	A	G	G
-109	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
-108	Y*	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T
-99	A	G	A	A	A	G	G	G	A	G	A
-95	C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C
-94	T	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T
-93	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G	G
-80	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	C
-72	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	T
-58	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T

Posições dos nucleotídeos numerados a partir da região do core. As posições em destaque representam as posições importantes na diferenciação entre genótipos ou subtipos do HCV. Nucleotídeos: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T).

*Y = C ou T

*M = C ou A

3. Análise estatística

Os resultados tabulados foram expressos em frequências absoluta e relativa. Quando adequado, também se utilizou a média \pm desvio padrão.

A análise estatística constituiu-se dos testes não-paramétricos Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher para comparação entre proporções, e dos testes de Kruskal-Wallis para avaliar a idade dos grupos de pacientes e genótipos 1 e 3, e o teste de Dunn para comparação da idade dos grupos de pacientes, dois a dois. *Odds ratio* e Intervalo de Confiança ao nível de 95% (IC-95%) foram utilizados para avaliação do grau de associação entre variáveis (DUNN, 1964; VIEIRA, 1980; VIEIRA, 2003). O índice de concordância Kappa (κ) foi empregado para comparação entre os resultados dos métodos imunoenzimáticos e PCR, obedecendo ao critério de interpretação proposto por LANDIS & KOCH *apud* KRAMER & FEINSTEIN (1981):

Valor de κ	grau de concordância
• < 0	pobre
• 0 - 0,20	fraca
• 0,21 - 0,40	razoável
• 0,41 - 0,60	moderada
• 0,61 - 0,80	substancial
• 0,81 - 1,00	quase perfeita

A análise estatística foi realizada utilizando o programa EPI-INFO versão 6.04d (CDC, Atlanta, EUA), com exceção do teste de Dunn que foi realizado na planilha de cálculo do programa Excel. Os testes estatísticos foram realizados em nível de significância de 5%, considerando-se, portanto, significativos os testes quando valor de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

O conjunto total de resultados obtidos para cada amostra encontra-se no Anexo 4.

1. Avaliação da frequência de anticorpos anti-HCV utilizando o enzaimunoensaio de micropartículas (MEIA)

1.1. Doadores de sangue

Empregando-se a metodologia de enzaimunoensaio de micropartículas (MEIA), verificou-se a frequência de positividade dos anticorpos anti-HCV entre doadores de sangue que realizaram sua primeira doação no Hemocentro Regional de Londrina. Pesquisou-se a presença de anticorpos anti-HCV em 4.044 amostras de sangue de primo-doadores. Entre estes indivíduos, 2.628 (65%) eram do sexo masculino e 1.416 (35%) eram do sexo feminino. Obteve-se um total de 32 amostras reagentes, o que resulta em uma frequência de positividade de 0,8% (IC-95%: 0,5%-1,1%) nesta população. Não se verificou associação da positividade dos anticorpos anti-HCV com o sexo (Teste exato de Fisher; $p=0,192$) ou a faixa etária dos doadores (teste do Qui-quadrado = 2,98 com 3 graus de liberdade; $p=0,394$). A positividade do anti-HCV na população de doadores de sangue segundo a distribuição das diferentes faixas etárias encontra-se no anexo 5-A.

1.2. Indivíduos infectados pelo HIV

Utilizando a metodologia MEIA, foram analisadas 628 amostras de indivíduos infectados pelo HIV, sendo que 354 (56%) eram do sexo masculino e 274 (44%) eram do sexo feminino. Nesta população, a positividade para os anticorpos anti-HCV foi de 20,2% (IC-95%: 17,1%-23,6%), sendo significativamente maior no grupo do sexo masculino (25,7%) do que no feminino (13,1%) (teste exato de Fisher; $p<0,001$). No

entanto, a distribuição dos resultados positivos não sofreu variação por faixa etária, segundo o teste do Qui-quadrado ($\chi^2 = 3,85$ com 3 graus de liberdade; $p=0,277$). A distribuição dos anticorpos anti-HCV detectados em indivíduos HIV soropositivos segundo sexo e idade encontra-se no anexo 5-B.

1.3. Avaliação da freqüência de anticorpos anti-HCV utilizando o ELISA e a PCR para confirmação dos resultados reagentes no MEIA

Como veremos adiante, um segundo método imunoenzimático foi empregado para avaliar as amostras positivas no MEIA. No grupo de doadores de sangue, apenas 6/30 amostras inicialmente reagentes no MEIA também apresentaram resultado reagente quando submetidas ao ELISA. No grupo dos pacientes HIV positivos, 122/127 foram reagentes nos dois métodos imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-HCV. Se forem consideradas como verdadeiramente reagentes apenas as amostras que apresentaram resultados reagentes nos dois métodos imunoenzimáticos empregados, então a freqüência de anticorpos anti-HCV passaria a ser 0,15% (6/4.042) em doadores de sangue, e 19,4% (122/628) em indivíduos HIV soropositivos.

Também se utilizou a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da viremia nos indivíduos anti-HCV reagentes e que retornaram para a repetição dos exames. Entre as amostras avaliadas na PCR, encontramos 2/13 (15,4%) amostras positivas para o HCV-RNA nos doadores de sangue e 96/127 (75,6%) nos indivíduos HIV soropositivos. Uma vez que nem todas as amostras anti-HCV reagentes no grupo de doadores de sangue puderam ser submetidas a PCR, não foi possível avaliar a prevalência do HCV neste grupo utilizando a PCR como critério de positividade. Porém, este mesmo critério pôde ser empregado no grupo dos indivíduos HIV soropositivos, resultando em 15,3% (96/628) de amostras HCV-RNA positivas. Nos dois grupos, as amostras apresentaram viremia detectável apenas quando ambos os testes imunoenzimáticos empregados foram reagentes.

2. Análise dos testes sorológicos e PCR

Utilizando diversos métodos sorológicos e moleculares disponíveis para o diagnóstico da hepatite C, analisou-se um total de 185 amostras que apresentaram resultado reagente para anticorpos anti-HCV pelo método MEIA. Foram incluídas 50 amostras de doadores de sangue, oito amostras de pacientes com hepatite crônica e 127 de indivíduos infectados pelo HIV (figura 1, página 32).

2.1. Avaliação da relação DO/CO no teste imunoenzimático (MEIA)

A relação DO/CO das 185 amostras reagentes pelo MEIA variou de 1,02 até 163,80. Sessenta e uma amostras (33%) apresentaram reatividade fraca, ou seja, a relação DO/CO foi menor do que 5,0, e 124 (67%) apresentaram reatividade forte com relação DO/CO igual ou superior a 5,0 (tabela 6).

2.2. Avaliação pelo teste imunoenzimático em microplaca (ELISA)

Com o intuito de avaliar possíveis reações falso-positivas no MEIA e para análise comparativa de dois métodos sorológicos, utilizou-se um segundo teste imunoenzimático de detecção de anticorpos anti-HCV (ELISA - Murex anti-HCV versão 4.0). Das amostras reagentes no MEIA, 183 (98,9%) foram submetidas ao ELISA; duas amostras não estavam disponíveis para a realização do teste. Encontramos 144/183 (78,7%) amostras positivas no ELISA, sendo que nove amostras (4,9%) apresentaram relação DO/CO menor do que 3,0 e 135 (73,8%) apresentaram relação DO/CO maior ou igual a 3,0 (tabela 6).

A concordância entre o MEIA e o ELISA sofreu variações dependendo do grupo populacional estudado ($\chi^2 = 95,22$, com 2 graus de liberdade; $p < 0,001$). Em 8/8 (100%) pacientes crônicos estudados, houve concordância entre os resultados. Entre os pacientes infectados com o vírus HIV, encontramos 122/127 (96,1%) amostras com resultado reagente nos dois métodos, sendo que cinco amostras (3,9%) foram fracamente

reagentes no ELISA, 117 amostras (92,1%) foram fortemente reativas e outras cinco amostras (3,9%) não se confirmaram neste ensaio. No entanto, entre os 48 doadores de sangue positivos no MEIA, apenas 14 (29,1%) apresentaram concordância de resultados, sendo que quatro amostras (8,3%) apresentaram reatividade fraca e 10 (20,8%) apresentaram reatividade forte no ELISA. As outras 34 amostras (70,8%) não apresentaram reatividade no ELISA, e quando submetidas a PCR (realizada em 19 amostras) também apresentaram resultado negativo (anexo 4).

2.3. Pesquisa de anticorpos anti-HCV pelo teste suplementar *immunoblot* (IB)

Quinze amostras foram submetidas ao ensaio de detecção de anticorpos específicos por IB. Foram selecionadas 10 amostras de doadores de sangue e cinco de indivíduos infectados pelo HIV. Estas 15 amostras mostravam o seguinte perfil sorológico: oito eram reagentes no MEIA e no ELISA e sete eram reagentes no MEIA e não-reagentes no ELISA. Os resultados obtidos no IB, obedecendo os critérios de leitura estabelecidos pelo fabricante, foram: três amostras (20%) negativas, oito amostras (53%) indeterminadas e quatro amostras (27%) positivas. Os resultados negativos no IB foram encontrados apenas em amostras MEIA reagente e ELISA não-reagente, e os resultados positivos foram obtidos apenas em amostras que apresentaram reatividade nos dois testes imunoenzimáticos.

Foi realizada a pesquisa do HCV-RNA em 10 amostras, sendo uma (10%) negativa no IB, cinco (50%) indeterminadas e quatro (40%) positivas neste ensaio. Em todas estas amostras o resultado da PCR foi negativo.

Na avaliação da reatividade específica para as bandas no IB, apurou-se que das quatro amostras positivas apenas uma apresentou reatividade para todas as bandas pesquisadas e as outras três amostras apresentaram reatividade apenas para as bandas do *core* e NS3. Entre as amostras com resultado indeterminado, houve reatividade nas bandas do *core*, NS3, NS4 e NS5 em uma, duas, uma e quatro amostras, respectivamente (anexo 6).

2.4. Detecção do HCV-RNA por PCR

A PCR para detecção do HCV-RNA foi realizada em 166 amostras com sorologia reagentes para anticorpos anti-HCV pelo MEIA. Entre as amostras analisadas, 111 (67%) foram positivas na PCR. Quando avaliado por grupo, encontrou-se 7/31 (22,6%) amostras positivas entre os doadores de sangue, 8/8 (100%) entre os pacientes crônicos, e 96/127 (75,6%) entre os indivíduos infectados pelo HIV (anexo 4). Verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($\chi^2 = 35,77$, com 2 graus de liberdade; $p < 0,001$) ocasionada pela baixa frequência de resultados positivos na PCR em amostras reativas no MEIA provenientes de doadores de sangue. A figura 3 traz uma foto ilustrativa da detecção do produto da PCR.



Figura 3: Foto ilustrativa do produto da *nested*-PCR para HCV detectado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. O fragmento obtido apresenta aproximadamente 240bp. M: marcador de peso molecular; Números 1 a 23: amostras positivas e negativas; (-): controle negativo; (+): controle positivo.

2.5. Análise conjunta dos testes sorológicos e PCR

As amostras que apresentaram reatividade no MEIA foram avaliadas

comparativamente com os outros testes sorológicos e a PCR. Verificou-se que das 61 amostras com reatividade fraca no MEIA, 13 (21,3%) apresentaram reatividade forte no ELISA (definido como relação DO/CO \geq 3,0), 9 (14,8%) apresentaram reatividade fraca (DO/CO < 3,0), 37 (60,6%) foram negativas e 2 (3,3%) não estavam disponíveis para serem avaliadas pelo segundo método. Por outro lado, das 124 amostras com reatividade forte no MEIA, 122 (98,4%) também apresentaram reatividade forte no ELISA e apenas duas amostras (1,6%) foram negativas no teste (tabela 6).

Das amostras reativas no MEIA, 89,7% (166/185) estavam disponíveis para realização da PCR. Neste grupo, a positividade na PCR foi verificada em 105/121 (86,8%) amostras com reatividade forte no MEIA, e em apenas 6/45 (13,3%) amostras com reatividade fraca neste teste imunoenzimático. Este aspecto foi mais expressivo entre as amostras provenientes de doadores de sangue e pacientes crônicos, entre os quais todas as amostras que apresentaram relação DO/CO menor do que 5,0 no MEIA foram negativas na PCR e todas as amostras com relação DO/CO maior ou igual a 5,0 foram positivas no teste (anexo 4).

A correlação entre os resultados dos testes imunoenzimáticos e da PCR foi avaliada estatisticamente pelo índice de concordância Kappa (κ). Avaliando amostras reagentes pelo MEIA, verificou-se uma concordância substancial entre o grau de reatividade no MEIA com a positividade na PCR ($\kappa=0,686$; $p<0,001$) ou com a positividade no ELISA ($\kappa=0,670$; $p<0,001$). Já a concordância entre o grau de reatividade dos testes MEIA e ELISA, considerando apenas amostras reativas nos dois métodos, foi considerada moderada ($\kappa=0,539$; $p<0,001$).

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

MEIA	ELISA	PCR			Total
		Positivo	Negativo	Não realizado	
DO/CO < 5 ^a	Não reagente	0	23	14	37
	DO/CO < 3 ^a	1	8	0	9
	DO/CO ≥ 3 ^b	5	7	1	13
	Não realizado	0	1	1	2
DO/CO ≥ 5 ^b	Não reagente	0	1	1	2
	DO/CO < 3 ^a	0	0	0	0
	DO/CO ≥ 3 ^b	105	15	2	122
Total		111	55	19	185

DO/CO = valor de densidade óptica da amostra dividida pelo *cut off* da reação (interpretado como reatividade fraca^a ou forte^b)

MEIA (fraco / forte) x PCR (+ / -): $\kappa=0,686$ ($p<0,001$)

MEIA (fraco / forte) x ELISA (+ / -): $\kappa=0,670$ ($p<0,001$)

MEIA (fraco / forte) x ELISA (fraco / forte): $\kappa=0,539$ ($p<0,001$)

Na avaliação frente ao teste suplementar de detecção de anticorpos, verificou-se grande diversidade entre os valores de densidade óptica nos testes de MEIA e ELISA e a reatividade pelas bandas de proteínas específicas presentes no IB (tabela 7).

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

Immunoblot (IB)	n ¹	MEIA	ELISA
Negativo	3	DO/CO < 5,0 ²	Não reagente
Indeterminado	2	DO/CO < 5,0	Não reagente
	3	DO/CO < 5,0	DO/CO < 3,0 ²
	1	DO/CO < 5,0	DO/CO ≥ 3,0 ³
	2	DO/CO ≥ 5,0 ³	Não reagente
Positivo	1	DO/CO < 5,0	DO/CO < 3,0
	3	DO/CO ≥ 5,0	DO/CO ≥ 3,0

¹ número de amostras analisadas

² reatividade fraca

³ reatividade forte

3. Genotipagem

Sessenta e uma amostras positivas na PCR foram submetidas ao seqüenciamento de nucleotídeos para determinação do genótipo. Encontramos 47 (77,1%) amostras do genótipo 1, uma (1,6%) do genótipo 2 e 13 (21,3%) do genótipo 3. A comparação com seqüências descritas na literatura não revelou nenhuma amostra com padrão diferente dos três genótipos citados. A classificação das amostras nos respectivos genótipos e subtipos foi feita pela comparação com as posições específicas de nucleotídeos onde ocorrem os polimorfismos e mutações mais freqüentes (ver tabela 5, página 44).

Cinco amostras do genótipo 1 apresentaram na posição -99 a base guanina (G), que geralmente é encontrada nesta posição nos isolados do subtipo 1b, e, na posição -138, estas amostras apresentaram a base adenina (A), que é encontrada nos isolados do subtipo 1a. Por isso, estas amostras foram classificadas como 1a/b.

A única amostra identificada como genótipo 2 apresentou nucleotídeos característicos do subtipo 2a nas posições -109 e -108 e do subtipo 2b nas posições -166, -161 e -124, e por isso foi considerada 2a/b.

A tabela 8 apresenta a classificação das 61 amostras submetidas a genotipagem, apresentando a freqüência com que cada subtipo foi detectado entre os grupos estudados.

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

Genótipo e subtipos	Doadores de sangue (%)	Pacientes crônicos (%)	Pacientes HIV(+) (%)	Total (%)
Tipo 1	6 (85,7)	5 (62,5)	36 (78,3)	47 (77,1)
1a	3 (42,8)	1 (12,5)	22 (47,8)	26 (42,6)
1b	2 (28,6)	4 (50,0)	9 (19,6)	15 (24,6)
1c	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	1 (1,6)
1a/b	1 (14,3)	0 (0,0)	4 (8,7)	5 (8,2)
Tipo 2	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (1,6)
2a/b	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (1,6)
Tipo 3	1 (14,3)	2 (25,0)	10 (21,7)	13 (21,3)
3a	1 (14,3)	2 (25,0)	9 (19,5)	12 (19,7)
3c	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	1 (1,6)
Total	7 (100)	8 (100)	46 (100)	61 (100)

(%): freqüência no grupo

4. Aspectos epidemiológicos

4.1. Fatores de risco associados à infecção pelo HCV

Diversos fatores de risco associados com a transmissão do HCV foram avaliados entre os pacientes com sorologia positiva para anti-HCV.

Encontramos 90/127 (71%) pacientes co-infectados pelo HIV/HCV que relataram o uso de alguma droga ilícita, tanto do tipo inalatória, endovenosa como também abuso de medicamentos. Neste mesmo grupo, 59/90 (65,5%) indivíduos afirmaram que ao longo de suas vidas tiveram mais do que 10 parceiros sexuais e 48 (53%) apresentaram algum tipo de doença sexualmente transmissível além da infecção pelo HIV, reforçando a associação entre o uso de drogas e a prática sexual de risco. Sessenta e cinco indivíduos relataram o uso de drogas injetáveis, sendo que em 57 (88%) dos casos ocorreu o compartilhamento de seringas ou agulhas.

A transfusão de sangue representou um pequeno número de casos de possível transmissão do HCV tanto entre indivíduos infectados pelo HIV (15,0%) como em doadores de sangue (3,2%). Já entre os pacientes com hepatite crônica, 4/8 (50%) receberam transfusão sanguínea.

A presença de múltiplos fatores de risco para a infecção pelo HCV foi comum em indivíduos infectados pelo HIV, mas ocorreu apenas no caso de um doador de sangue que relatou o uso de drogas e relações sexuais com múltiplos parceiros. Em 25/31 (81%) doadores de sangue avaliados, incluindo 15 doadores com resultados discordantes no MEIA e ELISA, não foi possível identificar algum fator de risco associado à infecção pelo HCV. Também não foi possível identificar a possível causa da infecção em 3/8 (37,5%) dos pacientes crônicos e em 10/127 (7,9%) dos indivíduos HIV soropositivos.

Na tabela 9 são apresentadas as freqüências com que os fatores de risco pesquisados foram encontrados em indivíduos que apresentam infecção ativa pelo vírus HCV, tendo sido divididos em dois grupos: indivíduos infectados e não-infectados pelo vírus HIV. No anexo 7, os mesmos fatores de risco são avaliados levando-se em conta também os indivíduos que apresentaram resultado negativo na PCR.

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

Fator de risco	HIV (+)	HIV (-) ¹	OR	IC-95%	p
	n = 96 N ² (%)	n = 15 N ² (%)			
Parentera					
Usuário de drogas injetáveis	50 (52,1)	1 (6,7)	15,22	1,92-120,35	<0,001
Transfusão de sangue	14 (14,6)	5 (33,3)	0,34	0,10-1,15	0,131
Sexual					
Múltiplos parceiros ³	57 (59,4)	3 (20,0)	5,85	1,55-22,09	0,004
Homossexual masculino	11 (11,5)	0 (0,0)	-	-	-
Parceiro de usuário de droga ⁴	6 (6,3)	0 (0,0)	-	-	-
Nega algum fator de risco avaliado	5 (5,2)	8 (53,3)	0,05	0,01-0,19	<0,001

¹ doadores de sangue + pacientes crônicos

² Número de indivíduos que apresentaram o fator de risco em questão

³ mais de 10 parceiros sexuais ao longo da vida

⁴ indivíduo não usuário de droga

OR: *odds ratio*

Na avaliação da frequência dos subtipos do HCV em cada um dos grupos de risco, constatou-se o predomínio do subtipo 1a em usuários de drogas injetáveis (54%), nos parceiros sexuais de usuários de drogas (50%) e em indivíduos com múltiplos parceiros (48%). Em indivíduos submetidos à transfusão sanguínea, ocorreu o predomínio do subtipo 1b (45%), enquanto que nos homossexuais masculinos houve um maior número de casos dos subtipos 1a e 3a (33%). Em 19,7% (12/61) dos casos não foi possível determinar a provável causa da infecção pelo HCV (tabela 10).

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

Fator de risco	1a *	1b *	3a *	Outros *^a
	N (%)^b	N (%)^b	N (%)^b	N (%)^b
Parenteral				
Usuário de drogas injetáveis	14 (53,8)	4 (15,4)	2 (7,7)	6 (23,1) ^{1,2,4}
Recebeu transfusão de sangue	4 (36,4)	5 (45,4)	1 (9,1)	1 (9,1) ³
Sexual				
Múltiplos parceiros	13 (48,2)	6 (22,2)	4 (14,8)	4 (14,8) ^{1,2}
Homossexual masculino	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7) ²
Parceiro de usuário de droga	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	0 (0,0)
Fator de risco não determinado	3 (25,0)	3 (25,0)	5 (41,7)	1 (8,3) ¹

* Número de amostras analisadas para cada subtipo: 1a (26), 1b (15), 3a (12), outros (8).

^a outros subtipos: 1a/b (5 amostras)¹; 1c (1)²; 2a/b (1)³; 3c (1)⁴

^b N: número de indivíduos que apresentam o fator de risco (porcentagem no grupo de risco)

V. DISCUSSÃO

1. Frequência de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue

A frequência de anticorpos anti-HCV obtida em doadores de sangue da região de Londrina foi de 0,8%. Comparado aos dados mais recentes registrados na literatura, nosso resultado foi superior à frequência de 0,3% encontrada na Índia (GARG *et al.*, 2001), e semelhante às frequências de 0,6% verificadas no Irã (GHAVANINI & SABRI, 2000) e na Grécia (ZERVOU *et al.*, 2003), de 0,8% no México (VIVAS-ARCEO *et al.*, 2003) e de 1,1% no Iêmen (HAIDAR, 2002). Nosso resultado foi inferior às frequências de 2,9% registrada na Tailândia (LUKSAMIJARULKUL *et al.*, 2002), de 4,0% no Paquistão (KHATTAK *et al.*, 2002), de 6,8% em Malauí (CANDOTTI *et al.*, 2001) e de 7,3% na República da Geórgia (BUTSASHVILI *et al.*, 2001). Em todos os estudos citados, inclusive o nosso, a frequência apresentada relaciona-se aos dados da triagem sorológica, sem que tenha sido empregado algum método suplementar ou molecular para confirmação da infecção.

Quando comparado aos dados brasileiros nesta população, a frequência por nós obtida foi semelhante à frequência de 0,6% encontrada em Manhuaçu-MG (CATALAN-SOARES *et al.*, 2000), de 0,8% em Curitiba-PR (PAROLIN *et al.*, 1999), e de 1,0% registrada em Florianópolis-SC (TREITINGER *et al.*, 2000). Nossa frequência em doadores de sangue foi inferior às frequências de 2,2% em Goiânia-GO (MARTINS *et al.*, 1994), de 2,5% em Campo Grande-MS (AGUIAR *et al.*, 2001), de 2,6% em Campinas-SP (GONÇALES Jr. *et al.*, 1993) e de 2,9% no Rio de Janeiro-RJ (PATIÑO-SARCINELLI *et al.*, 1994). Embora a comparação entre diferentes estudos seja difícil devido à grande variedade de *kits* comercialmente disponíveis empregados e às variações geográficas dentro do país, verifica-se que atualmente, de uma forma geral, a

positividade para o anti-HCV na população de doadores de sangue parece ser menor do que no início da obrigatoriedade do teste sorológico anti-HCV nos bancos de sangue em 1993. Isto se deve provavelmente a dois fatores principais: o melhoramento tecnológico dos *kits*, reduzindo o número de resultados falso-positivos, e a seleção de doadores com exclusão permanente dos indivíduos positivos no teste anti-HCV.

Um estudo anterior realizado no período de julho de 1994 a abril de 2001 em doadores de sangue da região de Londrina revelou uma taxa de positividade para anticorpos anti-HCV de 0,5%, pouco menor do que a encontrada no presente estudo, ainda que utilizando o mesmo ensaio metodológico (REICHE *et al.*, 2003). Isto deve ter ocorrido pelo fato de também terem sido incluídos naquele estudo doadores de repetição previamente avaliados em doações anteriores, o que contribuiu para o aumento da população saudável em relação à de indivíduos positivos para anti-HCV.

Por outro lado, se tivéssemos utilizado o ELISA como teste de triagem, essa frequência provavelmente seria diferente. Como pudemos ver pela concordância entre os dois testes, o uso de dois métodos de triagem sorológica resultaria em uma menor frequência de anticorpos anti-HCV, uma vez que resultados discrepantes poderiam, em princípio, ser interpretados como prováveis falso-positivos. No nosso caso, a confirmação das amostras reagentes no MEIA através do ELISA resultou na diminuição da frequência de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue para 0,15%. TAMIM *et al.* (2001) utilizaram esta mesma estratégia no Líbano e verificaram a redução na frequência do anti-HCV de 1,1% para 0,4% após confirmação dos resultados inicialmente reagentes utilizando um segundo método de triagem sorológica.

Verificamos que 15,4% (2/13) das amostras de doadores de sangue inicialmente reagentes pelo MEIA apresentaram PCR positiva. Este dado concorda com a positividade de 11,1% na PCR obtida por VARDAS *et al.* (1999) em amostras anti-HCV reagentes de doadores de sangue. Os autores verificaram que naquela população, onde a soroprevalência era de

0,9%, o HCV-RNA era detectável em 0,1% dos doadores. No entanto, em nosso estudo não foi possível proceder à avaliação da frequência de infecção ativa em doadores de sangue, uma vez que a PCR não pôde ser realizada em todas as amostras anti-HCV reagentes.

2. Frequência de anticorpos anti-HCV em indivíduos HIV positivos

A frequência de anticorpos anti-HCV em indivíduos infectados com o HIV da nossa população foi de 20,2%, semelhante à positividade de 17,7% registrada nessa mesma população em São Paulo (MENDES-CORREA *et al.* 2000) e de 25,6% registrada em indivíduos infectados pelo HIV que se candidataram à doação de sangue em Londrina (REICHE *et al.*, 2003). Ainda no Brasil, um estudo realizado em Florianópolis revelou uma positividade de 54,7% de anticorpos anti-HCV em pacientes infectados pelo HIV (TREITINGER *et al.*, 2000). Em outras regiões do mundo, estes dados também são bastante diversificados, encontrando-se uma positividade de 5,0% na Korea (KIM *et al.*, 2003), de 42,0% na Espanha (PUIG-BASAGOITI *et al.*, 2000) e de 50,0% na Suíça (OPRAVIL *et al.*, 1998).

No nosso estudo, 75,6% (96/127) das amostras anti-HCV reagentes de indivíduos HIV soropositivos apresentaram HCV-RNA detectável. O HCV-RNA foi detectado em 70,6% das amostras anti-HCV reagentes avaliadas OLIVEIRA M. *et al.* (1999a) e em 98% das amostras estudadas por MENDES-CORREA *et al.* (2000). Pode-se, portanto, verificar o elevado índice de infecção ativa neste grupo de indivíduos, sendo que 15,3% (96/628) dos indivíduos HIV soropositivos por nós avaliados apresentaram PCR positiva.

3. Avaliação dos testes sorológicos e moleculares

Diversos trabalhos analisam os resultados dos testes imunoenzimáticos classificando-os segundo o nível de reatividade obtido pela leitura espectrofotométrica. Entre os ensaios de ELISA convencionais é

comum encontrarmos a classificação dos resultados em fracamente reativos quando a relação DO/CO é menor do que 3,0 ou de fortemente reativos quando a relação DO/CO é maior ou igual a 3,0 (GRETCH *et al.*, 1992; GONÇALES *et al.*, 2000). Por esta razão, estes parâmetros também foram adotados em nosso trabalho. Embora o MEIA seja baseado no mesmo princípio do ELISA, a leitura da reação enzimática é baseada na emissão de um sinal fluorescente com nível de detecção diferenciado. Por isso, adotou-se o valor da relação DO/CO maior ou igual a 5,0 para definir um teste fortemente reagente (GOUBAU *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, aplicamos um segundo método de ELISA às amostras reagentes no MEIA com o objetivo de avaliar a correlação entre os métodos. Nas amostras analisadas, encontramos 79% de concordância entre os dois métodos, sendo que o nível de concordância foi maior no grupo de indivíduos HIV positivos do que nos doadores de sangue. Todas as amostras positivas pela PCR ou no IB apresentaram resultado reagente nos dois métodos imunoenzimáticos empregados, o que sustenta a hipótese de que os indivíduos que apresentaram dois resultados reagentes nos testes de triagem verdadeiramente se infectaram com o HCV em algum momento de suas vidas.

GOUBAU *et al.* (1997) compararam os resultados reagentes obtidos na triagem de amostras clínicas pelo MEIA mais um segundo teste de ELISA com a positividade no IB ou PCR. Os autores verificaram que utilizando apenas o MEIA, o VPP naquela amostragem foi de 88,8%, elevando-se para 94-96%, quando associado a um segundo teste de ELISA. Da mesma forma, as amostras com DO/CO maior do que 5,0 apresentaram índices de confirmação na PCR ou IB de 95%, elevando-se para cerca de 98% quando se empregavam dois métodos de triagem. Os autores concluíram que a utilização de dois métodos diferentes na triagem de anticorpos anti-HCV seria uma estratégia aplicável ao laboratório clínico para reduzir a utilização do IB em até 85% dos casos. Utilizando esta mesma forma de análise, encontramos resultados um pouco menos expressivos, possivelmente devido à nossa própria amostragem, uma vez que pudemos avaliar nossos

dados apenas pelos resultados obtidos da PCR, que é um indicador de infecção ativa, e através de algumas poucas amostras submetidas à confirmação da presença de anticorpos anti-HCV pelo IB, prejudicando a identificação de casos de infecção passada. Assim, o VPP do MEIA no conjunto total de amostras reagentes foi de 68,4%, elevando-se para 81,6% quando associado a um segundo método. Por outro lado, quando foram avaliadas apenas amostras fortemente reativas, o VPP foi calculado em 89,3% para o MEIA e 90% para o MEIA associado ao ELISA. A maior diferença no VPP foi observada em doadores de sangue, onde o VPP subiu de 24,2% para 72,7% quando o MEIA foi associado ao ELISA (anexo 8).

Há relatos na literatura indicando que o grau de reatividade no ELISA está relacionado com a positividade nos testes de IB e PCR. Este aspecto também foi verificado no nosso estudo, onde 87% das amostras com reatividade forte no MEIA foram positivas também na PCR, contrastando com a presença de viremia detectável em apenas 13% das amostras com reatividade fraca no MEIA. Num estudo semelhante, GRETCH *et al.* (1992) verificaram que 71% das amostras que apresentavam relação DO/CO maior que 3,0 no ELISA e 50% das amostras cuja relação DO/CO estava compreendida entre 1,0 e 3,0 eram positivas na PCR. Por outro lado, GONÇALES *et al.* (2000) encontraram 91,5% de positividade na PCR quando a relação DO/CO no ELISA era maior ou igual a 3,0 e apenas 17,6% quando a relação DO/CO estava entre 1,0 e 3,0.

Na população estudada de doadores de sangue e pacientes com hepatite C crônica não-infectados pelo HIV, a presença do HCV-RNA somente foi verificada quando o resultado do MEIA e do ELISA apresentaram relação DO/CO superior a 5,0 e 3,0, respectivamente. Por esta razão, a presença de reatividade fraca nos ensaios imunoenzimáticos aplicados a indivíduos imunocompetentes, como é o caso dos doadores de sangue, poderia ser considerada como sugestiva da ausência de viremia, podendo se tratar de uma infecção resolvida ou de um resultado falso-positivo nos ensaios para detecção de anticorpos anti-HCV. Neste caso, a ausência de fatores de risco associados ao HCV falaria a favor da

segunda possibilidade. Já entre portadores do vírus HIV, o quadro de deficiência imunológica não permite as mesmas conclusões.

O IB foi realizado em apenas 15 amostras que apresentaram resultado negativo na PCR ou que não foram submetidas a este ensaio. Poucas amostras (27%) se confirmaram positivas pelo IB, mas o índice de resultados indeterminados foi bastante elevado (53%) e bem maior do que na maioria dos trabalhos consultados. Em dois estudos envolvendo doadores de sangue, a positividade no IB variou de 23-63% e o percentual de amostras indeterminadas foi de apenas 6-20% (CASPARI *et al.*, 1997; SOUTO *et al.*, 2002). A aparente discrepância dos nossos resultados pode ser explicada pelo pequeno número de amostras por nós analisadas e pela exclusão de amostras positivas na PCR, o que não ocorreu em nenhum dos outros estudos. Um outro aspecto seria o uso de kits de IB de marcas diferentes, o que também dificulta a comparação de resultados.

Pudemos observar que as bandas que apresentaram maior reatividade no IB foram as do *core* e NS3 e a banda que determinou maior número de resultados indeterminados em nossas amostras foi a NS5. Diversos autores verificaram uma alta frequência de positividade para a banda do *core* em amostras submetidas ao IB (MARTINS *et al.*, 1994; NAGHETTINI *et al.*, 1997; CASPARI *et al.*, 1997). A presença de anticorpos contra a proteína NS3 já foi considerada como o primeiro marcador da infecção emergente (CASPARI *et al.*, 1997). No entanto, não existe um padrão específico da resposta imune do hospedeiro contra os diferentes antígenos do HCV, devido à própria variabilidade genômica do vírus (NAGHETTINI *et al.*, 1997). Finalmente, é provável que menos de um quinto dos resultados indeterminados estejam verdadeiramente relacionados com uma infecção prévia, enquanto que a maioria dos casos possivelmente reflita uma reatividade inespecífica às proteínas do HCV (CASPARI *et al.*, 1997).

Recente publicação do CDC (Atlanta, 2003) demonstrou que a positividade no IB é maior nas amostras com alta relação DO/CO no teste de triagem. Nas condições daquele experimento, as amostras com relação

DO/CO maior do que 3,8 no ELISA apresentaram probabilidade superior a 95% de resultado positivo no IB. Por isso, aquela instituição sugere um novo algoritmo onde o IB seria empregado às amostras com baixa relação DO/CO ou quando o resultado obtido na PCR fosse negativo. Este procedimento permitiria que o diagnóstico da hepatite C fosse realizado de forma mais racional e menos dispendiosa. Utilizando os critérios propostos pelo CDC na nossa população, verificamos que o IB foi pouco eficiente para caracterizar potenciais indivíduos infectados entre aqueles que apresentaram reatividade fraca nos testes imunoenzimáticos. Também verificamos que o IB foi pouco eficiente para descartar a infecção, sendo que apenas três amostras foram negativas no IB enquanto que oito amostras apresentaram resultados indeterminados, entre elas quatro amostras não reativas pelo ELISA.

4. Genotipagem do HCV

A técnica empregada para a genotipagem de nossas amostras foi o seqüenciamento de nucleotídeos da região 5' NCR. Embora esta não seja a região mais adequada para o seqüenciamento devido ao alto grau de conservação do genoma neste segmento, ela permite uma boa diferenciação de genótipos e subtipos do HCV. A região 5' NCR é a mesma utilizada nos ensaios de genotipagem por LiPA (STUYVER *et al.*, 1993) e RFLP (DAVIDSON *et al.*, 1995), e tem a vantagem de empregar o mesmo produto de amplificação da PCR gerado no ensaio para detecção da viremia, diminuindo, assim, os custos laboratoriais.

No nosso trabalho, nem todas as amostras puderam ser claramente identificadas em nível de subtipo, devido ao pequeno número de posições de diferenciação na região 5' NCR. Em um estudo comparativo entre o seqüenciamento da região 5' NCR e a região NS5, GERMER *et al.* (1999) verificaram que 3,4% das amostras identificadas como 1a pela região 5' NCR foram classificadas como 1b na região NS5 e 25% das amostras classificadas como 1b pela região 5' NCR resultaram em 1a pelo

seqüenciamento da região NS5. Ainda que falhas na diferenciação dos subtipos possam ocorrer em decorrência da região escolhida para a genotipagem, este fato não invalida o método já que para fins terapêuticos é suficiente a determinação dos tipos principais (ARENS, 2001).

Em nosso experimento houve o predomínio das amostras do genótipo 1 do HCV, que é o mais encontrado na América, Europa e Ásia (TAYLOR *et al.*, 2000). OLIVEIRA M. *et al.* (1999) estudaram uma população mista constituída de doadores de sangue, portadores crônicos do HCV, usuários de drogas injetáveis, hemofílicos e hemodialisados, que por sua heterogeneidade, assemelha-se ao grupo por nós estudado. Os autores encontraram o genótipo 1 em 72%, o tipo 2 em 2% e o tipo 3 em 25,3% dos indivíduos, dados estes comparáveis aos 77,1%, 1,6% e 21,3% respectivamente verificados em nossa casuística.

Não foi possível a realização da genotipagem em todas as nossas amostras PCR positivas. No entanto, tivemos o cuidado de submeter à genotipagem todas as amostras que foram positivas na PCR dos doadores de sangue e dos pacientes crônicos, por serem os grupos com menor número de indivíduos.

Nas sete amostras de doadores de sangue por nós avaliadas, encontramos em 85,7% a presença do genótipo 1 e em 14,3% dos casos a presença do genótipo 3. Outros autores (MARTINS *et al.* 1998), estudando doadores de sangue de diversas regiões do Brasil, verificaram que 70% dos indivíduos estavam infectados com o genótipo 1, em 25,7% foi identificado o genótipo 3 e em apenas 2,9% encontrou-se o genótipo 2.

Entre nossos pacientes HIV positivos, encontramos os genótipos 1 (78,3%) e 3 (21,7%), e nenhuma amostra identificada como sendo do tipo 2. Por outro lado, em um grupo de hemofílicos do Reino Unido co-infectados com os vírus HIV/HCV, a proporção obtida foi de 70%, 13% e 14% para os genótipos 1, 2 e 3 do HCV, respectivamente (SABIN *et al.*, 1997).

Dentro do contexto até aqui apresentado, podemos verificar a presença de variações regionais ou populacionais bastante interessantes. PRATI *et al.* (1996) relatam o predomínio do genótipo 2 (44%) em doadores

de sangue da Itália, numa frequência superior à verificada pelos genótipos 1 (43%) e 3 (7,3%). FONSECA *et al.* (1998) relatam o predomínio do genótipo 3 na maioria dos pacientes avaliados por eles no estado do Rio Grande do Sul.

Em nosso estudo, encontramos o predomínio do subtipo 1b entre os pacientes crônicos, e do subtipo 1a entre os doadores de sangue e os indivíduos infectados pelo HIV. No que se refere à distribuição dos subtipos, observam-se muitas diferenças entre os diversos relatos da literatura. Entre os autores consultados, encontramos a frequência do subtipo 1a variando de 5,5 a 58%, a do subtipo 1b na faixa de 17 a 54%, a do subtipo 2a oscilando de 2,0 a 44% e a do subtipo 3a variando de 2,0 a 31%. Na maioria dos casos, os subtipos 1a e 1b foram os mais frequentes, ora com o predomínio do primeiro, ora do segundo, independentemente do tipo de população estudada, seja de pacientes crônicos, população geral ou doadores de sangue (PAWLOTSKY *et al.*, 1995; PRATI *et al.*, 1996; ZEIN *et al.*, 1996; FEUCHT *et al.*, 1997; MARTINS *et al.*, 1998; ALTER *et al.*, 1999; BASSIT *et al.*, 1999; OLIVEIRA M. *et al.*, 1999; HAUSHOFER *et al.*, 2001).

MARTINS *et al.* (1998) demonstraram a existência de variações no perfil dos genótipos circulantes nas diversas regiões do Brasil. Estudando doadores de sangue, os autores verificaram que na região nordeste ocorre o predomínio dos subtipos 1b e 3a, na região sudeste o subtipo 1b é o mais prevalente seguido do 1a, e na região centro-oeste o subtipo 1a aparece como o mais comum, seguido do subtipo 3a. Entre os doadores de sangue do Rio Grande do Sul também se observou a maior frequência do genótipo 3 (OLIVEIRA M. *et al.*, 1999). Na nossa casuística, o padrão apresentado foi o predomínio de amostras do subtipo 1a seguido do 1b.

Variações entre diferentes grupos populacionais de uma mesma localidade também são encontradas. OLIVEIRA M. *et al.* (1999) destacam, por exemplo, o elevado percentual de usuários de drogas injetáveis do Rio de Janeiro infectados com o genótipo 3, quando comparado ao grupo de doadores de sangue daquela cidade. Na nossa casuística, embora a frequência do subtipo 1b tenha sido maior entre os pacientes com hepatite

crônica do que entre os outros grupos, o pequeno número de amostras não permitiria conclusões mais enfáticas.

5. Aspectos epidemiológicos

Alguns autores procuram estabelecer uma associação entre a média de idade dos pacientes, o tempo da infecção e a forma de transmissão do vírus. Estudos realizados na Áustria, Alemanha, França e Estados Unidos relacionam a detecção do subtipo 1b em indivíduos mais velhos com a transmissão do vírus por transfusão sangüínea, e apontam para a mudança no perfil genotípico naquelas localidades, considerando o crescente aumento dos casos de infecção pelos subtipos 1a e 3a entre indivíduos mais jovens, geralmente infectados através do uso de drogas injetáveis (PAWLOTSKY *et al.*, 1995; ZEIN *et al.*, 1996; FEUCHT *et al.*, 1997; HAUSHOFER *et al.*, 2001). Evidências claras de uma alteração no perfil epidemiológico na nossa região não puderam ser demonstradas em nosso estudo, ainda que tenhamos verificado que a idade dos pacientes cronicamente infectados foi ligeiramente maior do que a dos demais indivíduos estudados, embora não estatisticamente significativo, sendo que entre eles houve um maior número de casos identificados como infecção pelo subtipo 1b e associados à transfusão sanguínea.

Em nossas observações, encontramos apenas 7,7% dos usuários de drogas injetáveis infectados pelo subtipo 3a e 53,8% infectados pelo subtipo 1a. DRIESEL *et al.* (1994) verificaram a presença significativamente maior do subtipo 3a em usuários de drogas injetáveis, atribuindo este fato ao compartilhamento de seringas e agulhas e à replicação favorável do vírus neste grupo. Na casuística de PAWLOTSKY *et al.* (1995), 63% dos usuários de drogas injetáveis encontravam-se infectados pelo subtipo 3a, o que associado à idade significativamente menor em relação aos pacientes transfundidos, levou os autores a concluir que o subtipo 3a foi introduzido na França num período mais recente do que os demais genótipos. A alteração na prevalência do HCV na Alemanha também foi apontada por

FEUCHT *et al* (1997), porém com o predomínio do subtipo 1a em usuários de drogas injetáveis.

O predomínio do subtipo 1b em indivíduos transfundidos foi descrito na Alemanha num percentual de 65%, também verificado por nós na proporção de 45,4% dos casos, seguido do subtipo 1a presente em 35% dos pacientes daquele estudo, e em 36,4% do nosso (FEUCHT *et al.*, 1997).

Embora tenhamos avaliado a freqüência dos fatores de risco em pacientes com infecção ativa, evidenciada pela PCR positiva, estes dados não foram significativamente diferentes da freqüência encontrada nos indivíduos anti-HCV reagentes, como foi verificado pela comparação entre a tabela 9 e o anexo 7 deste trabalho. A utilização dos dados provenientes apenas de indivíduos HCV-RNA positivos permitiria uma melhor análise dos resultados, com a exclusão dos casos de falso-positivos que são bastante comuns principalmente entre os doadores de sangue. Contudo, verificamos a dificuldade na comparação com dados da literatura, uma vez que em todos os trabalhos consultados a freqüência dos fatores de risco na população estudada foi avaliada sem levar em conta apenas os casos onde houve a presença do HCV-RNA.

No grupo dos indivíduos co-infectados pelos vírus HCV e HIV foi encontrado um percentual de pelo menos 50% dos indivíduos que assumiram ter comportamento sexual de risco e 52% de usuários de drogas injetáveis, sendo que destes, 88% relataram compartilhar agulhas e seringas. Este perfil concorda com as observações de OLIVEIRA M. *et al.* (1999a) realizadas em pacientes HIV soropositivos do Rio de Janeiro, onde pelo menos 70% dos indivíduos demonstraram exercer atividade sexual de alto risco e 70% dos usuários de drogas injetáveis encontravam-se infectados pelo HCV, sendo que 64% afirmaram compartilhar agulhas e seringas. O uso de drogas injetáveis também foi o principal fator de risco para a infecção pelo HCV em pacientes HIV positivos na casuística de MENDES-CORREA (2001).

Entre doadores de sangue, o número de indivíduos que relataram apresentar algum fator de risco foi bastante baixo, sendo comparável

apenas aos dados verificados na Itália (PRATI *et al.*, 1996). Esta baixa freqüência na identificação dos fatores de risco pode ter ocorrido por se tratar de um grupo de indivíduos essencialmente saudáveis, que poderiam não se recordar de fatos importantes como, por exemplo, uma transfusão de sangue na infância (SOUTO *et al.*, 1999). Um outro aspecto que poderia explicar nossos dados seria uma possível superestimação de casos devido a resultados falso-positivos na sorologia, sendo que, neste caso, seria compreensível a ausência de possíveis formas de contágio nestes pacientes.

No grupo dos pacientes crônicos, o único fator de risco identificado foi a transfusão sangüínea (50%), não se encontrando nenhum caso associado ao uso de drogas injetáveis. Estes dados, por conta do baixo número de amostras analisadas, foram diferentes da literatura consultada que relata uma freqüência de 12-47% dos pacientes infectados pelo uso de drogas injetáveis e de 21-42% pela transfusão de sangue (PAWLOTSKY *et al.*, 1995; ZEIN *et al.*, 1996; FEUCHT *et al.*, 1997; BASSIT *et al.*, 1999; HAUSHOFER *et al.*, 2001).

Quando se considerou o conjunto da nossa casuística, os nossos percentuais da presença de fatores de risco em indivíduos não infectados pelo HIV foram comparáveis aos dados populacionais apurados por SOUTO *et al.* (1999).

Encontrou-se um baixo número de indivíduos cuja fonte de infecção poderia estar associada à transfusão sangüínea quando comparado àqueles cujos fatores de risco apontam para o uso de drogas endovenosas. Este fato está em acordo com os dados registrados pelo CDC (1998) que apontam a transfusão de sangue como a principal causa de infecções ocorridas há mais de 10 anos e para o crescente número de casos associados ao uso de drogas endovenosas, que corresponde a cerca de 60% dos casos de HCV registrados nos EUA na atualidade.

Em nosso estudo foi elevado o número de pacientes que negaram a presença de qualquer fator de risco associado ao HCV. Isto ocorreu em 50% dos pacientes crônicos, enquanto na literatura verifica-se que estes

índices variam de 18-45% (PAWLOTSKY *et al.*, 1995; ZEIN *et al.*, 1996; FEUCHT *et al.*, 1997; BASSIT *et al.*, 1999; HAUSHOFER *et al.*, 2001). Em doadores de sangue encontramos 81% dos indivíduos sem causa aparente de infecção, contrastando com os valores de 66% obtidos por PRATI *et al.* (1996). Em 7,9% dos co-infectados HIV/HCV não se detectou o fator de risco relacionado à infecção pelo HCV, enquanto que na casuística de MENDES-CORREA *et al.* (2000) 5,4% dos indivíduos negaram a presença de algum fator de risco. Em um estudo populacional de uma comunidade no interior do estado do Mato Grosso, 78,9% dos indivíduos anti-HCV reagentes não apresentaram qualquer fator detectável de exposição ao vírus (SOUTO, *et al.*, 1999).

Os resultados aqui obtidos permitiram caracterizar aspectos soroepidemiológicos e laboratoriais relacionados com a infecção pelo HCV na região de Londrina, Paraná, e apontam para a importância da continuidade do estudo estabelecendo rotinas aplicadas à triagem e confirmação diagnóstica, bem como proporcionando metodologia aplicada à investigação epidemiológica do perfil virológico e acompanhamento terapêutico.

VI. CONCLUSÕES

- A frequência de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina foi de 0,8%, não se verificando diferenças associadas à idade ou sexo dos indivíduos.
- A frequência de anticorpos anti-HCV em indivíduos infectados pelo vírus HIV foi de 20,2%, sendo significativamente maior em indivíduos do sexo masculino (25,7%) do que em indivíduos do sexo feminino (13,1%).
- O índice de confirmação dos resultados anti-HCV reagentes pela PCR foi de 15,4% em doadores de sangue e de 75,6% em indivíduos HIV soropositivos.
- A média de idade dos indivíduos com sorologia anti-HCV reagente estudados foi de 35 anos, sendo que a média de idade entre os doadores de sangue foi significativamente menor do que a média de idade dos indivíduos infectados pelo HIV e dos pacientes com hepatite crônica.
- A comparação entre o grupo de indivíduos co-infectados pelos vírus HIV e HCV e o grupo infectado apenas pelo vírus HCV revelou maior frequência do uso de drogas injetáveis e da atividade sexual com múltiplos parceiros no primeiro grupo. O uso de drogas injetáveis foi relatado por 51,2% e 5,1% e a existência de múltiplos parceiros por 56,7% e 12,8% respectivamente no grupo com infecção pelo HIV e HCV e no grupo com infecção apenas pelo HCV. A frequência de indivíduos que receberam transfusão sangüínea foi semelhante em ambos os grupos, sendo de 15,0% no primeiro e de 12,8% no segundo. Não se detectou o provável fator de risco associado à

infecção em 7,9% dos indivíduos co-infectados pelo HIV e HCV e em 71,8% dos indivíduos infectados apenas pelo vírus HCV.

- O grau de positividade na PCR foi proporcional à reatividade no MEIA, sendo que 13,3% das amostras com reatividade fraca e 86,8% das amostras com reatividade forte no MEIA foram positivas na PCR. Todas as amostras positivas na PCR foram reativas pelos dois métodos imunoenzimáticos empregados (MEIA e ELISA).
- Os genótipos mais freqüentes na região de Londrina foram o 1a (42,6%), 1b (24,6%), 3a (19,7%) e 2a (1,6%). Verificou-se o predomínio do genótipo 1 em todos os grupos estudados, tanto doadores de sangue (85,7%), indivíduos HIV soropositivos (78,3%) e pacientes crônicos (62,5%). O genótipo 3 foi identificado em 14,3% dos doadores de sangue, 21,7% dos indivíduos HIV soropositivos e em 25,0% dos pacientes crônicos. O genótipo 2 foi encontrado apenas em um paciente cronicamente infectado pelo HCV (12,5%).
- Não se verificou diferença significativa entre os genótipos 1 e 3 quanto aos aspectos de sexo ou idade dos pacientes.

VII. ANEXOS

Anexo 1: Modelo do Questionário para avaliação dos fatores de risco, utilizado na entrevista com os pacientes.

QUESTIONÁRIO

PRONTUÁRIO: _____ **DATA:** ____/____/____

LOCAL: _____ **Nº** _____

<p>A1. DATA DE NASCIMENTO //</p> <p>A2. IDADE anos _____</p> <p>A3. NATURALIDADE: _____ UF: _____</p> <p>A4. SEXO 1. masculino 2. feminino</p> <p>A5. RAÇA 1. branca 4. amarela 2. negra 5. mestiço 3. parda 6. ignorado</p> <p>A6. ESTADO CIVIL 1. solteiro 2. casado ou companheiro fixo 3. divorciado 4. viúvo 5. outros _____</p> <p>A7. MUNICÍPIO ATUAL DE RESIDÊNCIA: _____</p> <p>A8. TEMPO NO MUNICÍPIO ATUAL: 1. menos de 5 anos 2. entre 5 e 10 anos 3. mais de 10 anos</p> <p>A9. ZONA 1. urbana 2. rural</p> <p>A10. MUNICÍPIO ANTERIOR DE RESIDÊNCIA: _____ (Se reside a menos de 5 anos no município atual)</p> <p>A11. ESCOLARIDADE: 1. analfabeto 4. 2º grau 2. 1ª. a 4ª. série 5. curso superior 3. 5ª. a 8ª. série 6. ignorado</p>	<p>A12. OCUPAÇÃO PRINCIPAL 1. empregado 4. recebe benefício INSS 2. autônomo 5. do lar 3. aposentado 6. desempregado</p> <p>A13. RENDIMENTO FAMILIAR MENSAL R\$,00</p> <p>A14. PESSOAS SUSTENTADAS PELO RENDIMENTO FAMILIAR</p> <p>A15. CLASSIFICAÇÃO SÓCIOECONÔMICA (ABIPEME – Associação Brasileira de Pesquisa de Mercado)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th rowspan="2">NÃO</th> <th colspan="4">TEM</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4 ou +</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TV em cores</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Rádio</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Banheiro</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Automóvel</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>4</td> <td>5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Empregada mensalista</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Aspirador de pó</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Máquina de lavar</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Vídeo-cassete</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Geladeira</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Freezer (*)</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Aparelho independente ou parte da geladeira</p> <p>Grau de instrução do chefe de família analfabeto / primário incompleto – 0 primário completo / ginásio incompleto – 1 ginásio completo / colegial incompleto – 2 colegial completo / superior incompleto – 3 superior completo – 5</p> <p>A1. 30-34 A2. 25-29 B1. 21-24 B1. 17-20 C. 11-16 D. 6-10 E. 0-5</p>		NÃO	TEM				0	1	2	3	4 ou +	TV em cores	0	2	3	4	5	Rádio	0	1	2	3	4	Banheiro	0	2	3	4	4	Automóvel	0	2	4	5	5	Empregada mensalista	0	2	4	4	4	Aspirador de pó	0	1	1	1	1	Máquina de lavar	0	1	1	1	1	Vídeo-cassete	0	2	2	2	2	Geladeira	0	2	2	2	2	Freezer (*)	0	1	1	1	1
	NÃO			TEM																																																																				
		0	1	2	3	4 ou +																																																																		
TV em cores	0	2	3	4	5																																																																			
Rádio	0	1	2	3	4																																																																			
Banheiro	0	2	3	4	4																																																																			
Automóvel	0	2	4	5	5																																																																			
Empregada mensalista	0	2	4	4	4																																																																			
Aspirador de pó	0	1	1	1	1																																																																			
Máquina de lavar	0	1	1	1	1																																																																			
Vídeo-cassete	0	2	2	2	2																																																																			
Geladeira	0	2	2	2	2																																																																			
Freezer (*)	0	1	1	1	1																																																																			

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

FATORES DE RISCO

<p>B1. CATEGORIA DE EXPOSIÇÃO (1. sim; 2. não; 3. ignorado) SEXUAL SANGUÍNEA OUTRO _____</p> <p style="text-align: center;">EXPOSIÇÃO SEXUAL</p> <p>B2. RELAÇÕES SEXUAIS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. só com mulheres 2. só com homens 3. com homens e mulheres 4. não se aplica 5. ignorado <p>B3. RELAÇÕES SEXUAIS COM INDIVÍDUOS HCV +</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">1. sim</td> <td style="width: 50%;">3. não se aplica</td> </tr> <tr> <td>2. não</td> <td>4. ignorado</td> </tr> </table> <p>B4. INFORMAÇÕES SOBRE PARCERIA SEXUAL (1. sim; 2. não; 3. ignorado) paciente com múltiplos parceiros</p> <p>parceiro(a) que mantém relações sexuais só com homens</p> <p>parceiro(a) que mantém relações sexuais só com mulheres</p> <p>parceiro(a) que mantém relações sexuais com homens e mulheres</p> <p>parceiro(a) com múltiplos parceiros</p> <p>parceiro(a) que usa drogas injetáveis</p> <p>parceiro(a) que recebeu transfusão de sangue/hemoderivados</p> <p>parceiro(a) hemofílico</p>	1. sim	3. não se aplica	2. não	4. ignorado	<p style="text-align: center;">PRÁTICA SEXUAL</p> <p>B5. IDADE DE INÍCIO DA ATIVIDADE SEXUAL</p> <p>B6. NÚMERO DE PARCEIROS (AS)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. nenhum parceiro(a) 2. um parceiro(a) 3. dois a 10 parceiro(as) 4. mais de 10 parceiros(as) 5. não quer comentar 6. ignorado <p>B7. NÚMERO DE PARCEIROS(AS) NO ÚLTIMO ANO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. nenhum 2. menos de 3 parceiros(as) 3. mais de 3 parceiros(as) 4. não quer comentar 5. ignorado <p>B8. ANTECEDENTES DE DST (HIV/aids, gonorréia, sífilis, cancro ou ferida, herpes, condiloma ou crista de galo)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim Qual? _____ 2. não 3. ignorado <p style="text-align: center;">EXPOSIÇÃO SANGUÍNEA</p> <p>B9. USO DE DROGAS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. ignorado <p>B10. TIPO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. endovenosa 2. inalatória ou medicamento 3. ambos <p>B11. QUAL DROGA</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">1. cocaína</td> <td style="width: 50%;">4. medicamento</td> </tr> <tr> <td>2. maconha</td> <td>5. vários</td> </tr> <tr> <td>3. crack</td> <td></td> </tr> </table> <p>B12. TEMPO DE USO DE DROGA ENDOVENOSA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. menos de 5 anos 2. entre 5 a 10 anos 3. mais de 10 anos 	1. cocaína	4. medicamento	2. maconha	5. vários	3. crack	
1. sim	3. não se aplica										
2. não	4. ignorado										
1. cocaína	4. medicamento										
2. maconha	5. vários										
3. crack											

<p>B13. ÚLTIMO USO DE DROGAS ENDOVENOSAS</p> <p>MÊS ANO</p> <p>B14. USO HABITUAL DE SERINGAS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sempre sozinho 2. divide com pessoa fixa 3. divide com mais de uma pessoa 4. ignorado <p>B15. DOAÇÃO DE SANGUE</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. nunca doou 2. doou 1 vez 3. doou 2 ou mais vezes 4. ignorado <p>B16. HEMOFILIA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. ignorado <p>B17. HISTÓRIA DE TRANSFUÇÃO (SANGUE / HEMODERIVADOS)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. ignorado <p>B18. NO CASO DE HAVER HISTÓRIA DE TRANSFUÇÃO</p> <p>Data: //</p> <p>Município: _____</p> <p>Instituição: _____</p> <p>B19. A TRANSFUÇÃO FOI CONSIDERADA CAUSA DA INFECÇÃO PELO HCV?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. não houve transfusão 4. investigação inconclusiva / não realizada 5. ignorado <p>B20. HEMODIÁLISE</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. menos de 1 ano 2. de 1 a 3 anos 3. mais de 3 anos 4. não se aplica <p>EXPOSIÇÃO OUTRA</p> <p>B21. TRANSMISSÃO VERTICAL (MÃE / FILHO)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. não se aplica 4. ignorado 	<p>B22. ACIDENTE DE TRABALHO EM PROFISSIONAIS DE SAÚDE COM SOROLOGIA NEGATIVA NO MOMENTO DO ACIDENTE E SOROCONVERSÃO DENTRO DOS PRIMEIROS 6 MESES</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. não se aplica 4. ignorado <p>B23. ACUPUNTURA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. ignorado <p>B24. TATUAGEM</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. ignorado <p>B25. <i>PIERCING</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim 2. não 3. ignorado <p>B26. OUTRO. QUAL? _____</p> <p>ALEITAMENTO MATERNO</p> <p>B27. AMAMENTANDO NO SEIO MATERNO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. sim, mais de 6 meses 2. sim, menos de 6 meses 3. sim, tempo ignorado 4. não 5. não se aplica <p>CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA</p> <p>B27. CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. não 2. sim <p>-tipo de bebida: _____</p> <p>-quantas vezes por semana? _____</p> <p>-quantidade ingerida por vez: _____</p> <p>MEDICAMENTOS</p> <p>B28. UTILIZA ALGUM TIPO DE MEDICAMENTO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. não 2. sim QUAL? _____ 3. Interferon
--	---

Anexo 2: Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelos pacientes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO VIRUS DA HEPATITE C NA POPULAÇÃO DE LONDRINA E REGIÃO NORTE DO PARANÁ.

Você _____ nascido em ____/____/____, documento de identidade nº _____, residente em _____, na cidade de _____, telefone _____, recebeu as informações a respeito da realização do projeto de pesquisa sobre a avaliação soropidemiológica e laboratorial da Hepatite C na população de Londrina e região norte do Paraná e declara que sente-se completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e os procedimentos aos quais será submetido. Para a realização da pesquisa será necessária a coleta de sangue. As informações e os resultados obtidos nesta pesquisa não serão utilizados para outros fins e serão mantidos sob sigilo médico. Para tanto, assine aqui o consentimento para ser incluído no estudo, assumindo o compromisso de permitir a coleta de sangue venoso periférico para a realização de testes sorológicos de triagem e confirmação para detecção de anticorpos anti-HCV, pesquisa qualitativa do RNA viral e genotipagem do vírus da Hepatite C. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de que será informado sobre os resultados dos exames realizados, de que não terá nenhum ônus e de que poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento se assim o desejar, sem restrições de qualquer espécie e sem prejuízo ao seu atendimento.

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

Londrina, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante ou responsável

Assinatura do responsável pela pesquisa
Ingridt Hidegard Vogler
Fone: 371-2321

Anexo 3: Caracterização das amostras submetidas a genotipagem do HCV, avaliadas quanto aos aspectos de sexo e idade

Genótipos	Masculino	Feminino	Total	
	N (%)	N (%)	N (%)	Idade*
1	32 (52,5)	15 (24,6)	47 (77,1)	38,0 ± 7,3
2	1 (1,6)	0 (0,0)	1 (1,6)	22,0
3	5 (8,2)	8 (13,1)	13 (21,3)	37,0 ± 6,3
Total	38 (62,3)	23 (37,7)	61 (100)	37,5 ± 7,3

* idade: média ± desvio padrão

Comparação entre os genótipos 1 e 3:

-sexo: teste exato de Fisher (p=0,063);

-idade: Kruskal-Wallis (p=0,936)

Anexo 4: Demonstração dos diferentes perfis sorológicos e moleculares encontrados nas amostras selecionadas, a partir do resultado reagente para anti-HCV pelo método MEIA, para avaliação da infecção pelo HCV.

Grupo	N	MEIA	ELISA	IB	PCR
Paciente	8	+	+	...	+
Doador	7	+	+	...	+
Doador	2	+	+
Doador	1	+	-	ind	...
Doador	1	+/-	+/-	+	-
Doador	2	+/-	+/-	Ind	-
Doador	1	+/-	+/-	...	-
Doador	1	+/-	+	Ind	...
Doador	1	+/-	-	-	-
Doador	1	+/-	-	Ind	-
Doador	17	+/-	-	...	-
Doador	2	+/-	-	-	...
Doador	1	+/-	-	Ind	...
Doador	11	+/-	-
Doador	1	+/-	-
Doador	1	+/-
HIV +	1	+	-	Ind	-
HIV +	3	+	+	+	-
HIV +	12	+	+	...	-
HIV +	90	+	+	...	+
HIV +	4	+/-	-	...	-
HIV +	7	+/-	+	...	-
HIV +	5	+/-	+	...	+
HIV +	1	+/-	+/-	Ind	-
HIV +	3	+/-	+/-	...	-
HIV +	1	+/-	+/-	...	+

N: número de amostras

MEIA e ELISA: (+) reatividade forte; (+/-); reatividade fraca; (-) não reagente.

IB: (+) positivo; (Ind) indeterminado; (-) negativo.

PCR: (+) positivo; (-) negativo.

(...): não realizado.

Anexo 5-A: Frequência de anticorpos anti-HCV na população de doadores de sangue, distribuídos por sexo e idade.

Anti-HCV em doadores de sangue						
Idade (anos)	Masculino		Feminino		Total	
	N*	(%)#	N*	(%)#	N*	(%)#
≤ 20	1/560	(0,04)	3/393	(0,21)	4/953	(0,09)
21-30	8/958	(0,30)	3/490	(0,21)	11/1448	(0,27)
31-40	4/611	(0,15)	6/317	(0,42)	10/928	(0,25)
41-50	3/356	(0,11)	3/160	(0,21)	6/516	(0,15)
51-60	1/143	(0,04)	0/56	(0,0)	1/199	(0,02)
Total	17/2628	(0,6)	15/1416	(1,1)	32/4044	(0,8)

*N: número de positivos / número indivíduos por faixa etária

#(%): porcentagem calculada em relação ao total de indivíduos por sexo

Devido à baixa frequência encontrada em algumas faixas etárias, a análise estatística foi realizada considerando os seguintes grupos de idade: < 20, 21-30, 31-40 e > 41 anos ($\chi^2=2,98$, com 3GL; $p=0,394$).

A avaliação da diferença entre os sexos foi realizada pelo teste exato de Fisher ($p=0,192$)

Anexo 5-B: Frequência de anticorpos anti-HCV em indivíduos infectados pelo HIV, distribuídos por sexo e idade.

Anti-HCV em pacientes infectados pelo HIV						
Idade (anos)	Masculino		Feminino		Total	
	N*	(%)#	N*	(%)#	N*	(%)#
≤ 20	1/4	(0,3)	0/10	(0,0)	1/14	(0,1)
21-30	19/74	(5,4)	11/87	(4,0)	30/161	(4,8)
31-40	47/163	(13,3)	15/102	(5,5)	62/265	(9,9)
41-50	20/90	(5,6)	9/58	(3,3)	29/148	(4,6)
> 51	4/23	(1,1)	1/17	(0,3)	5/40	(0,8)
Total	91/354	(25,7)	36/274	(13,1)	127/628	(20,2)

*N: número de positivos / número indivíduos por faixa etária

#(%): porcentagem calculada em relação ao total de indivíduos por sexo

Devido à baixa frequência encontrada em algumas faixas etárias, a análise estatística foi realizada considerando os seguintes grupos de idade: < 30, 31-40, 41-50 e > 51 anos ($\chi^2=3,85$, com 3GL; $p=0,277$).

A avaliação da diferença entre os sexos foi realizada pelo teste exato de Fisher ($p<0,001$)

Anexo 6: Perfil sorológico e molecular de 15 amostras submetidas ao método suplementar de detecção de anticorpos anti-HCV (immunoblot - IB)

	MEIA	ELISA	PCR	IB	core*	NS3*	NS4*	NS5*
Doador 1	+/-	-	...	Ind	0	0	4+	0
Doador 2	+/-	-	...	-	0	0	0	0
Doador 3	+/-	-	-	-	0	0	0	0
Doador 4	+/-	-	...	-	0	0	0	0
Doador 5	+/-	-	-	Ind	0	0	0	3+
Doador 6	+/-	+	...	Ind	0	2+	0	0
Doador 7	+/-	+/-	-	+	2+	+/-	0	0
Doador 8	+/-	+/-	-	Ind	0	1+	0	0
Doador 9	+/-	+/-	-	Ind	0	0	0	1+
Doador 10	+	-	...	Ind	0	0	0	3+
HIV (+) 1	+	-	-	Ind	0	0	0	3+
HIV (+) 2	+	+	-	+	4+	4+	3+	1+
HIV (+) 3	+	+	-	+	4+	2+	0	0
HIV (+) 4	+/-	+/-	-	Ind	2+	0	0	0
HIV (+) 5	+	+	-	+	3+	1+	0	0

MEIA e ELISA: (+) reatividade forte; (+/-) reatividade fraca; (-) não reagente
 PCR: (-) negativo; (...) não realizado.

IB: (+) positivo; (Ind) indeterminado; (-) negativo.

core, NS3, NS4, NS5: proteínas presentes no IB.

*A intensidade da reação foi medida em cruzes:

(4+) maior do que o controle positivo forte;

(3+) equivalente ao controle positivo forte;

(2+) maior do que o controle positivo fraco;

(1+) equivalente ao controle positivo fraco;

(+/-) banda nítida, porém mais fraca do que o controle positivo fraco;

(0) ausência de banda.

Anexo 7: Frequência dos fatores de risco associados à infecção pelo HIV entre os indivíduos infectados pelo HCV

Fator de risco	HIV (+)	HIV (-) ¹	OR	IC-95%	p
	n = 127	n = 39			
	N ² (%)	N ² (%)			
Parentera					
I					
Usuário de drogas injetáveis	65 (51,2)	2 (5,1)	19,40	4,48-83,92	<0,001
Transfusão de sangue	19 (15,0)	5 (12,8)	1,20	0,42-3,45	0,942
Sexual					
Múltiplos parceiros ³	72 (56,7)	5 (12,8)	8,90	3,27-24,25	<0,001
Homossexual masculino	15 (11,8)	0 (0,0)	-	-	-
Parceiro de usuário de droga ⁴	10 (7,9)	0 (0,0)	-	-	-
Nega algum fator de risco avaliado	10 (7,9)	28 (71,8)	0,05	0,02-0,14	<0,001

¹ doadores de sangue + pacientes crônicos

² Número de indivíduos que apresentaram o fator de risco em questão

³ mais de 10 parceiros sexuais ao longo da vida

⁴ indivíduo não usuário de droga

OR: *odds ratio*

Anexo 8: Valor Preditivo Positivo (VPP) dos testes imunoenzimáticos, avaliado pelos resultados conclusivos pelo IB e/ou pela PCR.

	MEIA > 1,0			MEIA > 1,0 + ELISA > 1,0			MEIA > 5,0			MEIA > 5,0 + ELISA > 3,0		
	VP	Total	%	VP	Total	%	VP	Total	%	VP	Total	%
Doador	8	33	24,2	8	11	72,7	7	7	100	7	7	100
HIV (+)	99	127	78,0	99	122	81,1	93	106	87,7	93	105	88,6
total	115	168	68,4	115	141	81,6	108	121	89,3	108	120	90,0

VP (verdadeiro-positivo): amostras PCR (+) e/ou IB (+)

FP (falso-positivo): amostras PCR (-) e/ou IB (-)

Total: número de amostras que atendem ao critério em avaliação, considerando-se amostras VP + FP

%: porcentagem (VPP=VP/VP+FP)

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J.I., AGUIAR, E., PANIAGO, A., CUNHA, R., GALVAO, L., DAHER, R. Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen in blood donors in the middle west region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.2, p.185-187, 2001.

AL-FALEH, F., RAMIA, S. Hepatitis C virus (HCV) infection in Saudi Arabia: a review. *Ann. Saudi Med.*, v.17, n.1, p.77-82, 1997.

ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*, v.26, n.3, suppl.1, p.62s-65s, 1997.

ALTER, M.J., KRUSZON-MORAN, D., NAINAN, O.V., MCQUILLAN, G.M., GAO, F., MOYER, L.A., KASLOW, R.A., MARGOLIS, H.S. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N. Engl. J. Med.*, v.341, n.8, p.556-562, 1999.

ALTER, H.J., SEEFF, L.B. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin. Liver Dis.*, v.20, n.1, p.17-35, 2000.

ARENS, M. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV and HIV. *J. Clin. Virol.*, v.22, p.11-29, 2001.

BASSIT, L., DA SILVA, L.C., RIBEIRO-DOS-SANTOS, G., MAERTENS, G., CARRILHO, F.J., FONSECA, L.E.P., ALVES, V.A.F., GAYOTTO, L.C.C., PEREIRA, A.N., TAKEI, K., CHAMONE, D., SÁEZ-ALQUÉZAR, A. Chronic hepatitis C virus infections in Brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v.41, n.3, p.183-189,

1999.

BELD, M., PENNING, M., VAN PUTTEN, M., VAN DEN HOEK, A., LUKASHOV, V., MCMORROW, M., GOUDSMIT, J. Hepatitis C virus serotype-specific core and NS4 antibodies in injecting drug users participating in the Amsterdam cohort studies. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.10, p.3002-3006, 1998.

BERNIER, L., WILLEMS, B., DELAGE, G., MURPHY, D.G. Identification of numerous hepatitis C virus genotypes in Montreal, Canada. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, n.11, p.2815-2818, 1996.

BOVET, P., YERSIN, C., HERMINIE, P., LAVANCHY, D., FREI, P.C. Decrease in the prevalence of hepatitis B and a low prevalence of hepatitis C virus infections in the general population of the Seychelles. *Bull. WHO*, v.77, n.11, p.923-928, 1999.

BUTSASHVILI, M., TSERTSVADZE, T., MCNUTT, L.A., KAMKAMIDZE, G., GVETADZE, R., BADRIDZE, N. Prevalence of hepatitis B, hepatitis C, syphilis and HIV in Georgian blood donors. *Eur. J. Epidemiol.*, v.17, n.7, p.693-695, 2001.

CANDOTTI, D., MUNDY, C., KADEWELE, G., NKHOMA, W., BATES, I., ALLAIN, J.P. Serological and molecular screening for viruses in blood donors from Ntcheu, Malawi: high prevalence of HIV-1 subtype C and of markers of hepatitis B and C viruses. *J. Med. Virol.*, v.65, n.1, p.1-5, 2001.

CARNEIRO, M.A.S., MARTINS, R.M.B., TELES, S.A., SILVA, S.A., LOPES, C.L., CARDOSO, D.D.P., VANDERBORGHT, B.O.M., YOSHIDA, C.F.T. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.96, n.6, p.765-769, 2001.

CARVALHO, S.P., DIAS, S.L.N.G. Estudo comparativo da taxa de incidência de sífilis, doença de Chagas, hepatites B e C, HIV e HTLV, em doadores de sangue por região do Paraná. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.27, n.3, p.77-82, 1995.

CASPARI, G., GERLICH, W.H., BEYER, J., SCHMITT, H. Non-specific and specific anti-HCV results correlated to age, sex, transaminase, rhesus blood group and follow-up in blood donors. *Arch. Virol.*, v.142, p.473-489, 1997.

CATALAN-SOARES, B.C., ALMEIDA, R.T.P., CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Prevalence of HIV-1/2, HTLV-I/II, hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), *Treponema pallidum* and *Trypanosoma cruzi* among prison inmates at Manhuaçu, Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, n.1, p.27-30, 2000.

CD SUMMARY. CENTER FOR DISEASE PREVENTION & EPIDEMIOLOGY. OREGON HEALTH DIVISION. HCV update: testing and treatment. 2000. Disponível em: <http://www.dhs.state.or.us/publichealth/cdsummary/2000/ohd4916.pdf>. Acesso em : 15 novembro 2001.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.A., Georgia, Atlanta). Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) and HCV-related chronic disease. *MMWR* 47 (No. RR-19):1-39, 1998.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.A., Georgia, Atlanta). Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR* 52 (No. RR-3):1-16, 2003.

- CHOO, Q.L., KUO, G., WEINER, A.J., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W., HOUGHTON, M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne nonA, nonB viral hepatitis genome. *Science*, v.244, p.359-362, 1989.
- COELHO, H.S.M., FIGUEIREDO, F.A.F., SEGADAS, J.A., PANAIM, V.L., NOGUEIRA, C.M., SILVA, C.R., MUSSI, T.J. Aspectos evolutivos da hepatite C pós-transfusional. Revisão de 175 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.31, n.3, p.295-300, 1998.
- DAVIDSON, F., SIMMONDS, P., FERGUSON, J.C., JARVIS, L.M., DOW, B.C., FOLLETT, E.A.C., SEED, C.R.G., KRUSIUS, T., LIN, C., MEDGYESI, G.A., KIYOKAWA, H., OLIM, G., DURAISAMY, G., CUYPERS, T., SAEED, A.A., TEO, D., CONRADIE, J., KEW, M.C., LIN, M., NUCHAPRAYOON, C., NDIRIMBIE, O.K., YAP, P.L. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J. Gen. Virol.*, v.76, p.1197-1204, 1995.
- DEN BRINKER, M., WIT, F.W.N.M., DILLEN, P.M.E.W., JURRIAANS, S., WEEL, J., LEEUWEN, R., PAKKER, N.G., REISS, P., DANNER, S.A., WEVERLING, G.J., LANGE, J.M.A. Hepatitis B and C virus co-infection and the risk for hepatotoxicity of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Aids*, v.14, n.18, p.2895-2902, 2000.
- DIENSTAG, J.L. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology*, v.26, n.3, suppl.1, p.66s-70s, 1997.
- DIETERICH, D.T. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in coinfection. *Am. J. Med.*, v.107, n.6B, p.79S-84S, 1999.
- DIETERICH, D.T., SULKOWSKI, M.S. Expert perspectives: Strategies for

the management of HIV/HCV coinfection II, 2001. Disponível em: <http://www.projectsinknowledge.com/hiv-hcv/index.html> . Acesso em: 19 agosto 2001.

DRIESEL, G., WIRTH, D., STARK, K., BAUMGARTEN, R., SUCKER, U., SCHREIER, E. Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region. *Arch. Virol.*, v.139, p.379-388, 1994.

DUNN, O.J. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, v.6, p.241-252, 1964.

ERENSOY, S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *J. Clin. Virol.*, v.21, p.271-281, 2001.

FARCI, P., ALTER, H.J., GOVINDARAJAN, S., WONG, D.C., ENGLE, R., LESNIEWSKI, R.R., MUSHAHWAR, I.K., DESAI, S.M., MILLER, R.H., OGATA, N., PURCELL, R.H. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*, v.258, p.135-140, 1992.

FARCI, P., PURCELL, R.H. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin. Liver Dis.*, v.20, n.1, p.103-126, 2000.

FEUCHT, H.H., SCHRÖTER, M., ZÖLLNER, B., POLYWKA, S., NOLTE, H., LAUFS, R. The influence of age on the prevalence of hepatitis C virus subtypes 1a and 1b. *J. Infect. Dis.*, v.175, p.685-688, 1997.

FOCACCIA, R., CONCEIÇÃO, O.J.G., SETTE Jr, H., SABINO, E., BASSIT, L., NITRINI, D.R., LOMAR, A.V., LOURENÇO, R., SOUZA, F.V., KIFFER, C.R.V., SANTOS, E.B., GONZALES, M.P., SÁEZ-ALQUÉZAR, A., RISCAL, J.R., FISCHER, D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the

general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.2, n.6, p.269-284, 1998.

FONSECA, A.S.K., LUNGE, V.R., IKUTA, N., CHEINQUER, H. Prevalência de genótipos do vírus da hepatite C no estado do Rio Grande do Sul. *NewsLab*, v.27, p.62-64, 1998.

FUSCONI, M., LENZI, M., BALLARDINI, G., MINERO, R., CASSIANI, F., ZAULI, D., BIANCHI, F.B. Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Lancet*, v.336, p.823, 1990.

GARG, S., MATHUR, D.R., GARG, D.K. Comparison of seropositivity of HIV, HBV, HCV and syphilis in replacement and voluntary blood donors in western India. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, v.44, n.4, p.409-412, 2001.

GERMER, J.J., RYS, P.N., THORVILSON, J.N., PERSING, D.H. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.8, p.2625-2630, 1999.

GERMER, J.J., ZEIN, N. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. *Mayo Clin. Proc.*, v.76, n.9, p.911-920, 2001.

GERVAIS, A., MARTINOT, M., BOYER, N., AUPERIN, A., LE BRETON, V., DEGOTT, C., VALLA, D., MARCELLIN, P. Quantitation of hepatic hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. Relation with severity of disease, viral genotype and response to treatment. *J. Hepatol.*, v.35, p.399-405, 2001.

GHAVANINI, A.A., SABRI, M.R. Hepatitis B surface antigen and

anti-hepatitis C antibodies among blood donors in the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr. Health J.*, v.6, n.5/6, p.1114-1116, 2000.

GINABREDA, M.G.P., YOSHIDA, C.F.T., NIEL, C. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.30, n.3, p.339-345, 1997.

GONÇALES, N.S.L., COSTA, F.F., VASSALLO, J., GONÇALES JR., F.L. Diagnosis of hepatitis C virus in Brazilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: comparison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.42, n.5, p.263-267, 2000.

GONÇALES JR, F.L., BOCCATO, R.S.B.S., PEDRO, R.J., PAPAORDANOU, P.M.O., SOUZA, C.A., GONÇALES, N.S.L., PELEGRINO-JUNIOR, J. Prevalências do HbsAg, do anti-HBc e do anti-HCV na população de candidatos a doadores de sangue do Hemocentro-Campinas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.35, n.1, p.45-51, 1993.

GONÇALES JR, F.L., STUCCHI, R.S.B., PAPAORDANOU, P.M.O., PAVAN, M.H.P., GONÇALES, N.S.L., PINHO, J.R.R. Elevated alanine aminotransferase (ALT) in blood donors: an assessment of the main associated conditions and its relationship to the development of hepatitis C. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.40, n.4, p.219-224, 1998.

GONÇALES JR, F.L., STUCCHI, R.S.B., PAVAN, M.H.P., ESCANHOELA, C.A.F., YAMANAKA, A., MAGNA, L.A., GONÇALES, N.S.L. A clinical, epidemiological, laboratorial, histological and ultrasonographical evaluation of anti-HCV EIA-2 positive blood donors. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.42, n.3, p.147-152, 2000.

- GÓNGORA, D.V.N. Marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da hepatite C em trabalhadores e pacientes da Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.31, n.6, p.585-586, 1998.
- GOUBAU, P., REYNDERS, M., BEUSELINCK, K., NEVENS, F., PEERLINCK, K., DESMYTER, J. Confirmatory strategy of hepatitis C serology based on two screening assays in a diagnostic setting. *Acta Clin. Belg.*, v.52, n.1, p.31-35, 1997.
- GRAHOVAC, B., BINGULAC-POPOVIC, J., VUCELIC, B., HRSTIC, I., OSTOJIC, R., DRAZIC, V., BALIJA, M., GRGICEVIC, D. Dynamics of serum hepatitis C virus load and quasispecies complexity during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Clin. Virol.*, v.20, p.85-89, 2001.
- GRETCH, D., LEE, W., COREY, L. Use of aminotransferase, hepatitis C antibody, and hepatitis C polymerase chain reaction RNA assays to establish the diagnosis of hepatitis C virus infection in a diagnostic virology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, n.8, p.2145-2149, 1992.
- GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology*, v.26, n.3, suppl.1, p.43s-47s, 1997.
- H Aidar, N.A. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C in blood donors and high risk groups in Hajjah, Yemen Republic. *Saudi Med. J.*, v.23, n.9, p.1090-1094, 2002.
- HALFON, P., TRIMOULET, P., BOURLIERE, M., KHIRI, H., DE LÉDINGHEN, V., COUZIGOU, P., FERYN, J.M., ALCARAZ, P., RENOU, C., FLEURY, H.J.A., OUZAN, D. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.5,

p.1771-1773, 2001.

HAUSHOFER, A.C., KOPTY, C., HAUER, R., BRUNNER, H., HALBMAYER, W.M. HCV genotypes and age distribution in patients of Vienna and surrounding areas. *J. Clin. Virol.*, v.20, p.41-47, 2001.

HEPCNET. HEPATITIS C RESOURCES & SUPPORT. 2002. Disponível em: http://www.hepcnet.net/serologic_tests.html . Acesso em: 13 agosto 2002.

HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*, v.26, n.3, suppl.1, p.15s-20s, 1997.

HOOFNAGLE, J.H., DI BISCEGLIE, A.M. Drug therapy: the treatment of chronic viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, v.336, n.5, p.347-356, 1997.

ICARDI, G., ANSALDI, F., BRUZZONE, B.M., DURANDO, P., LEE, S., LUIGI, C., CROVARI, P. Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J. Clin. Microbiol.* v.39, n.9, p.3110-3114, 2001.

KAKUMU, S., MATSUSHIMA, T., SATO, S., KOBAYASHI, K., KIYOSAWA, K., HAYASHI, N., TSUJI, T., SATA, M., ORIGASA, H., IINO, S., AND RAM STUDY GROUP. Serum HCV RNA levels during early phase of recombinant interferon alfa-2a (Roferon A) therapy for chronic hepatitis C and efficacy of short-term therapy with earlier loss of viremia. *Hepatol. Res.*, v.22, p.152-160, 2002.

KHATTAK, M.F., SALAMAT, N., BHATTI, F.A., QURESHI, T.Z. Seroprevalence of hepatitis B, C and HIV in blood donors in northern Pakistan. *J. Pak. Med. Assoc.*, v.52, n.9, p.398-402, 2002.

- KIM, O., KIM, S.S., PARK, M.S., SUH, S.D., LEE, M.W., KIM, K.S., YOON, J.D., LEE, J.S. Seroprevalence of sexually transmitted viruses in Korean populations including HIV-seropositive individuals. *Int. J. STD AIDS*, v.14, n.1, p.46-49, 2003.
- KIYOSAWA, K., SODEYAMA, T., TANAKA, E., GIBO, Y., YOSHIZAWA, K., NAKANO, Y., FURUTA, S., AKAHANE, Y., NISHIOKA, K., PURCELL, R.H. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*, v.12, p.671-675, 1990.
- KRAMER, M.S., FEINSTEIN, A.R. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.29, n.1, p.111-123, 1981.
- LAU, J.Y.N., SIMMONDS, P., URDEA, M.S. Implications of variations of "conserved" regions of hepatitis C virus genome. *Lancet*, v.346, p.425-426, 1995.
- LEE, S.R., PETERSON, J., NIVEN, P., BAHL, C., PAGE, E., DELEYS, R., GIORDANO-SCHMIDT, D., BAGGETT, D., GREEN, G. Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for identification of 'window-phase' blood donations. *Vox Sang.* v.80, n.1, p.19-23, 2001.
- LUKSAMIJARULKUL, P., THAMMATA, N., TILOKLURS, M. Seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus among blood donors, Phitsanulok Regional Blood Center, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v.33, n.2, p.272-279, 2002.
- MAHANEY, K., TEDESCHI, V., MAERTENS, G., DI BISCEGLIE, A.M., VERGALLA, J., HOOFNAGLE, J.H., SALLIE, R. Genotypic analysis of

hepatitis C virus in American patients. *Hepatology*, v.20, n.6, p.1405-1411, 1994.

MARTINS, R.M.B., VANDERBORGHT, B.O.M., ROUZERE, C.D., SANTANA, C.L., SANTOS, C.O., MORI, D.N., FERREIRA, R.G., YOSHIDA, C.F.T. Anti-HCV related to HCV PCR and risk factors analysis in a blood donor population of central Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.36, n.6, p.501-506, 1994.

MARTINS, R.M.B., VANDERBORGHT, B.O.M., ROUZERE, C., CARDOSO, D.D.P., AZEVEDO, M.S.P., YOSHIDA, C.F.T. Anti-HCV prevalence and risk factors analysis in pregnant women in central Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.90, n.1, p.11, 1995.

MARTINS, R.M.B., VANDERBORGHT, B.O.M., YOSHIDA, C.F.T. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, n.3, p.299-300, 1998.

MCHUTCHISON, J.G., GORDON, S.C., SCHIFF, E.R., SHIFFMAN, M.L., LEE, W.M., RUSTGI, V.K., GOODMAN, Z.D., LING, M.H., CORT, S., ALBRECHT, J.K., AND THE HEPATITIS INTERVENTIONAL THERAPY GROUP. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.*, v.339, n.21, p.1485-1492, 1998.

MENDES-CORRÊA, M.C.J., BARONE, A.A., CAVALHEIRO, N.P., TENGAN, F.M., GUASTINI, C. Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.42, n.2, p.81-85, 2000.

MENDES-CORRÊA, M.C., BARONE, A.A., GUASTINI, C.. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. *Rev.*

Inst. Med. Trop. Sao Paulo, v.43, n.1, p.15-19, 2001.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). PORTARIA No. 1376. 1993.
Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1376-93.pdf>.
Acesso em: 15 outubro 2002.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). PORTARIA No. 639. 2000.
Disponível em: http://br.geocities.com/hepatite_c/port639.htm . Acesso
em: 29 dezembro 2001.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Resolução da Diretoria Colegiada -
RDC No. 343. 2002. Disponível em:
http://www.hemonline.com.br/resolucao_343.pdf . Acesso: 01 março
2003.

NAGHETTINI, A.V., DAHER, R.R., MARTIN, R.M.B., DOLES, J.,
VANDERBORGHT, B., YOSHIDA, C.F.T., ROUZERE, C.
Soroprevalência do vírus da hepatite C na população em diálise de
Goiânia, GO. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, n.2, p.113-117, 1997.

NAKAMUTA, M., SHIMOHASHI, N., TADA, S., KINUKAWA, N., ENJOJI, M.,
UCHIMURA, K., MOTOMURA, K., SUGIMOTO, R., KATO, M.,
IWAMOTO, H., KUNIYOSHI, M., SAKAI, H., NAWATA, H. Serum levels
of HCV RNA and core protein before and after incubation at 37°C for
24h. *Hepatol. Res.*, v.19, p.254-262, 2001.

NIH. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. CONSENSUS DEVELOPMENT
CONFERENCE STATEMENT. MANAGEMENT OF HEPATITIS C. 1997.
Disponível em:
http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/105/105_statement.htm Acesso
em: 03 janeiro 2002.

NIH. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT. MANAGEMENT OF HEPATITIS C. 2002.

Disponível em: <http://consensus.nih.gov/cons/116/Hepc091202.pdf>

Acesso em: 05 abril 2003.

OLIVEIRA, L.C.M., BUSO, A.G., OLIVEIRA, A.T.R., ARANTES, C.A., BORGES, L.V., VALENTE, S.R.G. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C markers in alcoholics with and without clinically evident hepatic cirrhosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.41, n.2, p.69-73, 1999.

OLIVEIRA, L.C.M., PEREIRA, R.G., REIS, U.C. Prevalence of human immunodeficiency virus infection in alcoholics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.1, p.21-23, 2001.

OLIVEIRA, M.L.A., BASTOS, F.I., SABINO, R.R., PAETZOLD, U., SCHREIER, E., PAULI, G., YOSHIDA, C.F.T. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.3, p.279-282, 1999.

OLIVEIRA, M.L.A., BASTOS, F.I., TELLES, P.R., YOSHIDA, C.F.T., SCHATZMAYR, H.G., PAETZOLD, U., PAULI, G., SCHREIER, E. Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.9, p.1107-1114, 1999a.

OPRAVIL, M., HUNZIKER, R., LUTHY, R., GROB, P.J. Chronic hepatitis B and C in HIV-infected patients *Dtsch. Med. Wochenschr.*, v.123, n.24, p.753-760, 1998.

OSOBA, A.O., IBRAHIM, M., ABDELAAL, M.A., AL-MOWALLAD, A., AL SHAREEF, B., AL-HAJ-HUSSEIN, B. Hepatitis C virus genotyping by polymerase chain reaction and DNA enzyme immunoassay among Saudi

patients in the western province, Saudi Arabia. *Ann. Saudi Med.*, v.20, n.5/6, p.394-397, 2000.

OWNBY, H.E., KORELITZ, J.J., BUSCH, M.P., WILLIAMS, A.E., KLEINMAN, S.H., GILCHER, R.O., NOURJAH, P., AND THE RETROVIRUS EPIDEMIOLOGY DONOR STUDY. Loss of volunteer blood donors because of unconfirmed enzyme immunoassay screening results. *Transfusion*, v.37, p.199-205, 1997.

PAROLIN, M.B., RUSSO, A.A., ALMEIDA, P.T., BALDANZI, G.R., LOPES, R.W. Multicenter study on the prevalence of hepatitis C virus infection in blood donors in the city of Curitiba, Brazil. *Arq. Gastroenterol.*, v.36, n.3, p.117-121, 1999.

PATIÑO-SARCINELLI, F., HYMAN, J., CAMACHO, L.A.B., LINHARES, D.B., AZEVEDO, J.G. Prevalence and risk factors for hepatitis C antibodies in volunteer blood donors in Brazil. *Transfusion*, v.34, n.2, p.138-141, 1994.

PAWLOTSKY, J.M., TSAKIRIS, L., ROUDOT-THORAVAL, F., PELLET, C., STUYVER, L., DUVAL, J., DHUMEAUX, D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.*, v.171, p.1607-1610, 1995.

POYNARD, T., MARCELLIN, P., LEE, S.S., NIEDERAU, C., MINUK, G.S., IDEO, G., BAIN, V., HEATHCOTE, J., ZEUZEM, S., TREPO, C., ALBRECHT, J., FOR THE INTERNATIONAL HEPATITIS INTERVENTIONAL THERAPY GROUP. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet*, v.352, p.1426-1432, 1998.

PRATI, D., CAPELLI, C., ZANELLA, A., MOZZI, F., BOSONI, P.,

- PAPPALETTERA, M., ZANUSO, F., VIANELLO, L., LOCATELLI, E., DE-FAZIO, C., RONCHI, G., DEL-NINNO, E., COLOMBO, M., SIRCHIA, G. Influence of different hepatitis C virus genotypes on the course of asymptomatic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, v.110, n.1, p.178-183, 1996.
- PUIG-BASAGOITI, F., CABANA, M., GUILERA, M., GIMENEZ-BARCONS, M., SIRERA, G., TURAL, C., CLOTET, B., SANCHEZ-TAPIAS, J.M., RODES, J., SAIZ, J.C., MARTINEZ, M.A. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v.23, n.1, p.89-94, 2000.
- REICHE, E.M.V., MORIMOTO, H.K., FARIAS, G.N., HISATSUGU, K.R., GELLER, L., GOMES, A.C.L.F., INOUE, H.Y., RODRIGUES, G., MATSUO, T. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, n.6, p.519-527, 2000.
- REICHE, E.M.V., VOGLER, I.H., MORIMOTO, H.K., BORTOLIERO, A.L., MATSUO, T., YUAHASI, K.K., CANCIAN, S.J., KOGUICHI, R.S. Evaluation of surrogate markers for human immunodeficiency virus infection among blood donors at the blood bank of "Hospital Universitário Regional Norte do Paraná", Londrina, PR, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.45, n.1, p.23-27, 2003.
- SABIN, C.A., TELFER, P., PHILLIPS, A.N., BHAGANI, S., LEE, C.A. The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic

men. *J. Infect. Dis.*, v.175, p.164-168, 1997.

SCHIFF, E.R., DE MEDINA, M., KAHN, R.S. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin. Liver Dis.*, v.19, suppl.1, p.3-15, 1999.

SCHMIDT, W.N., WU, P., HAN, J., PERINO, M.J., LABRECQUE, D.R., STAPLETON, J.T. Distribution of hepatitis C virus (HCV) RNA in whole blood and blood cell fractions: plasma HCV RNA analysis underestimates circulating virus load. *J. Infect. Dis.*, v.176, p.20-26, 1997.

SCHRÖTER, M., ZÖLLNER, B., SCHÄFER, P., LAUFS, R., FEUCHT, H.H. Comparison of three HCV genotyping assays: a serological method as a reliable and inexpensive alternative to PCR based assays. *J. Clin. Virol.*, v.23, p.57-63, 2001.

SEEFF, L.B. Natural history of hepatitis C. *Hepatology*, v.26, n.3, suppl.1, p.21S-28S, 1997.

SHUKLA, D.D., HOYNE, P.A., WARD, C.W. Evaluation of complete genome sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch. Virol.*, v.140, p.1747-1761, 1995.

SIMMONDS, P., ALBERTI, A., ALTER, H.J., BONINO, F., BRADLEY, D.W., BRECHOT, C., BROUWER, J.T., CHAN, S.W., CHAYAMA, K., CHEN, D.S., CHOO, Q.L., COLOMBO, M., CUYPERS, H.T.M., DATE, T., DUSHEIKO, G.M., ESTEBAN, J.I., FAI, O., HADZIYANNIS, S.J., HAN, J., HATZAKIS, A., HOLMES, E.C., HOTTA, H., HOUGHTON, M., IRVINE, B., KOHARA, M., KOLBERG, J.A., KUO, G., LAU, J.Y.N., LELIE, P.N., MAERTENS, G., McOMISH, F., MIYAMURA, T., MIZOKAMI, M., NOMOTO, A., PRINCE, A.M., REESINK, H.W., RICE, C., ROGGENDORF, M., SCHALM, S.W., SHIKATA, T., SHIMOTOHNO, K., STUYVER, L., TRÉPO, C., WEINER, A., YAP, P.L., URDEA, M.S. A

proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, v.19, n.5, p.1321-1324, 1994.

SMITH, D.B., PATHIRANA, S., DAVIDSON, F., LAWLOR, E., POWER, J., YAP, P.L., SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J. Gen. Virol.*, v.78, p.321-328, 1997.

SOUTO, F.J.D., FONTES, C.J.F., MARTELLI, C.M.T., TURCHI, M.D., MARTINS, R.M.B., ANDRADE, A.L.S.S. Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, n.6, p.719-723, 1999.

SOUTO, F.J.D., RIBEIRO, L.C., PERAZOLO, G.F., FORTES, H.M., SALDANHA, A.A. Imunoblot como teste suplementar para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C em doadores de sangue. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, n.1, p.69-71, 2002.

STRAUSS, E. Hepatite C. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.1, p.69-82, 2001.

STUYVER, L., ROSSAU, R., WYSEUR, A., DUHAMEL, M., VANDERBORGHT, B., HEUVERSWYN, H.V., MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.1093-1102, 1993.

SULKOWSKI, M.S., THOMAS, D.L., CHAISSON, R.E., MOORE, R.D. Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in adults infected with human immunodeficiency virus and the role of hepatitis C and B virus infection. *Jama*, v.283, p.74-80, 2000.

TAMIM, H., IRANI-HAKIME, N., AOUN, J.P., KHOURY, S., SAMAHA, H., ALMAWI, W.Y. Seroprevalence of hepatitis C virus (HCV) infection

- among blood donors: a hospital-based study. *Transfus. Apheresis Sci.*, v.24, n.1, p.29-35, 2001.
- TAYLOR, D.R., SHI, S.T., LAI, M.M.C. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes Infect.*, v.2, p.1743-1756, 2000.
- TENGAN, F.M., ELUF-NETO, J., CAVALHEIRO, N.P., BARONE, A.A. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.43, n.3, p.133-137, 2001.
- THELU, M., BAUD, M., LEROY, V., SEIGNEURIN, J., ZARSKI, J. Dynamics of viral quasispecies during interferon therapy in non responder chronic hepatitis C patients. *J. Clin. Virol.*, v.22, p.125-131, 2001.
- TONG, M.J., EL-FARRA, N.S., REIKES, A.R., CO, R.L. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N. Engl. J. Med.*, v.332, n.22, p.1463-1466, 1995.
- TOVO, P.A., PALOMBA, E., FERRARIS, G., PRINCIPI, N., RUGA, E., DALLACASA, P., MACCABRUNI, A., and Italian Study Group for HCV Infection in Children. Increased risk of maternal-infant hepatitis C virus transmission for women coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis.*, v.25, p.1121-1124, 1997.
- TREITINGER, A., SPADA, C., FERREIRA, L.A., NETO, M.S., REIS, M., VERDI, J.C., MIRANDA, A.F., OLIVEIRA, O.V., SILVEIRA, M.V.D.S., ABDALLA, D.S. Hepatitis B and hepatitis C prevalence among blood donors and HIV-1 infected patients in Florianópolis - Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.4, n.4, p.192-196, 2000.
- URDEA, M.S., WUESTEHUBE, L.J., LAURENSEN, P.M., WILBER, J.C. Hepatitis C - diagnosis and monitoring. *Clin. Chem.*, v.43, n.8(B),

p.1507-1511, 1997.

VAN DER POEL, C.L., REESINK, H.W., SCHAASBERG, W., LEENTVAAR-KUYPERS, A., BAKKER, E., EXEL-OEHLERS, P.J., LELIE, P.N. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet*, v.335, p.558-560, 1990.

VANDERBORGHT, B.O.M., ROUZERE, C., GINUINO, C.F., MAERTENS, G., VAN HEUVERSWYN, H., YOSHIDA, C.F.T. High prevalence of hepatitis C infection among Brazilian hemodialysis patients in Rio de Janeiro: a one-year follow-up study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.37, n.1, p.75-79, 1995.

VARDAS, E., SITAS, F., SEIDEL, K., CASTELING, A., SIM, J. Prevalence of hepatitis C virus antibodies and genotypes in asymptomatic, first-time blood donors in Namibia. *Bull. WHO*, v.77, n.12, p.965-972, 1999.

VIEIRA, S. *Introdução à Bioestatística*. 3.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1980. 195p.

VIEIRA, S. *Bioestatística: tópicos avançados*. Rio de Janeiro: Campus, 2003. 212p.

VIVAS-ARCEO, C., BENAVIDES, S.A., TRUJILLO, J.J., PANDURO, A., RIVAS-ESTILLA, A.M. Hepatitis C virus: prevalence and routes of infection among blood donors of West Mexico. *Hepatol. Res.*, v.25, n.2, p.115-123, 2003.

WASLEY, A., ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin. Liver Dis.*, v.20, n.1, p.1-16, 2000.

WHO AND THE VIRAL HEPATITIS PREVENTION BOARD. Global surveillance and control of hepatitis C. *J. Viral Hepat.*, v.6, p.35-47, 1999.

WHO INFORMATION. FACT SHEET No. 164. 2000. Disponível em: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact164.html> . Acesso em: 07 outubro 2001.

ZEIN, N.N., RAKELA, J., KRAWITT, E.L., REDDY, R., TOMINAGA, T. PERSING, D.H. and the Collaborative Study Group. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Ann. Intern. Med.*, v.125, n.8, p.634-639, 1996.

ZEIN, N.N., PERSING, D.H. Hepatitis C genotypes: current and future implications. *Mayo Clin. Proc.*, v.71, n.5, p.458-462, 1996.

ZERVOU, E.K., BOUMBA, D.S., LIASKOS, C., GEORGIADOU, S., TSIANOS, E.V., DALEKOS, G.N. Low prevalence of HCV, HIV, and HTLV-I/II infection markers in northwestern Greece: results of a 3-year prospective donor study (1995-1997). *Eur. J. Intern. Med.*, v.14, n.1, p.39-44, 2003.