

Neiva Sellan Lopes Gonçales

*Hepatite C em doadores de sangue: Diagnóstico por
transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
e sua correlação com os testes imunoenzimático e
“immunoblot” recombinante*

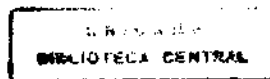
*Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Anatomia Patológica, da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências, área de Anatomia Patológica.*

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Co-orientador: Prof. Dr. José Vassallo

Campinas

1997



UNIDADE	73C
N.º CHAMADA:	
V.º	
PREÇO	32544
DATA	395/98
N.º CPD	
	C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/98
N.º CPD	

CM-00104534-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G587h
Gonçales, Neiva Sellan Lopes
Hepatite C em doadores de sangue : Diagnóstico pela reação de transição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT- PCR) e sua correlação com os testes imunoenzimático (EIA) e imunoblot recombinante (RIBA) / Neiva Sellan Lopes Gonçales. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientadores : Fernando Ferreira Costa e José Vassalo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

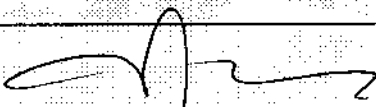
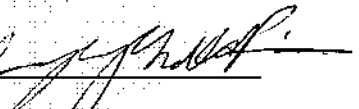
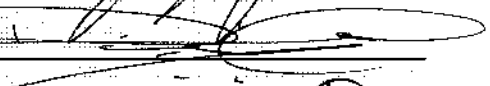
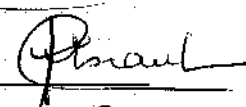
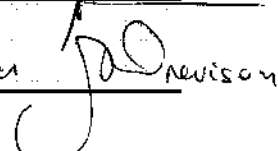
1. Hepatite C - virus. 2. Sangue - transfusão - Complicações. 3. Hepatite - crônica ativa. I. Fernando Ferreira Costa. II. José Vassalo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Co-orientador: Prof. Dr. José Vassallo

Membros:

1. PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA 
2. PROF. DR. DAÓ RENATO REBELLO PINHO 
3. PROF. DR. GIMAS TADEU COVAS 
4. PROF. DRA. CECÍLIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOVA 
5. PROF. DRA. MIRIAN APARECIDA DA SILVA DE LISAU 

Curso de pós-graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/10/97

*A Cesar Arno (in memoriam) e Nêide, meus pais,
por me ensinarem a importância de escolher os caminhos,*

*Ao Fernando,
por participar dessa escolha e me ajudar a trilhá-los,*

*À Janaina, Fernando Cesar e Eduardo,
por representarem o nosso maior e mais amplo caminho.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste estudo só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha imensa gratidão a todas e de forma particular

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, orientador, pelo apoio, confiança e pela forma paciente e dedicada de transmitir seus conhecimentos e experiências, contribuindo muito para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, co-orientador, pela confiança e apoio, pela amizade e pelas discussões e sugestões sempre pertinentes e enriquecedoras, que muito contribuíram para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Junior, enquanto coordenador do Grupo de Estudos das Hepatites, pelo incentivo e apoio irrestrito, pelo levantamento dos dados clínicos e epidemiológicos e principalmente pelo carinho e competência com que sempre participou de todas as etapas deste estudo.

À Prof.^a Dra Cecília Amélia Escanhoela, pela atenção, amizade e pelo auxílio no levantamento dos dados histopatológicos.

À Cirlene, Luzia, Maria Emilia, Giane, Midori, Carmem, Maira, Daniel, Vitor, Graziela, Célia, Zilda e Mariano, equipe do Laboratório de Sorologia do Hemocentro da Unicamp, pelo carinho, respeito, amizade e principalmente pela convivência harmoniosa e cooperativa, importantes para a realização deste trabalho.

Ao biólogo Ronald Jorge Menghini dos Santos, Laboratório de Sorologia do Hemocamp, pelo auxílio na execução dos testes de RIBA.

À pesquisadora Silvana Bordin, pelo apoio, amizade e ajuda inestimáveis em todas as fases deste trabalho.

Aos biólogos Eliana Nogueira e Carlos Grignoli, pela colaboração, atenção e carinho sempre demonstrados.

Aos colegas do Grupo de Estudos das Hepatites, em especial à Prof. Dra Raquel Silveira Bello Stucchi Boccato, Dra Maria Helena Postal Pavan, à enfermeira Maria Silvia Kroll Lazarini e a secretária Glaucia Maria Quaresma pela colaboração e apoio, sem os quais a realização deste trabalho seria impossível.

À Equipe do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica, especialmente à Glauce Aparecida Pinto, Silvia Pierre Irazusta, Wanda Wreck e Paulo de Tarso Rocha, pela amizade, estímulo e colaboração.

Ao Ismael Vêncio e Guaracy da Silva Ribeiro, pelo eficiente trabalho na separação dos blocos e preparação das lâminas para o estudo anátomo-patológico.

Ao Prof. Dr. Carmino Antonio de Souza, pelo constante estímulo pessoal e pelo apoio institucional dado no início deste trabalho.

Ao Dr. Jordão Pellegrino Junior, não apenas pelo apoio dado no início deste estudo, mas também pelo estímulo e amizade.

À Prof. Dra Sara Ollala Saad, coordenadora do Hemocentro da Unicamp, pelo apoio sempre demonstrado.

À biomédica Maria Cecília Teori Hashimoto, pela amizade, compreensão e carinhosa convivência diária..

À bióloga Lilian Maria Castilho, pela amizade, carinho e estimulante troca de experiência durante estes anos de convivência.

À Equipe de Estatística da FCM/Unicamp, em especial para Márcia Aparecida Ciol, Eliani Guelli, Hélio José de Abreu, pela atenção e assessoria na análise estatística.

À Rosana Gon Rocha e Sandra Sousa de Andrade, pela ajuda incansável e amiga na elaboração das tabelas, "slides" diagramação e impressão final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Granato, pela oportunidade de participar do estágio na área de Virologia (Diagnóstico Molecular das Hepatites Virais) do Laboratório Fleury e às biólogas Sandra e Evelise pelo carinho, atenção e forma dedicada de repassar suas experiências.

Ao Rogério Marcon e Márcia de Almeida Queiroz, pela atenção e auxílio no trabalho fotográfico.

À Maise Borges Leite Saviani, pelo atenção e primorosa correção de português.

Aos colegas do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp-HEMOCAMP, pela cooperação sempre demonstrada.

Aos doadores de sangue, meio e fim deste estudo.

APOIO

FAEP (Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa)

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem mais se atreve.
E a vida é muito para ser insignificante.*

(CHARLES CHAPLIN)

Pensamento:

*Da igualdade - como se me incomodasse
dar a outros as mesmas oportunidades e direitos que tenho,
como se para os meus próprios direitos não fosse indispensável
que os outros também os tivessem iguais.*

(WALT WITMAN - Leaves of grass)

SUMÁRIO

RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Evolução dos conhecimentos.....	02
1.2. O vírus da hepatite C.....	06
1.3. Epidemiologia do VHC.....	09
1.4. Transmissão por sangue e derivados.....	09
1.5. Outras vias de transmissão.....	10
1.6. Aspectos clínicos da hepatite C.....	11
1.6.1. Período de incubação.....	11
1.6.2. Hepatite C aguda.....	11
1.6.3. Hepatite crônica.....	12
1.7. Diagnóstico laboratorial.....	13
1.7.1. Diagnóstico laboratorial inespecífico.....	13
1.7.2. Diagnóstico laboratorial específico.....	13
2. OBJETIVOS.....	23
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	25
3.1. Casuística.....	26
3.1.1. Seleção da amostragem.....	26
3.2. Método.....	28
3.2.1. Análise sorológico.....	28
3.2.1.1. Ensaio sorológico.....	28
3.2.1.2. Teste complementar “immunoblot” recombinante 2 (RIBA II).....	29
3.2.2. Análise bioquímica.....	31
3.2.2.1 Dosagens de transaminases.....	31
3.2.3. Análise molecular.....	32
3.2.3.1. Transcrição reversa (RT).....	33
3.2.3.2. “Nested”PCR.....	34
3.2.3.3. Método de seqüenciamento por incorporação de ³⁵ SPdATP.....	35

3.2.4. Análise histopatológica.....	37
3.2.4.1. Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H. E.).....	37
3.2.4.2. Técnica de imuno-histoquímica.....	37
3.2.4.3. Reação imunofluorescência (IF).....	41
3.2.5. Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Resultados do ELISA e RIBA.....	44
4.2. Resultados de RT- “nested” PCR.....	50
4.3. Resultados do estudo de cortes de tecido hepático parafinado.....	63
4.3.1. Imuno-histoquímica e imunofluorescência.....	63
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	79
7. SUMMARY.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9. ANEXO.....	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Organização genômica do RNA – VHC.....	08
Figura 2- Detecção do VHC por “immunoblot” (RIBA).....	17
Figura 3- Representação da reação de imuno-histoquímica em tecido.....	39
Figura 3a-Representação do sistema da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase.....	39
Figura 4- Resultado do RIBA para anticorpos ao HCV.....	46
Figura 5- Produto de amplificação do RNA do VHC por RT-“nested” PCR, em eletroforese de gel de agarose.....	52
Figura 6- Produto de amplificação do RNA do VHC por RT- “nested” PCR, amostras de soro de doadores positivos para anticorpos ao VHC por EIA.....	52
Figura 7- Produto de amplificação do RNA do VHC por RT- “nested” PCR, eletroforese de gel de agarose.....	53
Figura 8- Produto de amplificação do RNA do VHC por RT- “nested” PCR, em amostra de paciente.....	53
Figura 9- Gel de agarose corado com brometo de etídeo de RNA do. VHC, em amostras de doadores de sangue após “nested”-PCR.....	54
Figura 10- Gel de seqüenciamento do fragmento de DNA de paciente.....	55
Figura 11- Hepatite crônica ativa grau 1 (HCA ₁).....	66
Figura 12- Hepatite crônica ativa grau 2 (HCA ₂).....	66
Figura 13- Hepatite crônica ativa grau 3 (HCA ₃).....	66
Figura 14- Cirrose hepática grau 2 (C ₂).....	67
Figura 15- Cirrose hepática grau 3 (C ₃).....	67
Figura 16- Esteatose.....	67

LISTA DE TABELAS

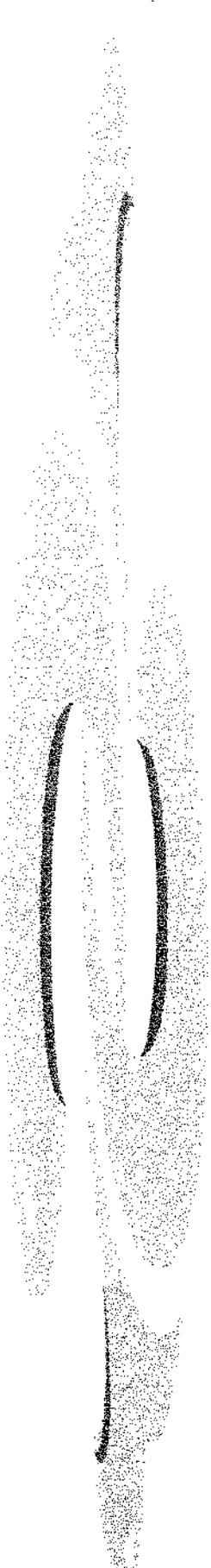
Tabela 1- Distribuição dos grupos segundo a variável idade.....	28
Tabela 2- Sequência de oligonucleotídeos sintéticos.....	33
Tabela 3- Distribuição dos valores 178 doadores de sangue, considerando-se o resultado do EIA e os valores do ALT.....	45
Tabela 4- Distribuição dos valores 178 doadores de sangue - resultados do EIA em relação ao teste RIBA-2.....	46
Tabela 5- Resultados de EIA associados a os níveis de ALT e o resultado do RIBA-2 nos 178 doadores de sangue.....	47
Tabela 6- Análise dos 147 doadores de sangue que apresentaram EIA reagente em associação com diferentes níveis de ALT - correlação com RIBA-2.....	49
Tabela 7- Distribuição dos 147 doadores de sangue com EIA positivo, com diferentes níveis de ALT - bandas presentes no RIBA-2.....	50
Tabela 8- Correlação entre os resultados do EIA e do RT-PCR do VHC nos 178 doadores de sangue.....	51
Tabela 9- Nível de ALT comparado com os resultados do RT-PCR para o VHC entre 147 doadores de sangue positivos pelo EIA.....	56
Tabela 10- Correlação entre os resultados de RIBA-2 dos 147 doadores EIA positivos e da RT-PCR.....	57
Tabela 11a. Resultados dos EIA associados aos níveis de ALT, entre os RIBA positivos, correlacionados com o resultado da RT-PCR.....	58
Tabela 11b- Resultados dos EIA associados aos níveis de ALT, entre os RIBA indeterminados, correlacionados com o resultado da RT-PCR.....	59
Tabela 11c- Resultados dos EIA associados aos níveis de ALT, entre os RIBA negativos, correlacionados com o resultado da RT-PCR.....	60
Tabela 12- Padrão do RIBA-2 de acordo com o número de bandas presentes nas 147 amostras de soros de doadores EIA positivos comparados com os resultados da RT-PCR pelo VHC.....	61

Tabela 12a- Resultados do RIBA comparados com os resultados da RT-PCR da VHC em 178 doadores de sangue.....	62
Tabela 13- Apresentação dos dados de EIA, RIBA-2 e PCR em relação aos achados histopatológicos em biópsia de fígado.....	63
Tabela 14- Apresentação dos dados referentes aos resultados de EIA e ALT encontrados entre os 18 pacientes estudados.....	64
Tabela 15- Distribuição dos 18 pacientes considerando-se os resultados do RIBA e RT-PCR, em correlação correlacionando-se com os dados histológicos.....	65
Tabela 16- Paciente, exames sorológicos, resultados de biópsia, PCR e dados epidemiológicos.....	

Siglas - Abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferase
anti - VHC	Anticorpos contra o vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
C	Região estrutural do genoma do vírus C (core)
CDC	Center for Disease Control
cDNA	Cópia de DNA, transcrita de um RNA
CMV	Citomegalovírus
E ₁ , E ₂	Regiões estruturais do genoma do vírus C (envelope)
EIA	Ensaio imunoenzimático
EIA-1	Ensaio imunoenzimático de 1 ^a geração
EIA-2	Ensaio imunoenzimático de 2 ^a geração
EIA-3	Ensaio imunoenzimático de 3 ^a geração
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HE	Coloração com hematoxilina e eosina
HIS	Hibridização in situ
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNANB	Hepatites não-A, não-B
HPIS	Hibridização em PCR in situ
HPT	Hepatites pós-transfusionais
HVB	Hepatite por vírus B
HVC	Hepatite por vírus C
HVG	Hepatite por vírus G
IF	Reação de imunofluorescência
NANB	Hepatite não-A, não-B
NCR	Região não-codificadora ou região não-transcrita
NS ₂ , NS ₃ , NS ₄ e NS ₅	Proteínas não-estruturais do genoma do vírus C

OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	“Open reading frame”
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIS	PCR in situ
RIBA	Reação de “immunoblot” recombinante
RIBA-1	Reação de “immunoblot” recombinante de 1ª geração
RIBA-2	Reação de “immunoblot” recombinante de 2ª geração
RIBA-3	Reação de “immunoblot” recombinante de 3ª geração
RNA-VHC	RNA do vírus da hepatite C
RNA-cDNA	RNA- cópia de DNA transcrita de um RNA
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
VEB	Vírus de Epstein-Barr
VHA	Vírus da hepatite A
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHD	Vírus da hepatite delta
VHG	Vírus da hepatite G
VHNANB	Vírus da hepatite não-A, não-B



RESUMO

No Brasil, previne-se a transmissão por transfusão sanguínea do vírus da hepatite C com a triagem dos doadores de sangue realizada por meio da pesquisa do anti-VHC pelo método de EIA e dosagem dos níveis séricos da ALT. A especificidade da triagem do anti-VHC por EIA, em populações de baixa soroprevalência, tem sido questionada. Assim, para avaliar-se a eficácia desta triagem, pesquisou-se a presença, com o uso da RT-PCR, do RNA viral em amostras de doadores de sangue, procurando-se, também, estabelecer as associações entre os resultados desta reação e os testes de EIA e RIBA. Procurou-se, ainda, detectar marcadores teciduais para o VHC, com a utilização de um anticorpo monoclonal específico, pela técnica de imuno-histoquímica e imunofluorescência em cortes de tecido hepático parafinado.

Foram estudadas 196 amostras de soro, coletadas no período de janeiro de 1994 a dezembro de 1995. Entre estas, 178 foram selecionadas de uma população de doadores de sangue voluntários do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP e, 18 de pacientes atendidos no Ambulatório do Grupo de Estudos das Hepatites da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Ciências Médicas desta Universidade. Dos 178, 147 (82,6%) apresentaram-se à triagem com resultados repetidamente reagentes para o anti-VHC e não-reagentes para o HBsBAg, anti-HBc, anti-HIV1/2, anti-HTLVII, além de serem negativos para marcadores da Doença de Chagas e Sífilis. Os 31 (17,4%) restantes eram repetidamente negativos para todos os marcadores sorológicos acima citados e apresentavam níveis de ALT normais (grupo controle). As 18 amostras de pacientes estudadas eram negativas para a pesquisa do anti-HIV1/2 e foram investigadas sorologicamente para os diferentes tipos de hepatites, de acordo com a avaliação clínica. Os 147 doadores foram subagrupados de acordo com os critérios baseados nas leituras das densidades ópticas das amostras em relação ao “cutoff” (DO/C) do teste de EIA para o anti-VHC e o nível de ALT. A sequência do RNA do VHC foi detectada pela RT- “nested” PCR, utilizando-se “primers” da região 5’ não-transcrita, que é a mais conservada do genoma viral. O ensaio de “immunoblot” recombinante (RIBA-2) também foi realizado nas mesmas amostras.

No subgrupo considerado EIA fortemente reagente, 95,4% apresentaram aumento nos níveis séricos de ALT, enquanto que no sub-grupo EIA fracamente reagente apenas, 47,1% tiveram níveis de ALT elevados. No subgrupo EIA fortemente reagente houve 96,9% de co-positividade com o teste de RIBA. A realização deste mostrou-se necessária para definir a condição sorológica dos indivíduos EIA fracamente reagente, uma vez que apenas 53% confirmaram a positividade inicial, permanecendo 23,5% como indeterminados e 23,5% como negativos. Observou-se uma relação direta entre a reatividade contra o antígeno do *core* do VHC (c22.3) e a presença de partículas virais no soro. Entre os RIBA indeterminados (reativos apenas para o c22.3), 87,5% apresentaram positividade para a RT-PCR. Em 91,5% dos indivíduos com EIA fortemente reagente, detectou-se o RNA do VHC pela RT-PCR contra apenas 17,6% no subgrupo EIA fracamente reagente. A concordância entre os resultados positivos de RIBA e RT-PCR foi de 85,9%. Por estes achados conclui-se que os dois testes devam ser aplicados isolada ou seqüencialmente para confirmar a infecção pelo VHC, principalmente em populações com baixas prevalências da mesma, como é o caso dos doadores de sangue. Entre os indivíduos com hepatite crônica histologicamente confirmada não se encontrou nenhum caso com resultado de RIBA negativo. Em 92,3% deste grupo observou-se positividade para o RNA do VHC pela RT-PCR. Os testes de EIA e RIBA utilizados neste estudo apresentaram alta sensibilidade e especificidade, considerando-se como população positiva aqueles indivíduos com diagnósticos histopatológicos de hepatites crônicas, com positividade para a RT-PCR.

Assim, conclui-se que a triagem sorológica, em nosso serviço, para prevenir a transmissão do VHC, na transfusão de sangue, mostrou-se eficiente e capaz de selecionar os doadores infectados, principalmente se for usada como critério a relação DO/C no teste de EIA. A utilização do anticorpo monoclonal específico, TORDJI-22, em tecido hepático parafinado pela técnica de imuno-histoquímica ou imunofluorescência, não permitiu evidenciar a presença do VHC neste tecido em nossa casuística.

Os testes de triagem sorológica (EIA e RIBA) associados ao método de RT-PCR e ao diagnóstico anátomo-patológico propiciarão ao clínico manipular melhor as inter-relações e as variáveis envolvidas na infecção pelo vírus C.

1. INTRODUÇÃO

1.1. EVOLUÇÃO DOS CONHECIMENTOS

Desde as primeiras descrições de hepatite viral, ainda na Grécia antiga (SILVA, 1986), muito se discutiu sobre os agentes etiológicos envolvidos nesta doença.

Em relação à hepatite transmitida por soro humano, a primeira descrição clara aconteceu em 1885, quando ocorreram casos de icterícia após a vacinação antivariólica de trabalhadores alemães (AACH, 1981). Posteriormente notou-se a ocorrência de icterícia, relacionada ao uso de plasma humano em soros e vacinas (FOX *et al.*, 1942; SAWYER *et al.*, 1944), propiciando evidências para que estes produtos fossem considerados agentes transmissores, o que foi reforçado com a observação posterior de casos em receptores de plasma ou sangue total (NEEFE *et al.*, 1954; MURRAY *et al.*, 1954). Isto levou, também os estudiosos, como BEESON (1943), a aceitarem a etiologia viral nas hepatites pós-transfusionais (HPT).

Nos anos 40, predominaram os estudos com voluntários, onde se produzia icterícia a partir da ingestão de fluido duodenal, e da inoculação de sangue, extraído de doentes com hepatites agudas (HAVENS, 1948; MACCALUM & BRADLEY, 1944). Em 1948, HAVENS considerava a hepatite infecciosa uma doença de crianças, de caráter epidêmico, e ressaltava suas diferenças com relação à hepatite soro-homóloga, a qual geralmente necessitava de inoculação parenteral para a transmissão. Além disto, preconizava que doadores de sangue, com história anterior de hepatites, deveriam ser descartados, e recomendava a esterilização de agulhas e seringas utilizadas em todos os procedimentos terapêuticos, para prevenir sua transmissão. Nos anos 50, foram observadas hepatites soro-homólogas em viciados em drogas (STEIGMANN, HYMAN, GOLDBLOOM, 1950; APPELBAUM & KALKSTEIN, 1951). Nesta época, identificaram-se, também, casos em receptores de unidades de sangue provenientes de doadores sadios, sem história anterior ou quadro clínico sugestivo de hepatites no passado, sendo então considerados portadores sãos da hepatite soro-homóloga (STOKES *et al.*, 1954; NEEFE *et al.* 1954; MURRAY *et al.*, 1954).

Mais tarde, notou-se que receptores de sangue apresentavam altas incidências de hepatites pós-transfusionais (HPT), quando recebiam unidades transfusionais de doadores com níveis elevados de aspartato aminotransferase (AST) em seus soros (BANG *et al.*, 1959). Além disto, foi observada associação direta entre o aumento no número de unidades transfundidas e maior risco de HPT nos receptores (ALLEN & SAYMAN, 1962).

Em 1965, BLUMBERG, ALTER, VISNICH, publicaram o que viria a ser uma das mais importantes revelações sobre as hepatites: o encontro no soro proveniente de um aborígene australiano, de um antígeno que reagia com soros de hemofílicos. Foi denominado antígeno Austrália e, inicialmente, associado às leucemias pelos autores.

KRUGMAN, GILES, HAMMONDS (1967), trabalhando com deficientes mentais nos Estados Unidos, notaram a existência de dois tipos de hepatite viral, clínica e epidemiologicamente distintos e com características imunológicas também diferentes. Denominaram, então, a hepatite infecciosa de hepatite MS-1 e a soro-homóloga de hepatite MS-2, não encontrando imunidade cruzada entre ambas.

No Japão, OKOCHI & MURAKAMI (1968) estabeleceram a associação entre a presença do antígeno Austrália, em doadores de sangue, e o desenvolvimento de HPT nos receptores de unidades transfusionais positivas para este antígeno. O antígeno Austrália foi finalmente associado (BLUMBERG, SUTNICK, LONDON, 1969) às hepatites agudas e crônicas e aos portadores sãos. Foi proposta a pesquisa rotineira, por imunodifusão, para triagem dos doadores de sangue, principalmente nas áreas onde o antígeno era altamente prevalente.

Assim, no início da década de 70, foram estabelecidas as relações entre a hepatite soro-homóloga, ou MS-2, e o antígeno Austrália (PRINCE, 1968; GILES *et al.*, 1969). O encontro das partículas de Dane (DANE, CAMERON, BRIGGS, 1970), a caracterização dos antígenos virais HBsAg (antígeno de superfície) e HBcAg (antígeno do core) aliados à descoberta de seus anticorpos específicos, anti-HBs e anti-HBc (ALMEIDA, RUBEINSTEIN, STOTT, 1971; HOOFNAGLE *et al.*, 1974), produziram avanços significativos no entendimento da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB).

A introdução da triagem sorológica com a pesquisa do HBsAg, entre 1972 e 1974, nos bancos de sangue americanos, foi incapaz de impedir totalmente o desenvolvimento de hepatites pós-transfusionais (HPT) nos receptores de sangue. A exclusão dos doadores positivos para o HBsAg promoveu uma queda significativa na transmissão destas infecções, porém, ainda continuou a ocorrência de HPT (FEINSTONE *et al.*, 1975), sendo os casos residuais destas hepatites atribuídos à pouca sensibilidade dos testes realizados (ALTER *et al.*, 1972).

Nos EUA, PRINCE *et al.* (1974), notaram o surgimento de grande número de casos de HPT em receptores de sangue sorologicamente negativos para o vírus da hepatite B (VHB), inclusive em indivíduos anti-HBs positivos antes das transfusões. Nesta ocasião, os autores postularam que talvez um novo vírus, que denominaram vírus C, fosse o causador destas hepatites não-A, não-B (HNANB) nos receptores. ALTER *et al.* (1975) confirmaram que 89% dos casos de HPT, nos EUA, eram devidos a outros vírus, que não o da hepatite A (VHA) ou VHB.

A busca da caracterização de outro agente etiológico para as HPT foi intensa na década de 70. VILLAREJOS *et al.* (1975), na Costa Rica, descreveram casos de hepatites NANB não transfusionais, que provavelmente ocorriam por contatos pessoais. RIZZETTO *et al.* (1977a) descreveram o antígeno delta no núcleo de hepatócitos de pacientes HBsAg positivos. A hepatite delta foi observada em italianos provenientes da área do Mediterrâneo, e em norte-americanos viciados em drogas, quando estes soros eram testados por radioimunoensaio-(RIE)-(RIZZETTO *et al.*, 1977b). O agente delta foi encontrado também em índios venezuelanos, aparecendo sempre como superinfecção em populações HBsAg positivas (HADLER *et al.*, 1984). BENSABATH *et al.* (1987), estudando a hepatite de Lábrea, na Amazônia, encontraram o VHD associado a portadores assintomáticos do VHB e a 100% dos doentes com HVB crônica, destacando sua alta endemicidade naquela região. Tanto um possível vírus enteral (VILLAREJOS *et al.*, 1975), como o antígeno delta (RIZETTO *et al.*, 1977a; ROSINA, SARACCO, RIZZETTO, 1985; HADLER *et al.*, 1984) não puderam ser associados ao desenvolvimento de HNANB em transfusões de sangue.

Desde os anos 70, o vírus da hepatite não-A, não-B (VHNANB) tem sido o agente etiológico predominante nas HPT, que em 50% dos pacientes evoluem para hepatites crônicas. Durante muitos anos, o diagnóstico das hepatites NANB foi baseado na exclusão de outros agentes etiológicos das hepatites, tais como o VHA e VHB, o citomegalovírus (CMV) e vírus de Epstein-Barr (VEB) segundo RAKELA & REDEKER, 1979. Em 1980, KHUROO descreveu uma epidemia de hepatites NANB em Cachemira, Índia, onde se constatou a ocorrência de vários casos intrafamiliares, e a evolução para quadros fulminantes, com alta mortalidade. Nesta epidemia, os reservatórios de água da região foram reconhecidos como as fontes de transmissão da hepatite NANB. No Nepal, em 1981 e 1982, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Center for Disease Control (CDC) notificaram, também, uma prolongada epidemia de hepatite NANB, transmitida por via fecal-oral, porém com baixo contágio intrafamiliar. A inoculação de fezes dos doentes em sagüis, permitiu isolar, nas fezes dos animais infectados, partículas de 37nm de diâmetro que foram consideradas como sendo o vírus implicado e eram iguais às observadas nas fezes humanas (KANE *et al.*, 1984).

AACH *et al.* (1981), nos EUA, notaram que a transmissão das hepatites NANB se processava mais facilmente quando os doadores de sangue apresentavam níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) no soro. Foi proposta a introdução da triagem de doadores com ALT nos bancos de sangue dos EUA (AACH *et al.*, 1981; ALTER *et al.*, 1981; SILVERSTEIN, MULLEY, DIENSTAG, 1984). Esta avaliação era compensadora do ponto de vista econômico, com um custo consideravelmente menor em relação ao de tratamento dos receptores de sangue que adquirissem HPT. Nos anos 80, observou-se aumento na transmissão do VHB a receptores quando estes recebiam unidades transfusionais com altos títulos de anti-HBc (HOOFNAGLE *et al.*, 1978; GERLICH, LUER, THOMSEN, 1980). Por isto foi proposta a pesquisa do anti-HBc, também como marcador indireto de HNANB, em bancos de sangue, visando diminuir a incidência de HPT em receptores de hemocomponentes.

Apesar da freqüente ocorrência da hepatite NANB, a detecção e caracterização do seu agente causador só foi possível em 1989, quando o vírus da hepatite C

(VHC), foi clonado (CHOO *et al.*, 1989) e um antígeno viral foi expresso *in vitro*, tornando-se o fundamento dos ensaios de triagem do VHC (KUO *et al.*, 1989). CHOO *et al.*(1989), nos EUA, a partir de plasmas de chimpanzés contendo o agente da hepatite NANB, construíram um banco de genes que lhes permitiu isolar um clone de DNA complementar. Observaram os autores que este clone não era derivado do DNA do hospedeiro, mas sim das moléculas de RNA presentes nas hepatites NANB, sendo, portanto, originário do genoma do vírus da hepatite NANB (CHOO *et al.*, 1990), a qual a partir deste momento, foi denominada hepatite pelo vírus C (HVC). Este vírus (VHC) é provavelmente um flavivírus, com menos de 80 nm de diâmetro e parece possuir um envelope lipídico e uma molécula de RNA em seu genoma.

KUO *et al.*(1989) desenvolveram ainda reações específicas através do ensaio imunoenzimático (EIA) e por radioimunoensaio (RIE), para pesquisar o anticorpo anti-VHC, baseado em um polipeptídeo sintetizado em leveduras, a partir de clones recombinantes do VHC. Este ensaio, realizado em 7 soros que haviam produzido hepatites NANB em chimpanzés, detectou o anti-VHC em 6 (todos provenientes de casos crônicos de hepatites NANB), e apenas um (proveniente de caso agudo de hepatite NANB) apresentou-se negativo para o anti-VHC. Prosseguindo os estudos, estes autores detectaram o anti-VHC em 71% dos americanos, em 84% dos italianos e em 78% dos japoneses com hepatites NANB pós-transfusionais crônicas. Esta positividade foi apenas de 15% entre japoneses com hepatites NANB agudas ou curadas. Considerou-se que esta pequena positividade do anti-VHC, nos casos agudos ou em resolução, era devida a uma muito baixa estimulação sobre o sistema imune, diferentemente do que ocorre nas infecções persistentes ou crônicas pelo VHC. Concluíram ser o VHC o mais freqüente agente etiológico das hepatites NANB, em todas as populações.

1.2. O VÍRUS DA HEPATITE C

Algumas propriedades características do VHC são conhecidas a partir da sua transmissão a chimpanzés (TABOR *et al.*, 1978). Sabe-se que o vírus C está presente em

baixos títulos na maioria das pessoas infectadas (BRADLEY & MAYNARD, 1986). Considera-se que este vírus tem um envelope lipídico, com um tamanho inferior a 80 nm (BRADLEY *et al.*, 1985; HE *et al.*, 1987; YUASA *et al.*, 1991) e se relaciona com os pestivírus ou flavivírus (BRADLEY, 1985; HE *et al.*, 1987). Alguns flavivírus são transmitidos por artrópodes, como no caso da febre amarela e da dengue, e possuem RNA em seus genomas. O genoma do VHC é constituído de uma molécula de RNA com, no mínimo, 9.400 nucleotídeos (CHOO *et al.*, 1989), que se distribuem continuamente em uma ORF (open reading frame) de aproximadamente 3.000 aminoácidos. Esta região ORF contém vários genes, que codificam as diferentes proteínas virais estruturais (S) e não-estruturais (NS, enzimas). Como se nota na figura 1, as regiões estruturais têm três partes (C, E1 e E2), e as não-estruturais quatro (NS2, NS3, NS4, NS5).

As regiões não-codificadoras (NCR) estão localizadas no final da ORF. Entre todos os VHC isolados, a região 5' NCR representa a porção mais conservada (93%) e desempenha um papel importante na replicação viral (HAYASHI *et al.*, 1993). Após esta região, encontra-se grande porção codificadora de uma poliproteína com 3011-3031 aminoácidos, a qual pode ser clivada em suas proteínas constituintes por proteases celulares e virais (CHOO *et al.*, 1991; KATO *et al.*, 1990; TAKAMIZAWA *et al.*, 1991). A região C (*core*) codifica as proteínas que formam o nucleocapsídeo interno, que envolvem o genoma. As regiões estruturais E1 e E2 (NS1) codificam proteínas que formam o envelope lipídico do vírus (SHERLOCK & DUSHEIKO, 1991).

A similaridade observada entre a região 5' do genoma do VHC e a correspondente dos flavivírus (HAN *et al.*, 1991; MILLER & PURCELL, 1990) tem levado a especulações sobre uma possível transmissão do VHC por picadas de insetos, sem ter havido, contudo, confirmação deste fato.

Organização genômica do RNA - VHC

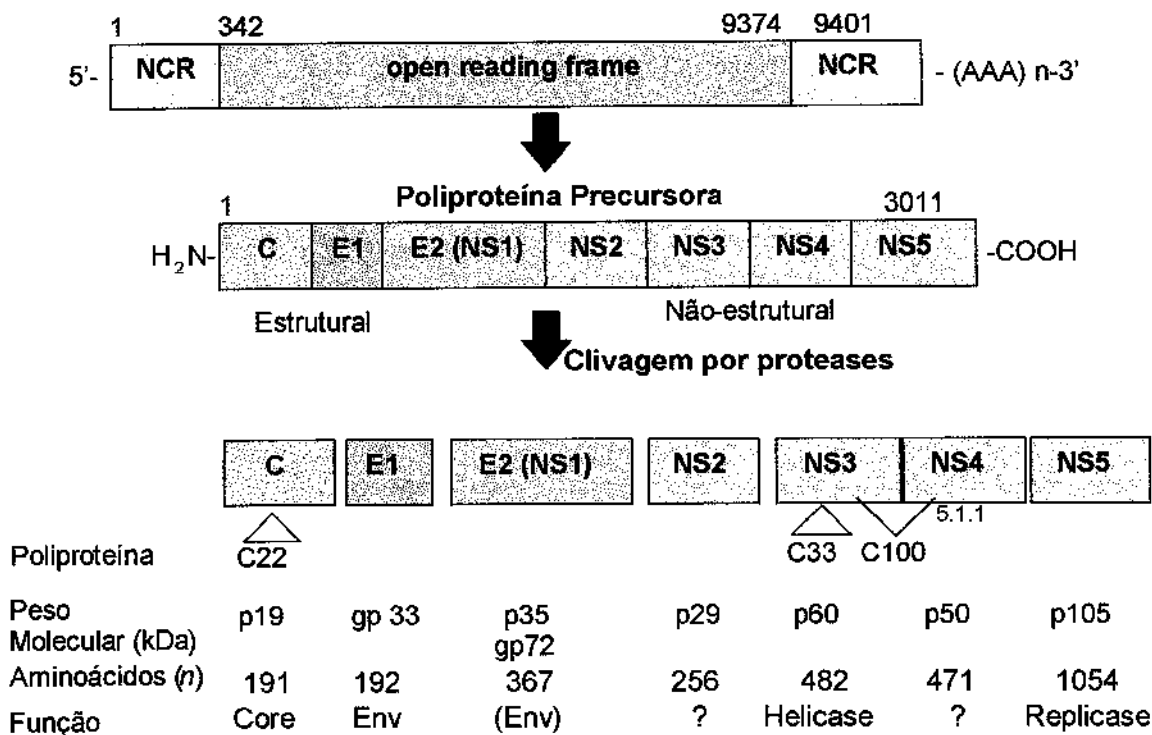


Figura 1. Organização básica do genoma do vírus da hepatite C: pesos moleculares e funções das proteínas virais e antígenos associados às regiões não-codificadoras e codificadoras.

Legenda da figura 1

ORF - Fase aberta de leitura

NCR - Região não-codificadora

NS - Região que codifica proteínas não-estruturais

E - Região que codifica proteínas do envelope viral

C - Região que codifica proteínas do nucleocapsídeo viral

1.3. EPIDEMIOLOGIA DO VHC

O VHC se distribui universalmente. A prevalência da infecção na população varia amplamente, sendo de 0,3% na Bélgica (De GROOT, 1991); 0,7% na Holanda (VAN DER POEL *et al.*, 1990) e 14,5% em Camarões (NGATCHU, STROFFOLINI & RAPICETTA, 1992). De maneira geral, nos EUA e nos países europeus, estes índices são menores que 1%, sendo exceção a Espanha, onde são encontrados percentuais de infecção de até 2,2% (ESTEBAN *et al.*, 1989). No Oriente, prevalências ao redor de 1,5% são encontradas no Japão (WATANABE *et al.*, 1990). Em Taiwan, que apresenta altíssimas taxas de infecção pelo VHB, a prevalência do VHC é menor que 1% (CHEN *et al.*, 1990). No Brasil, em doadores de sangue da cidade de Campinas, observou-se prevalência de 2,1% com testes imunoenzimáticos de 1ª geração (GONÇALES Jr. *et al.*, 1993a).

1.4. TRANSMISSÃO POR SANGUE E DERIVADOS

A transmissão do VHC se faz principalmente pelo sangue e seus derivados, sendo o principal agente etiológico das hepatites pós-transfusionais no mundo (ALTER *et al.*, 1989b; ESTEBAN *et al.*, 1990). Em Campinas, São Paulo, a incidência das hepatites pós-transfusionais, antes da pesquisa rotineira do anti-HCV, na triagem sorológica dos doadores de sangue, era de 16,2%, sendo cerca de 89% dos casos associados ao VHC. Acredita-se que a pesquisa obrigatória do anti-HCV, na triagem sorológica dos bancos de sangue brasileiros, diminuirá sensivelmente esta incidência (GONÇALES Jr. *et al.*, 1993c).

A presença do anti-HCV em torno de 60 a 80% dos hemofílicos e de 50 a 70% dos usuários de drogas endovenosas, mostra bem o potencial do sangue de transmitir esta virose (ZUCKERMAN, 1989). Existem mais usuários de drogas com infecção ativa pelo VHC do que com o VHB, pois 25% deles apresentam seqüências de RNA do VHC em seus soros (SIMMONDS *et al.*, 1990), contra 12% de soropositivos para o HBsAg (VAN DER POEL *et al.*, 1990).

1.5. OUTRAS VIAS DE TRANSMISSÃO

Os parceiros sexuais de indivíduos infectados pelo VHB são considerados como pertencentes a grupos de risco para a aquisição deste vírus (KOFF *et al.*, 1977; WRIGHT, 1975), bem como aqueles indivíduos com grande número de parceiros sexuais (ALTER *et al.*, 1986). Embora a atividade sexual tenha sido implicada na transmissão da infecção pelo VHB, ela não tem sido claramente responsabilizada como passível de transmitir o VHC (EVERHART *et al.*, 1990; EYSTER *et al.*, 1991; TOR *et al.*, 1990). Mesmo nas populações de risco para aquisição de viroses transmitidas sexualmente, atendidas em clínicas especializadas, a transmissão sexual do VHC é infreqüente (BENAMOUZIG, EZRATY, CHAUSSADE, 1990) e o acometimento, quando ocorre, faz-se predominantemente pelo uso de drogas endovenosas (WEINSTOCK *et al.*, 1993).

Nos grupos de homossexuais hiperativos e de prostitutas, a infecção pelo VHC não é encontrada com a mesma freqüência que a pelo VHB (EVERHART *et al.*, 1990; MELBYE *et al.*, 1990). Isto pode estar relacionado com a baixa viremia que comumente se observa nos infectados com o VHC. Apesar de não se descartar a transmissão sexual do VHC, esta não parece ser relevante na epidemiologia da doença. Outras vias de transmissão do VHC têm sido consideradas, sendo descrita a transmissão deste vírus pela saliva (ABE & INCHAUSPE, 1991) e através de mordida humana (DUSHEIKO, SMITH, SHEVER, 1990). A saliva poderia, portanto, teoricamente, representar um veículo de transmissão intrafamiliar da hepatite C.

Alguns estudos têm mostrado que a infecção pelo VHC se desenvolve em 13% das crianças nascidas de mães anti-HCV reagentes (CILLA *et al.*, 1992; LAM *et al.*, 1993; RODOUT *et al.*, 1993; WEJSTAL *et al.*, 1992). O risco de transmissão do VHC ao recém-nascido está diretamente relacionado ao nível de viremia materna. Outra observação interessante é que as mães infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm maior potencial de transmitir o VHC a seus filhos do que as mães sem imunodeficiência. Este maior potencial de transmissibilidade do VHC, entre indivíduos co-infectados pelo

HIV, talvez seja devido ao aumento dos níveis virêmicos do VHC nas mães, resultante da imuno-supressão pelo HIV (GIOVANNINI *et al.*, 1990).

1.6. ASPECTOS CLÍNICOS DA HEPATITE C

1.6.1. Período de incubação

O período de incubação médio da hepatite por vírus C pode ser medido nos indivíduos com hepatite pós-transfusionais e tem sido estimado entre 50 e 71 dias (ALTER *et. al.*, 1989c; ESTEBAN *et. al.*, 1990; GONÇALES Jr. *et. al.*, 1993b).

1.6.2. Hepatite C aguda

Como na hepatite B, os sintomas de fraqueza, cansaço, anorexia, náuseas, vômitos e dor no hipocôndrio direito podem estar presentes em torno de 25 a 50% dos casos, sendo uma infecção assintomática a apresentação usual desta hepatite. Em 75% dos casos, a hepatite C é anictérica e somente as dosagens de ALT e AST podem indicar, ao clínico, a ocorrência de uma infecção aguda. Mesmo quando presentes, os sintomas usuais da hepatite C são indistinguíveis dos observados nas hepatites causadas pelos vírus A ou B.

Raramente a hepatite C tem um curso fulminante e o VHC tem sido colocado numa posição intermediária, entre o VHA e VHB, como agente responsável por esta forma de evolução da doença (FAGAN & WILLIAMS, 1990). Enquanto a hepatite B, em sua forma aguda, menos frequentemente, tem duração superior a 6 meses, tende-se a considerar que a hepatite C, em sua forma aguda, pode se apresentar com discretas alterações de ALT/AST até 9 meses após o seu início. Aqueles indivíduos, que persistirem com aumento de transaminases por mais de 9 meses, deverão ser submetidos à biópsia hepática para avaliar-se uma possível evolução para hepatite crônica (GONÇALES Jr & BARRAVIERA, 1995).

1.6.3. Hepatite crônica

Como regra geral, considera-se que 50%(ALTER *et al.*, 1989b; RAKELA & REDEKER, 1979; REALDI *et al.*,1982) a 80 % (ESTEBAN *et al.*, 1991) dos indivíduos com hepatite C aguda evoluirão para cronicidade. Esta passagem é clinicamente inaparente, e normalmente só se observam elevações persistentes nos níveis séricos das transaminases. O padrão de aumento das transaminases varia de indivíduo para indivíduo. Alguns pacientes manterão uma elevação contínua nos níveis de ALT, enquanto outros apresentarão períodos de normalização, intercalados com outros de aumento da atividade destas enzimas (FARCI *et al.*, 1991). De maneira geral, os níveis séricos de ALT/AST são bem menores que os observados na fase aguda da doença. Com frequência, observamos doentes que apresentam dosagens de transaminases repetidamente normais, por períodos prolongados, durante a evolução do quadro de hepatite crônica (ALBERTI *et al.*, 1992). Considera-se que a evolução para cirrose hepática ocorra em cerca de 20 a 50% dos doentes e se processará em um período de 10 a 30 anos (ALTER, 1990; DAVIS *et al.*, 1989). A cirrose, quando se desenvolve, também é clinicamente silenciosa. Os sinais de insuficiência hepática grave são manifestações que ocorrem tardiamente nesta doença. Este curso lento se acompanha de flutuações dos níveis de transaminases séricas. As elevações de ALT devem representar períodos de viremia, associados a maior grau de necrose hepatocítica.

Quando a cirrose se estabelece, aumentará o risco do desenvolvimento de hepatocarcinoma nos dez anos seguintes (KIYOSAWA *et al.*, 1984). Atualmente, existem várias evidências de que o VHC é o responsável pelo aumento no número de hepatocarcinomas, e que responde por maior número de casos como agente etiológico desta neoplasia no Oriente e no Japão, em particular (SIMONETTI *et al.*, 1992).

1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.7.1. Diagnóstico laboratorial inespecífico

Os principais exames laboratoriais inespecíficos, utilizados pelo clínico para diagnosticar e acompanhar a evolução da hepatite pelo vírus C, são os níveis de aminotransferases, especialmente a ALT. Estas dosagens, muitas vezes, não se correlacionam com as extensas lesões observadas no estudo histopatológico de determinado paciente, podendo flutuar durante o evoluir da doença (SCHMILOVITZ-WEISS *et al.*, 1993). Como regra geral, nas hepatites C agudas os níveis iniciais de ALT variam de 400-800UI/l e tendem a se normalizar em um período de 45 a 60 dias, podendo, no entanto, persistir elevados por até 9 meses, nos casos de hepatites agudas prolongadas (VAN DER POEL, CUYPERS, REESINK, 1994).

Outras provas utilizadas para o diagnóstico de hepatopatias, como a fosfatase alcalina e o gamaglutamil transferase, têm pouco valor diagnóstico, embora possam estar elevadas nos casos de hepatites colestáticas. As dosagens das bilirrubinas podem ser úteis nos casos de hepatites agudas ictericas. Quanto às globulinas, mesmo nos casos de hepatite crônica pelo vírus C, não se observam aumentos nos seus níveis séricos (GONÇALES Jr & BARRAVIERA, 1995). As alterações dos fatores de coagulação não estão presentes nos quadros usuais de hepatite C, aguda ou crônica sem insuficiência hepática (ANNICCHINO - BIZZACCHI *et al.*, 1993).

1.7.2. Diagnóstico laboratorial específico

A pesquisa de infecção pelo VHC se baseia em dois tipos de testes: os que detectam anticorpos contra o vírus da hepatite C, como no ensaio imunoenzimático (EIA) e no “immunoblot” recombinante (RIBA), e os testes que pesquisam a presença do RNA do VHC pela reação da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

Vários testes sorológicos foram desenvolvidos com base na seqüência de nucleotídeos do genoma do VHC. Os primeiros ensaios (1ª geração) detectavam a presença do anticorpo anti-VHC através do método de EIA, usando como antígeno um polipeptídeo recombinante, não-estrutural (c100-3), que resulta da união do clone 5.1.1 com outros clones. Este antígeno é composto de 517 aminoácidos e originário da região NS4 do genoma viral. O antígeno recombinante do VHC, utilizado nestes testes, foi produzido em leveduras (antígeno c100-3) e em culturas *Escherichia coli* (antígeno 5.1.1) e representam a região não-estrutural (NS4) do genoma viral (CHOO *et al.*, 1989; 1990).

Um dos achados mais importantes com o teste de 1ª geração (EIA-1), para a pesquisa do VHC, foi a constatação da alta proporção de casos anti-VHC positivos, de transmissão parenteral. Contudo, reações inespecíficas para o teste de EIA de 1ª geração foram descritas, e dúvidas surgiram quanto à validade diagnóstica do mesmo (MACFARIANE *et al.*, 1990; WONG *et al.*, 1990). Com o intuito de melhorar a sensibilidade do teste de EIA para o anti-VHC, introduziu-se um epítopo estrutural (c22-3) e um epítopo não-estrutural (c33c) aos antígenos do ensaio de 1ª geração, c100-3 e 5.1.1. (VAN DER POEL *et al.*, 1991). O novo teste de EIA, contendo quatro porções antigênicas do VHC, foi denominado teste de 2ª geração (EIA-2) para pesquisa do VHC.

De acordo com ALTER (1991), o EIA-2ª geração apresenta uma sensibilidade elevada, como demonstram em estudos com pacientes que adquiriram hepatite NANB, a partir de doadores infectados. Em estudo prospectivo, este autor demonstrou que a re-análise de amostras de doadores anti-VHC positivos, com EIA de 2ª geração, aumentou de 75% para 89%. a proporção de casos de HVC identificados.

O diagnóstico de infecção pelo VHC, baseado no EIA, apresenta problemas na detecção de grande porcentagem de casos agudos da doença, pois nesta situação geralmente ocorre soroconversão tardia para o anti-HCV. Desde os estudos com os testes de 1ª geração, o anti-HCV foi detectado em apenas 15% dos casos de hepatite NANB agudas (KUO *et al.*, 1989). Esta pequena positividade nos casos agudos foi explicada pela baixa estimulação viral sobre o sistema imune, diferentemente do que ocorre nas infecções

crônicas pelo vírus C. Em casos de hepatites pós-transfusionais, é possível medir-se o tempo decorrido entre o início do quadro agudo e o aparecimento dos anticorpos anti-HCV, no soro dos doentes. Este tempo médio de soroconversão foi de 154 dias, nos EUA (ALTER *et al.*, 1989c), de 101 a 132 dias na Espanha, (ESTEBAN *et al.*, 1990) e de 135 dias, no Brasil (GONÇALES Jr. *et al.*, 1993b).

A especificidade do teste também é um determinante crítico, nas triagens de doadores de sangue ou em populações de baixo risco. Em estudo prospectivo com soros estocados, ALTER (1991) mostrou que o teste de EIA de 2ª geração tem uma especificidade superior a 90%, quando usado para testar pacientes que adquiriram hepatites NANB a partir de doadores infectados. O teste de 2ª geração permite diagnóstico mais precoce da infecção pelo VHC, pois os anticorpos dirigidos contra a proteína do *core* (anti-c22) aparecem antes dos anticorpos contra a proteína c100-3 (DOURAKIS *et al.*, 1992). Assim, embora tenha ocorrido melhora substancial no diagnóstico da HCV, com os testes de EIA de 2ª geração, uma elevada frequência de falsos-positivos ainda tem sido observada. Estes falsos-positivos têm sido atribuídos à anticorpos contra superóxido dismutase (SOD) segundo IKEDA *et al.* (1990), a fatores reumatóides (THEILMAN *et al.*, 1990) e à hipergamaglobulinemia, geralmente em associação com doenças hepáticas auto-imunes (LENZI *et al.*, 1990). É claro que falsos-positivos diminuem a especificidade e os falsos-negativos afetam a real sensibilidade dos testes de 2ª geração (BOUDART, 1990; LAU *et al.*, 1993; MARTELL *et al.*, 1992). Em vista disto, foram desenvolvidos os testes suplementares como “immunoblot” recombinante (RIBA), com intuito de se melhorar a triagem sorológica para a HVC .

O RIBA é um ensaio realizado sobre fitas de nitrocelulose, que contêm bandas com proteínas do VHC: o de 1ª geração (RIBA-1) inclui o antígeno original 5.1.1., o c100-3 e uma banda de superóxido dismutase (SOD), que serve de controle; o RIBA-2 (2ª geração), além dos antígenos 5.1.1., c100-3 e SOD, incluem os antígenos c33c e c22 (VAN DER POEL *et al.*, 1991). Ambos (RIBA-1 e 2) têm sido considerados como testes complementares, e não confirmatórios da HVC, devido às suas semelhanças antigênicas com o teste de EIA, utilizado em triagens, (Fig.2), no entanto, são utilizados para

discriminar os resultados falsos-positivos dos verdadeiros positivos obtidos com o teste de EIA. Quando existem evidências clínicas e laboratoriais de infecção pelo VHC, o RIBA geralmente confirma os resultados do EIA. Em contraste, na ausência destas evidências clínicas e laboratoriais, como ocorre em doadores de sangue, o RIBA confirma, inicialmente, somente 75% dos casos (MENITOVE, RICHARDS, DESTREE, 1990). Assim, o RIBA se torna um teste importante na identificação dos indivíduos que foram infectados pelo VHC.

ESTEBAN *et al.*(1990) demonstraram que aproximadamente 80 a 90% dos doadores RIBA-reagentes transmitem HVC para os receptores de sangue. Quando somente um dos antígenos do RIBA reage contra os anticorpos do soro testado, computa-se o resultado como RIBA indeterminado, o qual pode refletir estádios iniciais da infecção, ou mesmo, indicar indivíduo cronicamente infectado que vai persistir com RIBA indeterminado por longo tempo (EBELING; NAUKKARINEN, LEIKOLA; 1990). Recentemente, um teste de EIA de 3ª geração (EIA-3) foi desenvolvido utilizando como antígenos a proteína c22 do *core* e proteínas das regiões NS3, NS4 e NS5 (VAN DER POEL *et al.*, 1993). Este teste apresenta 90 a 100% de sensibilidade e 99,8% de especificidade. Podem, ainda, aparecer resultados falsos positivos, principalmente em populações de baixo risco, como os doadores de sangue. Este teste de 3ª geração é a base, também, do RIBA-3. Uma alta proporção de indivíduos positivos pelo RIBA-3 são virêmicos, quando testados pelo PCR (CRAXI *et al.*, 1994).

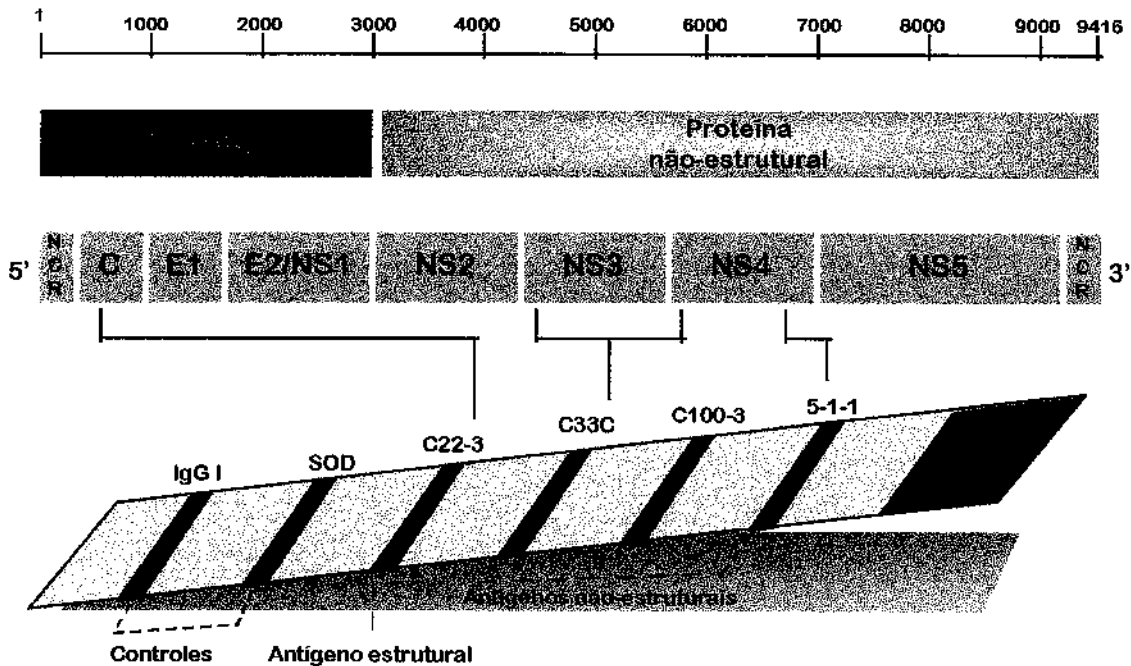


Figura 2. Detecção do VHC por “immunoblot” (RIBA).

A PCR é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, possibilita a amplificação de um fragmento específico de DNA, cuja concentração final excede em milhares de vezes à do restante do DNA presente na amostra analisada (SAIKI *et al.*, 1988). De maneira sucinta, esse procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois “primers” ou iniciadores, com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento-alvo e levados a efeito por reação enzimática mediadas por uma polimerase, com atividade em elevadas temperaturas, servindo como exemplo a *Taq* polimerase (ERLICH, GELFAND, SNINSKY, 1991).

Cada ciclo da reação de amplificação é constituído por três fases distintas: 1^a) separação das hélices do DNA a ser amplificado; 2^a) ligação complementar entre os “primers” e o DNA e 3^a) síntese do DNA pela *Taq* polimerase. A orientação dos “primers”

faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna, entre eles. Assim o produto de extensão do “primers” é utilizado como substrato para o outro, resultando em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada na fase precedente. Desta forma, o número de cópias do fragmento alvo tem um crescimento exponencial, o que faculta, no final de 30 ciclos, aumentos da ordem de 10^6 cópias, partindo-se de uma única molécula (PEAKE, 1989; WRIGHT & WYNFORD, 1990).

A grande sensibilidade da PCR, que a transforma em poderosa arma na detecção de pequenas quantidades de partículas de DNA, tem como contrapartida um grande problema: a contaminação por produtos de uma reação prévia da PCR durante o manuseio das amostras. Esse problema é particularmente acentuado no exame de amostras microbiológicas, no qual, a quantidade de substrato é, em geral, pequena (COSTA & COSTA, 1992). Existem protocolos especiais para reduzir a contaminação que inclui, entre outras medidas, a utilização de laboratórios, equipamentos e reagentes separados para procedimentos pré e pós-reação da polimerase, além de limpeza escrupulosa do material e utilização de enzimas que destruam todo DNA residual após a reação (KWOK & HIGUCHI, 1989).

A PCR tem sido largamente utilizada para diagnóstico de doenças hereditárias (como anemia falciforme e hemofilia), em colagenoses (lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide), em medicina forense (exclusão de paternidade, investigação de material biológico após ato criminoso), e na detecção de agentes infecciosos (HIV, citomegalovírus, papilomavírus, VHB, VHC e etc.).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para pesquisar a presença do VHC através da técnica de PCR em soros (LAZIZI, ELFASSI, PILLOT, 1992; NISHIGUCHI *et al.*, 1992; NOVATI *et al.*, 1992; GARSON *et al.*, 1990a) e em tecidos (FONG *et al.*, 1991; SHIEH *et al.*, 1991). LAZIZI *et al.* (1992) destacaram a PCR, por ser um teste direto, mais sensível que os testes imunológicos para diagnosticar a infecção pelo VHC e se constitui na melhor prova para diferenciar os resultados verdadeiramente positivos dos falsos positivos para o anti-VHC.

A pesquisa do RNA do vírus da hepatite C tem sido utilizada principalmente nos indivíduos com RIBA indeterminado, na detecção precoce de diferentes casos de hepatites: pós-transfusionais (pois o mesmo se positiva de 5 a 10 dias após a transfusão); com sorologia negativa para o VHC pelo EIA; de transmissão vertical; casos de hepatites de possível etiologia auto-imune e em grupos que podem apresentar testes positivos devido a outros fatores, como alcoólatras e hemodialisados (TINÉ *et al.*, 1991). NISHIGUCHI *et al.* (1992) observaram a ocorrência de resultados falsos positivos, para o anti-VHC, pelo EIA, em indivíduos com hepatites auto-ímmunes. Estes resultados falsos positivos podem ser devidos a infecções prévias pelo VHC, ou podem representar reações cruzadas com epítomos do VHC. Em trabalho de transmissão vertical, NOVATI *et al.* (1992) concluíram ser a PCR o principal instrumento para o diagnóstico direto e precoce da infecção pelo VHC em neonatos.

O teste de PCR quantitativo pode ser utilizado para monitorar a terapêutica antiviral, pois mede a carga infectante (LAU *et al.*, 1993). Sabe-se que esta carga viral guarda relação direta com as alterações histológicas e com o potencial de transmissão mãe-filho (OHTO *et al.*, 1994; WEJSTAL *et al.*, 1992). Tanto a quantificação dos níveis de RNA do VHC como a genotipagem têm sido importantes para avaliação da terapêutica e da evolução da doença (HAGIWARA *et al.*, 1993; YOSHIOKA *et al.*, 1992).

FONG *et al.* (1991), descreveram um método que detecta os filamentos positivos (gênomico) e negativos (replicativo) do RNA do vírus da hepatite C, usando a PCR. Foram testados soros e fragmentos de tecidos hepáticos de nove pacientes com hepatite crônica C. O filamento positivo (do RNA do VHC) foi detectado no soro e tecido hepático de todos os pacientes, enquanto o negativo, no tecido hepático e no soro, respectivamente, em 89 e 55% dos casos. Em conclusão, a presença ou ausência dos dois filamentos do RNA do VHC no tecido hepático podem ser utilizados como marcadores da resposta à terapia antiviral, em particular, para avaliar o tempo e eficácia da mesma. Trabalhando com a técnica de PCR seguida de "Southern Blotting" para detecção do VHC, no tecido hepático, SHIEH *et al.* (1991) concluíram que este método revela informações valiosas sobre o diagnóstico da infecção e da patogênese da hepatite crônica pelo vírus C. Pelo exposto, a PCR constitui-se num importante instrumental para um correto diagnóstico

de infecções pelo vírus da hepatite C, bem como, para medir a eficácia do tratamento anti-viral, além de constituir-se, enquanto método diagnóstico, num grande avanço para um melhor entendimento das doenças infecciosas.

Alguns métodos atuais buscam detectar o antígeno do VHC nos tecidos afetados. Entre os testes propostos encontram-se as técnicas de hibridização *in situ*, PRC *in situ* e imuno-histoquímica.

A técnica de hibridização *in situ* (HIS), consiste na detecção intracelular de uma seqüência de DNA-alvo pela introdução de uma sonda específica de oligonucleotídeos marcada. Apesar dos vários trabalhos encontrados na literatura, a detecção do VHC-RNA por hibridização *in situ* parece ainda uma meta difícil de se alcançar.(YAMADA *et al.*, 1993). Os resultados parecem conflitantes em muitos aspectos; no que concerne ao tipo e proporção de células infectadas pelo VHC, na distribuição intracelular do RNA-VHC, na associação topográfica com as células lesadas e na quantidade de seqüências genômicas e suas fitas replicativas intermediárias. Assim, como consequência, há várias dúvidas acerca da especificidade dos dados encontrados (NEGRO *et al.*, 1992).

O termo PCR *in situ* (PIS) refere-se à direta incorporação do nucleotídeo marcado dentro do produto da PCR na célula. Isto contrasta com hibridização em PCR *in situ* (HPIS), pois o produto da PCR não é marcado, sendo detectado só posteriormente pela adição de uma sonda específica marcada (HIS). A hibridização em PCR *in situ* apresenta-se como a melhor opção para detecção do DNA viral em tecido, pois reúne a extrema sensibilidade do PCR e a capacidade de localização celular da hibridização *in situ*.

Estudos do VHC com hibridização em RNA- cDNA *in situ* sugerem que o RNA viral não é encontrado em células inflamatórias ou no epitélio do ducto biliar lesado, mas sim em hepatócitos periportais espalhados (NUOVO & BECKER, 1995). Um estudo de NEGRO *et al.* (1992) mostrou que o RNA viral pode ser detectado por hibridização *in situ*, logo após a infecção, mas não foi capaz de detectá-lo no fígado de chimpanzé, três

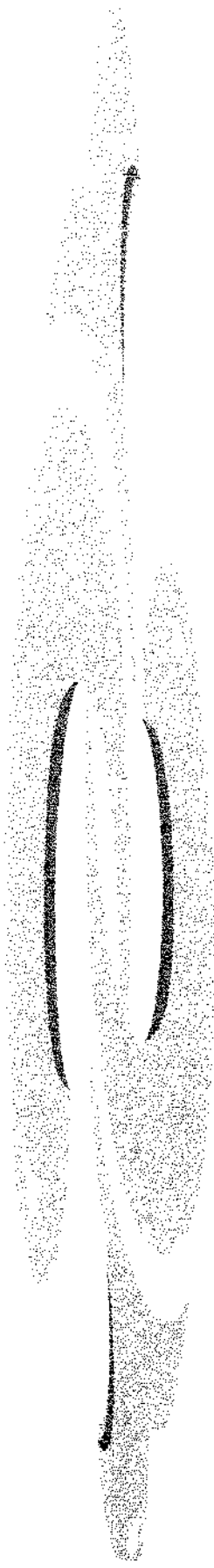
semanas após o início da mesma. Estes dados sugerem que o número de cópias virais deve decrescer com a progressão da doença. Um estudo, onde foram comparados os resultados da hibridização em RNA-cDNA *in situ* com o cDNA amplificado pela PCR, sugere que é possível detectar, pelo uso da RT-PCR *in situ*, a presença do cDNA viral quando o número de cópias está abaixo do limite de detecção para hibridização *in situ* (NUOVO *et al.*, 1993).

O método de imuno-histoquímica permite a identificação *in situ* do antígeno na célula ou componentes teciduais, incluindo produtos de secreções, com base na interação específica do antígeno-anticorpo, que pode ser visualizada pela marcação apropriada, através do microscópio óptico ou do eletrônico. Os marcadores usados para visualização são pigmentos fluorescentes (imunofluorescência), enzimas (método imunoenzimático), substâncias eletrodensas, partículas sensíveis à luz e imunocitoquímica para microscopia eletrônica (ouro coloidal, ferritina) e outras partículas. KRAWCZINSKI *et al.* (1992) identificaram a presença do VHC em tecido hepático de chimpanzé e humano, pela técnica de imuno-histoquímica, usando como marcador o isotiocianato de fluoresceína, associado à fração de imunoglobulina G, de soro de chimpanzé e humano fortemente positivo para o VHC. O antígeno foi localizado no citoplasma dos hepatócitos de 100% dos chimpanzés com hepatites agudas, em 50% dos animais com infecções crônicas, e em aproximadamente 92% dos pacientes com hepatites crônicas pelo VHC. Destacaram também que uma proteína da região NS3 foi o componente hepatocelular mais proeminente.

YAP *et al.* (1992), para detectarem o VHC em tecido hepático, investigaram a imunorreatividade para um anticorpo monoclonal em tecido hepático congelado de chimpanzé e pacientes com hepatites crônicas NANB. O anticorpo monoclonal foi desenvolvido em camundongo imunizado com polipeptídeo sintético, derivado do *core* do VHC. O antígeno foi demonstrado como grânulos citoplasmáticos em número variável, porém, exclusivamente nos hepatócitos, em 75% dos pacientes com hepatites crônicas NANB, que apresentavam resultados positivos para o anti-VHC e VHC-RNA. A não-reatividade em 25% dos tecidos hepáticos de pacientes, com hepatites crônicas e que apresentavam VHC-RNA e anti-VHC positivos, foi atribuída à concentração viral abaixo do limite de detecção para a técnica de imuno-histoquímica enzimática.

No estudo de WELLMANN *et al.* (1994) a detecção e localização de um antígeno citoplasmático não-estrutural do VHC foram realizadas por imuno-histoquímica, estudando-se cortes de biópsias hepáticas fixados em formalina e parafinados. Utilizaram como anticorpo monoclonal o TORDJI-22 dirigido diretamente contra a região NS4. A imunorreatividade foi detectada pela presença de grânulos citoplasmáticos em 73% dos pacientes com hepatite crônica e em 100% dos pacientes com hepatite aguda, não sendo demonstrada reação cruzada com hepatite B ou cirrose biliar primária. O fato da baixa detecção do antígeno do VHC, por esta técnica, parece dependente da reduzida taxa de replicação viral, que ocorre em pacientes com hepatite crônica NANB.

O desenvolvimento e padronização destes métodos são importantes ferramentas para o diagnóstico e reconhecimento do VHC em biópsias hepáticas, indispensáveis para determinação das causas e efeitos desta doença.



2. OBJETIVOS

- 1 - Desenvolver e padronizar a metodologia para diagnóstico laboratorial de infecção pelo VHC, pela técnica da RT-“nested” PCR, em soro de indivíduos com hepatites crônicas;
- 2 - Usando a RT-“nested” PCR, investigar a presença do RNA do VHC na amostra de doadores voluntários de sangue;
- 3 - Estabelecer as associações entre os resultados obtidos com o teste do RT-“nested” PCR, com o teste de EIA e com o RIBA, em indivíduos selecionados, acometidos pelo VHC;
- 4 - Avaliar a eficiência dos testes de triagem na prevenção da transmissão do VHC nas transfusões de sangue;
- 5 - Estabelecer as associações entre os testes de EIA, RIBA e RT- “nested” PCR e os achados histopatológicos observados nas biópsias hepáticas.
- 6 - Detectar pela técnica de imunofluorescência e imuno-histoquímica, em cortes de tecido hepático parafinado, os marcados teciduais para o VHC, utilizando-se um anticorpo monoclonal específico.



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1. Seleção da amostragem

No presente estudo, no período de janeiro de 1994 a dezembro de 1995, foram analisadas 196 amostras de soro. Deste total, 178 foram selecionadas a partir de uma população de doadores de sangue voluntários, do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp (Hemocamp), e as outras 18 foram coletadas de pacientes atendidos no Ambulatório do Grupo de Estudos das Hepatites, da Disciplina de Doenças Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, para investigação diagnóstica.

Inicialmente, todas as amostras dos doadores de sangue foram processadas pelos métodos de triagem do Hemocamp, segundo as normas técnicas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, na Portaria 1376 de 19 de novembro de 1993. As amostras de doadores de sangue selecionadas, apresentavam resultados sorológicos negativos para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e anticorpos anti-*core* do vírus da hepatite B (anti-HBc); para os anticorpos anti-vírus da imunodeficiência humana (HIV); para anticorpos anti-vírus linfotrófico de células T humanas (anti-HTLV); para anticorpos anti-*T. cruzi* e para anticorpos anti-*T. pallidum*. Dos 178, 147 (82,6%) apresentaram-se à triagem para o anti-VHC com resultados repetidamente reagentes, e os 31 (17,4%) restantes eram anti-VHC repetidamente negativos, com níveis de ALT normais, portanto sem alterações laboratoriais que indicassem hepatopatias. Consideraram-se estas 31 amostras como grupo controle do estudo. Assim foram excluídos da amostragem doadores de sangue que apresentavam outras infecções associadas ao VHC e também com resultados do teste de triagem inconclusivos para este vírus. As 18 amostras de pacientes que participaram do estudo eram negativas à pesquisa de anti-HIV e foram investigadas sorologicamente para os diferentes tipos de hepatite, de acordo com a avaliação clínica.

Todos os doadores com resultados sorológicos positivos para o VHC foram encaminhados ao Ambulatório do Grupo de Estudos das Hepatites para avaliação clínica. Após triagem clínica dos pacientes, procedeu-se à coleta dos exames laboratoriais e anatomopatológicos de acordo com a conduta médica. As amostras de sangue foram

colhidas em “vacutainer” e centrifugados à temperatura ambiente, com intervalo máximo de 4 horas para processamento, e os soros foram distribuídos em duas alíquotas de 1ml cada, em microtubos para 1,5ml. Uma alíquota foi estocada primeiramente a 4°C, antes da aplicação e durante a execução dos testes para VHC, EIA, ALT (média de tempo a 4°C - 24 horas) e em seguida, estocada em “freezer” -20°C para posterior análise do RIBA. A segunda alíquota foi imediatamente estocada em “freezer” -20°C até análise subsequente da RT-PCR para o VHC e seqüenciamento.

A indicação da biópsia obedeceu a critérios clínicos e laboratoriais pré-estabelecidos pela equipe médica do Grupo de Estudos das Hepatites da Disciplina de Doenças Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. A coleta do material da biópsia hepática foi feita por punção percutânea, segundo critérios padronizados de acordo com padrões éticos exigidos. O fragmento de tecido hepático colhido foi colocado em formalina 10% e encaminhado ao Departamento de Anatomia Patológica da mesma Faculdade para processamento, de acordo com a rotina. Do grupo de 147 doadores de sangue acompanhados ambulatorialmente, 121 (82,3%) foram submetidos a biópsia hepática durante o processo de investigação clínica.

Do total de 178 doadores voluntários de sangue selecionados, 163 (91,6%) eram do sexo masculino e 15 (8,4%) do feminino. Por outro lado, entre os pacientes, encontraram-se 8 (44,4%) do sexo masculino e 10 (66,6%) do sexo feminino. A baixa porcentagem de indivíduos do sexo feminino estudada na amostragem de doadores de sangue é justificada pelo fato de que, no Hemocamp, apenas 17% das bolsas de sangue coletadas provêm de doadores do sexo feminino (dados levantados junto à Seção de Informática do Hemocamp). A distribuição dos grupos, segundo a variável idade, foram apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos segundo a variável idade

Idade (anos)	Pacientes	Doadores	Controles
Tamanho do grupo	18	147	31
Mediana	34,5	33	33
Desvio	9,6	8,2	8,6
Mínimo	18	19	18
Máximo	53	59	49

3.2. MÉTODO

3.2.1. Análise sorológica

3.2.1.1. Ensaio sorológico

O teste de triagem utilizado para a detecção do VHC foi o ensaio imunoenzimático (EIA 2nd geração-ABBOTT Laboratories, North Chicago,IL) que contém antígenos recombinantes do VHC derivados dos genes não-estruturais (5.1.1., c100.3 da região NS4 e c33c da região NS3) e estrutural (c22.3 da região do nucleocapsídeo).

Resumidamente, foram pipetados 10µl de soro, em cada cavidade da placa numerada, e adicionados 400µl do diluente da amostra. Após diluição, fez-se a incubação das amostras com uma esfera de poliestireno recoberta com antígenos recombinantes do VHC, a 40°C, durante uma 1 hora. Neste estágio, as amostras que continham anticorpos ligaram-se à esfera recoberta com antígeno. Todos os resíduos não-unidos à esfera foram eliminados das placas através de lavagens com água destilada ou deionizada. Detectaram-se as imunoglobulinas humanas que se ligaram à fase sólida, incubando-se o complexo esfera-

antígeno-anticorpo, com 200µl de uma solução que contém anticorpos de cabra, dirigidos contra as imunoglobulinas (cadeias pesadas e leves) humanas marcadas com peroxidase de rábano. Após o período de incubação, 30 minutos a 40°C, eliminou-se o conjugado enzimático não-ligado, através de lavagens com água destilada ou deionizada. Em seguida, as esferas foram transferidas para tubos numerados e adicionaram-se 300µl de uma solução de substrato o-feniletildenodiamina 2HCl (OPD) que contém peróxido de hidrogênio e fez-se a incubação no escuro, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Neste período houve uma reação de oxidação do substrato pela enzima, que resultou em uma reação colorimétrica. Depois da incubação, observou-se uma coloração amarelo-alaranjada, cuja intensidade foi diretamente proporcional à quantidade de anti-VHC unido à esfera. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 1ml de ácido sulfúrico 1N, submetendo-se as amostras à leitura no espectrofotômetro a 492nm. Incluíram-se dois controles positivos e três negativos por rotina, e o valor do “cut off” (corte) foi calculado como a média dos controles negativos mais a média dos positivos multiplicadas por 0,25. A análise dos resultados obedeceu critérios baseados nas leituras de densidades ópticas das amostras em relação ao valor de “cut off” do teste. Amostras com densidade óptica acima do valor do “cut off” foram consideradas reagentes. Amostras inicialmente reagentes ou inconclusivas foram testadas em duplicata.

O resultado do anti-VHC foi expresso em uma razão unitária obtida com a divisão da densidade óptica da amostra pelo valor do “cut off” (DO/C). A razão unitária DO/C de cada amostra reagente ou inconclusiva foi calculada pela média das três replicatas. Os soros foram classificados como EIA negativos quando apresentaram valor de DO/C menor que 0,7. EIA fracamente reagente se o valor esteve entre 1,0 e 3,0 e EIA fortemente reagente com DO/C maior que 3,0. Não foi estudada nenhuma amostra na zona cinza entre 0,7 e 0,99.

3.2.1.2. Teste complementar “immunoblot”recombinante (RIBA-2)

Todas as amostras também foram testadas através do RIBA-2 (ORTHO Diagnostics Systems, Raritan, N.J), que tem como base metodológica os testes tradicionais de “Western e Dot blotting”. O RIBA-2 apresenta 4 antígenos recombinantes codificados

pelo VHC, fundidos com superóxido dismutase humana (hSOD), imobilizados como bandas individuais sobre uma membrana de nitrocelulose, no formato de tiras. Os antígenos virais utilizados são derivados dos genes não estruturais do VHC (c33c da região NS3 e c100.3 e 5.1.1 da região NS4) e de um gene estrutural provavelmente da região do nucleocapsídeo (core) c22.3. Os antígenos 5.1.1 e c33c são produzidos por engenharia genética em bactéria (*E. coli*) e c100.3, c22.3 e SOD em levedura (*S. cerevisiae*). Uma banda de controle de hSOD foi incluída na tira para permitir a detecção de anticorpos contra hSOD os quais não são específicos da porção codificadora dos antígenos recombinantes do VHC.

Para o ensaio, utilizaram-se tubos individuais numerados para cada uma das tiras de nitrocelulose e adicionaram-se 1ml de diluente da amostra e 20µl do soro. Os tubos foram agitados por 4 horas à temperatura ambiente, em agitador orbital. Após a incubação, o líquido foi aspirado e cada tubo foi lavado duas vezes com 1ml de tampão de lavagem. Neste 1º estágio, ligaram-se às bandas antigênicas correspondentes os anticorpos contra os antígenos específicos presentes na tira. A remoção de outros componentes do soro ou plasma foi feita por aspiração e lavagem.

Após este período, as tiras de nitrocelulose foram colocadas em uma vasilha, e lavadas três vezes com tampão de lavagem. Então, adicionou-se 1ml de antiimunoglobulina IgG de cabra, conjugada com peroxidase de rábano para cada tira incubando-se no agitador orbital à temperatura ambiente por 30 minutos.

Fez-se a decantação do conjugado e as tiras foram lavadas com 60ml de tampão de lavagem por três vezes. No 2º estágio, ocorreu a ligação do conjugado com a porção IgG humana do complexo antígeno-anticorpo. A remoção de conjugado não-ligado foi feita pela decantação e posteriores passos de lavagens.

Foi adicionado 1ml de substrato (4-cloro-1naftol) para cada tira, e incubou-se em agitador orbital à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Neste estágio, houve ligação do conjugado e ocorreu uma reação colorimétrica da enzima com o substrato, o que gerou um produto colorido insolúvel, azul escuro, em cada banda específica do antígeno do VHC ou para as dos controles. A reação colorida envolve inicialmente a oxidação divalente

da enzima peroxidase pelo peróxido de hidrogênio. Subseqüentemente, a redução da peroxidase do estado inicial, devido a duas interações sucessivas univalentes com o 4-cloro-1-naftol solúvel, resulta em um produto de reação colorido insolúvel, azul escuro. Após o desenvolvimento da cor sobre as tiras, a reação é bloqueada pela remoção dos reagentes por decantação e lavagem.

O substrato foi decantado, e as tiras lavadas duas vezes com água destilada ou deionizada e colocadas sobre papel absorvente para secar, 20 minutos antes da interpretação visual.

O padrão visual das bandas foi resultado da reatividade dos anticorpos específicos ligados a cada antígeno recombinante na tira. Segundo as instruções do fabricante, a amostra foi considerada positiva, quando reagiu (com uma intensidade maior do que a banda de controle interno da tira, IgG humana de baixo nível) com pelo menos duas bandas específicas do VHC na ausência de banda SOD; indeterminada, se somente foi detectada uma banda de antígeno VHC ou se apresentaram uma ou mais bandas com intensidade menor que a banda de controle interno da tira ou SOD e negativa, quando não reagiu com nenhuma banda.

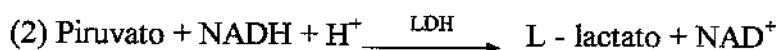
3.2.2. Análise Bioquímica

3.2.2.1. Dosagens de transaminases

As dosagens bioquímicas da alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) foram feitas através de um ensaio cinético quantitativo a 37°C com um “Kit SGPT-Activated” (ABBOTT Laboratories, North Chicago, IL), utilizando-se um analisador automático bicromático (VP-ABBOTT). A reação ocorreu quando a ALT catalizou a transaminação da alanina e α cetogluturato, produzindo piruvato e glutamato, de acordo com a equação:



O piruvato assim produzido (1) foi medido através de uma segunda reação, envolvendo a lactato desidrogenase (LDH):



A taxa de desaparecimento do NADH e o decréscimo resultante na absorbância a 340 nm foram diretamente proporcionais à quantidade produzida de piruvato. A velocidade de reação foi medida após um período de 5 minutos, para que o piruvato endógeno do soro fosse consumido pela reação do LDH (2) e para permitir que a possível apoenzima inativada de SALT (ALT sérica) fosse totalmente ativada pela combinação com sua coenzima específica piridoxal-5-fosfato. O resultado foi definido através da Unidade Internacional (U), definida como a quantidade de atividade enzimática que converteu o substrato em produto, a uma velocidade de 1µm por minuto. A atividade de SALT foi expressa em U/l e considerou-se normal o intervalo de 8,4 a 53,5.

3.2.3. Análise Molecular

Transcrição reversa (RT) e amplificação “nested” pela reação em cadeia da polimerase (PCR):

O método de RT-“nested” PCR utilizado foi o descrito por RAVAGGI, PRIMI & CARIANI (1992), com modificações dos “primers”, temperatura, tempo e números de ciclos. Este método consiste em uma técnica rápida e simples de transcrição reversa e amplificação do RNA do VHC do soro humano, sem necessidade prévia de extração do ácido nucléico (RNA). Para o “nested” PCR foram utilizados dois pares de “primers,” localizados na região 5’ não transcrita do genoma viral (OKAMOTO *et al.*, 1990), sendo um denominado externo (F₁, R₁) e outro interno (F₃, R₃), apresentados na tabela 1. Cada amostra foi submetida ao teste da RT-“nested” PCR pelo menos três vezes, em ensaios diferentes. O resultado final foi obtido pela concordância intertestes, isto é, considerou-se como amostra positiva quando, em pelo menos duas das determinações, pode-se registrar

no gel o produto amplificado. As amostras que apresentaram resultados discordantes foram colhidas novamente, repetindo-se o procedimento anterior desde o início. Foram consideradas negativas para a RT- “*nested*” PCR as amostras que, em triplicata, não apresentaram o produto amplificado visualizado no gel de agarose, corado com brometo de etídio. A inclusão de dois controles negativos (H₂O), um no início e outro ao final de todas as reações, foi considerada essencial para atestar a validade da reação.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos sintéticos

Primers	Posição nucleotídeo (5'-3')	Sequência do oligonucleotídeo(5'-3')
<i>Externo</i>		
Senso (F ₁)	-18 a -38	GGCGACTCCACCATAGATC
Reverso(R ₁)	-341 a -321	GGTGACGGTCTACGAGACCT
<i>Interno</i>		
Senso (F ₃)	-45 a -65	CTGTGAGGAACTACTGTCTTC
Reverso (R ₃)	-301 a -281	CCCTATCAGGCAGTACCACAA

3.2.3.1. Transcrição reversa (RT)

Uma alíquota de 300 a 500µl de soro foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e submetida a desnaturação por 30 segundos, a 92°C. Após desnaturação, as alíquotas foram centrifugadas 15 minutos a 4°C. Do sobrenadante foram retirados 3µl e adicionados diretamente à uma solução de tampão para transcrição reversa (RT Mix). Para solução RT Mix utilizaram-se 50mM Tris - HCl, pH 8.2, 70 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 4mM DTT, 12 unidades de inibidor da ribonuclease placentária humana (RNAguard, Pharmacia Biotech, ref. 27-0815-01), 0,4 % Nonidet P-40, 50 pmoles do “primer” específico Reverso R₁, 250µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP,

dCTP, dGTP, dTTP), 6U da enzima transcriptase reversa (AMV, United State Biochemical, Ohio, USA, ref.70041) em um volume final de 25µl.

Esta solução contendo o material a ser transcrito foi incubada a 42°C, por 60 minutos. Neste passo, o RNA viral presente na alíquota através da ação da transcriptase reversa foi totalmente transcrito em DNA complementar (cDNA). O cDNA sintetizado foi então adicionado diretamente ao tampão de amplificação ou armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.2.3.2. “Nested” PCR

As amostras de cDNA foram amplificadas através da “nested” PCR, técnica adaptada do método proposto por GARSON *et al.*(1990a). Este método propõe duas etapas de amplificação, o que permite um aumento da sensibilidade e fácil visualização do produto em gel de agarose, sem necessidade de hibridização por sonda radioativa. Na primeira etapa, utilizaram-se os “primers” externos F₁ e R₁ (30 ciclos), gerando um produto de 324 pares de bases. Para a segunda etapa foram usados os “primers” internos F₃ e R₃ (30 ciclos), obtendo-se um produto final de 256 pares de bases.

Resumidamente, um total de 5µl de cDNA foi amplificado em 45µl da mistura de reação, contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 8.4, 50mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 100 pmoles de cada “primer” (F₁, R₁), 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2,5 unidades de *Taq* polimerase.(GibcoBRL,18038-042). Após a adição da *Taq* polimerase, a reação foi submetida a repetidos ciclos de variação de temperatura, em um termociclador (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA). Inicialmente, à temperatura 94°C por 5 minutos, para permitir a desnaturação das moléculas de cadeias duplas do DNA alvo para cadeias simples. Após este período de desnaturação inicial, seguiu-se mais 1 minuto a 94°C e o resfriamento a 55°C por 1 minuto, intervalo que permitiu o enovelamento do “primer” com sua respectiva cadeia de DNA. Finalmente, elevou-se a 72° C por 1 minuto, temperatura ótima para a atividade da polimerase, com conseqüente extensão da cadeia complementar de DNA na direção 5’ para 3’. Então,

reverteu-se novamente a 94°C, e repetiu-se por mais 29 ciclos. Ao final da 1ª reação de PCR, uma alíquota do produto (5µl) foi reamplificada (nested), utilizando-se os “primers” F₃ e R₃. O produto final foi então examinado por eletroforese, em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Fotografia “polaroid” em branco e preto foi tirada para registro permanente de cada reação. A fim de testar a especificidade da amplificação pela “nested” PCR, em alguns casos submeteu-se o produto obtido à técnica de seqüenciamento de nucleotídeos.

3.2.3.3. Método de seqüenciamento por incorporação de ³⁵SPdATP

O seqüenciamento dos produtos de PCR, obtidos na amplificação simétrica do DNA, foi realizado utilizando-se o “Kit Sequenase PCR Product”, (United States Biochemical, Cleveland, Ohio, US70170). Este método não requer purificação ou separação do produto amplificado. Toda purificação de gel, sedimentação, filtração e separação magnética são eliminadas pelo uso de duas enzimas, as quais efetivamente removem o excesso de dNTPs e “primers” do DNA amplificado.

A - Pré tratamento enzimático do produto da PCR

Para 5µl do produto da PCR (10 a 20 ng/µl), adicionou-se 1µl de exonuclease I (10U/µl) e 1µl de fosfatase alcalina de camarão (2U/µl), em um volume final de 7µl. Fez-se a mistura e incubou-se a 37°C por 15 minutos, no termociclador. Nesta etapa, as duas enzimas removeram todos os resíduos de dNTPs e “primers” que permaneceram intactos e que podiam interferir com o método normal de seqüenciamento. A inativação destas duas enzimas ocorreu pelo aquecimento a 80°C por 15 minutos. Após este pré-tratamento, o DNA foi submetido à reação de seqüenciamento com a polimerase DNA “sequenase”.

B - Reação de seqüenciamento

A 3µl do produto do PCR tratado (0,5 pmol), foram adicionados 1µl “primer” F3 (5-10 pmol/µl), 6µl de água destilada estéril para um volume final 10µl. Realizou-se a desnaturação por aquecimento a 100°C por 2 a 3 minutos, e imediatamente resfriou-se em banho de gelo, por 5 minutos. A seguir, iniciou-se a reação de marcação e síntese da fita complementar, utilizando-se 5µCi de ³⁵SdATP, 3,2U de “sequenase” DNA polimerase, 1µl DTT 0,1 M, 2µl do tampão 5x concentrado e 2µl de desoxinucleotídeos trifosfato (dGTP, dCTP, dTTP 7, 5µM) diluídos na proporção de 1:5 em água. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota de 3,5 µl foi então transferida para cada um dos 4 tubos, contendo quantidades limitadas de 2,3-ddNTP (2,3-ddATP; 2,3- ddCTP; 2,3-ddGTP; 2,3-ddTTP) e 2-dNTP, previamente aquecidos a 37°C por 1 minuto. A adição dos didesoxinucleotídeos trifosfato provoca a terminação das cadeias sintetizadas, enquanto o excesso de dNTP produz a polimerização das cadeias sintetizadas em que nenhum ddNTP foi incorporado. Após a transferência, prolongou-se a incubação a 37°C por 10 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 4µl de uma solução de formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%.

O gel de seqüenciamento consistia de um gel de poliacrilamida 8% em tampão taurino 0,8 x concentrado (Glicerol-tolerant gel buffer-United States Biochemical, Cleveland, OH -cat. 71949), uréia 8M em placas de 33x38cm, com espessura de 0,4 mm.

Aproximadamente 4µl do produto da reação do seqüenciamento foi desnaturado a 100°C por 5 minutos e aplicados no gel. O TEB diluído 1:20 foi o tampão utilizado na eletroforese realizada a 75W por 2 a 3 horas à temperatura ambiente. O gel foi seco a 80°C colocado em um cassete com filme de raio-X, e a auto-radiografia foi revelada após 16 horas de exposição.

3.2.4. Análise Histopatológica

Foram levantados no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica os blocos parafinados de biópsia hepática dos 121 pacientes selecionados para o estudo e enviados para o preparo das lâminas. As lâminas foram submetidas às colorações pela hematoxilina eosina (HE), Tricrômio de Masson, Gomori (para fibras reticulínicas) e Perls. De acordo com as alterações histológicas observadas, os diagnósticos foram classificados em: inespecíficos (esteatose, figado reacional) e hepatites crônicas e cirrose. A presença ou ausência de necrose hepatocelular periportal (piece-meal necrosis) permitiu subdividir as hepatites crônicas em ativa ou persistente, sendo as ativas graduadas em leve, moderada e intensa, dependendo do grau de atividade. Os cortes foram feitos em série de 5 por bloco selecionado, com espessura de 3 a 5 μm e preparados sobre lâminas com silano, numeradas em ordem crescente. O último corte destinou-se à coloração pela hematoxilina-eosina (HE), com intuito de se verificar a integridade e quantidade presentes de tecido hepático. As outras lâminas foram utilizadas nas técnicas de imuno-histoquímicas.

3.2.4.1. Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E.)

Esta é a técnica utilizada habitualmente em laboratórios para estudos morfológicos, permitindo evidenciar as estruturas celulares presentes. Nesta casuística, utilizou-se a técnica descrita por ALLEN (1992).

3.2.4.2. Técnica de imuno-histoquímica

A - Preparação das lâminas com silano

A utilização do silano nas lâminas tem como finalidade permitir uma maior adesão dos cortes possibilitando tratamentos drásticos do material, como os exigidos por técnicas de imuno-histoquímica com microondas.

As lâminas foram lavadas, enxaguadas e colocadas em um suporte e a seguir, mergulhadas em uma solução de HCl 1N, por 20 minutos. Foram mergulhadas em três cubas de água destilada por cinco vezes, passando-se, em seguida, no álcool absoluto. As

lâminas foram incubadas em uma solução de álcool absoluto e ácido acético 3:1 por 20 minutos e, a seguir, deixadas na estufa, para secar, por 5 minutos. Este procedimento é necessário para desengordurá-las totalmente e possibilitar a adesão do silano.

Para isto, as lâminas foram incubadas por 5 minutos em uma solução de “organosilano” a 2% em acetona (Organosilano-3’aminopropiltrietoxisilano, Sigma 919-30-2). A seguir, mergulhadas em duas cubas de acetona pura por 5 vezes. Para o enxagüe, utilizaram-se duas cubas com água destilada, onde as lâminas foram mergulhadas três vezes. Foram secas ao ar livre e armazenadas em caixas até o momento do uso.

B - Reação de imunoperoxidase

Esta reação permite a localização de antígenos celulares via enzima peroxidase, em conjugação com um anticorpo específico. A visualização dos imunocomplexos formados é possível através da reação colorimétrica da enzima com o substrato, que gera um produto colorido insolúvel que se precipita no local da reação. A reação é proporcional à quantidade de antígeno e os componentes celulares são contrastados através da contra-coloração, com hematoxilina de Mayer. Para detecção do antígeno no tecido, foi usado o anticorpo específico primário monoclonal anti-HCV (clone TORDJI-32, Clonatec, Biosoft-Paris, ref. 217-90), o anticorpo secundário conjugado com a biotina (Multi link, Dako, ref. E453) e o complexo de peroxidase conjugado à estreptavidina e biotina (S-ABC, Dako, ref. K377).

A estreptavidina contém quatro sítios para ligação da biotina, um dos quais deverá ser ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros três acoplados ao complexo biotina peroxidase da reação.

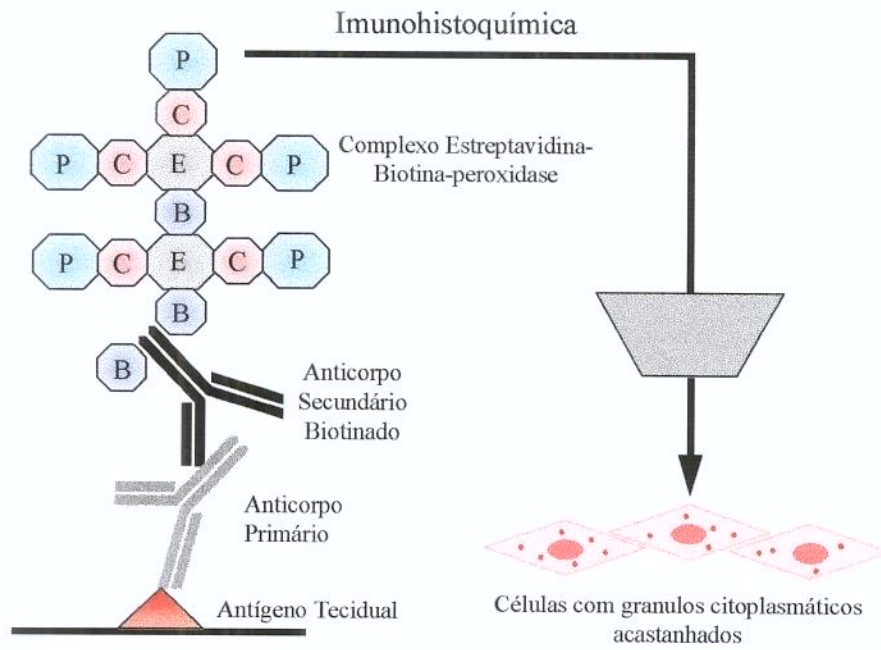


Figura 3. Representação esquemática da reação de imuno-histoquímica em tecido.

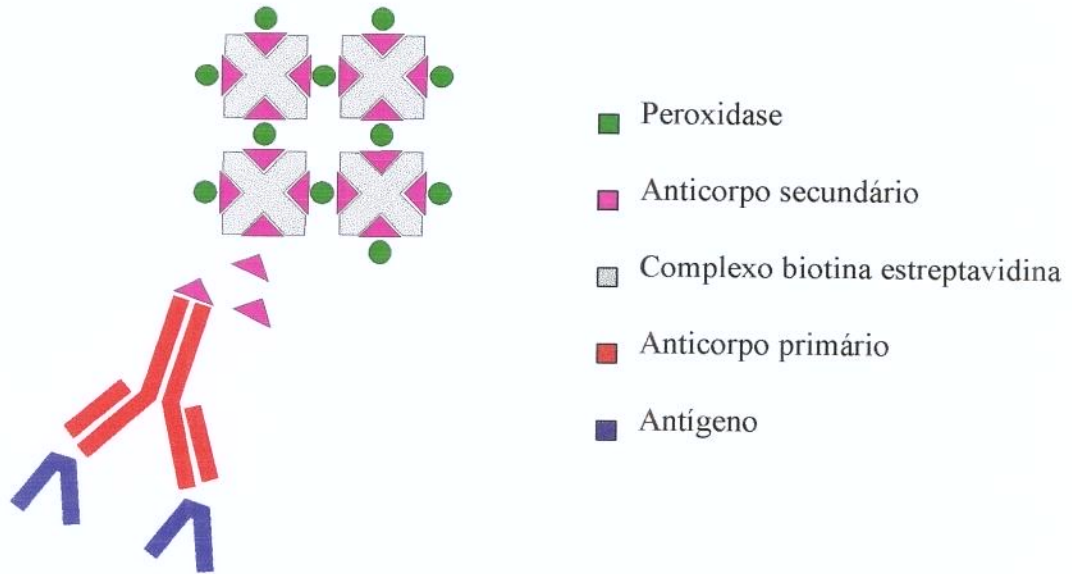


Figura 3a. Representação esquemática do sistema de revelação estreptavidina-biotina-peroxidase

Sumariamente, cortes de 3µm de tecido de biópsia hepática foram colados em lâminas previamente silanizadas. As lâminas com os cortes foram deixadas à temperatura ambiente até o momento da reação imuno-histoquímica, conforme recomendado por HSU, RAINE & FANGER (1981).

Procedeu-se à desparafinação das lâminas através de banho em xilol a 60°C por 15 minutos, seguido por dois banhos de xilol à temperatura ambiente, durante 10 minutos cada um, para retirar o excesso de parafina. A hidratação do material foi realizada em gradiente decrescente de álcoois à temperatura ambiente, através de três banhos: uma de álcool absoluto, 2 minutos; outro em álcool 80%, por 2 minutos e finalmente em álcool 50%, 2 minutos. Seguiu-se à lavagem em água corrente por 2 minutos e passagem em água destilada. Com a finalidade de inibir-se a peroxidase endógena, preparou-se um banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após este banho, as lâminas foram lavadas em água corrente e passadas em água destilada. Em seguida, procedeu-se à digestão enzimática, com uso de uma solução de 0,1% de protease (Protease tipo XXIV, Sigma ref. 8038) diluída em solução tampão de tris- HCl 0,5M pH 7,5 por 30 minutos. Como alternativa, foi realizada a recuperação antigênica em forno de microondas com tampão de citrato pH 6,0, duas vezes, por 5 minutos em ebulição. Incubou-se em seguida em tampão PBS pH 7,6 (tampão salina-fosfato). Visando evitar que o anticorpo primário se ligue a outros antígenos do tecido (reação inespecífica de fundo) fez-se a incubação das lâminas com soro não-imune de um animal diferente daquele onde é produzido o anticorpo primário, e de preferência, igual ao secundário. O soro normal utilizado foi o de suíno, na diluição de 1:10, com incubação por 20 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. A seguir, retirou-se o excesso de soro normal, sem lavagem posterior. Procedeu-se então à incubação com o anticorpo primário anti-HCV (clone TORDJI 32, Clonatec, Biosoft-Paris) monoclonal produzido em camundongo, diluição 1:10 em PBS com 0,1% de soro albumina bovina, pela noite (14 a 16 hs) a 4°C. Após o período de incubação, retirou-se o excesso do anticorpo primário e seguiram-se três lavagens, de 5 minutos cada, em PBS à temperatura ambiente. A seguir, incubou-se com anticorpo secundário (Multi Link, Dako), diluição 1:200 em tampão PBS com azida, durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após a retirada do excesso do anticorpo secundário biotilado, seguiram-se três lavagens em PBS, 5 minutos cada uma,

em temperatura ambiente. Seguiu-se, então, a incubação com o complexo S-ABC (Dako), diluição 1:50 em tampão PBS, 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, colocando-se, então, em uma cuba com tampão PBS. A etapa de coloração foi realizada com DAB (3,3''tetra-hidrocloroeto diamino-benzidina, Sigma D5637), substância cromogênica que produz uma coloração marrom impregnando o local de reação. A preparação do DAB foi feita adicionando-se 40mg de DAB em 100ml de tampão PBS e 40µl de peróxido de hidrogênio 30%. As lâminas foram deixadas na solução cerca de 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente, ou até visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente e passadas em água destilada. Finalmente, realizou-se a contracoloração com hematoxilina de Mayer, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a lavagem em água corrente com algumas gotas de amoníaco, para evidenciar a contracoloração e obter-se um contraste melhor.

Para montagem das lâminas procedeu-se à desidratação com três passagens em álcool absoluto, acompanhados de quatro banhos em xilol. Em seguida, montaram-se as lâminas com Entellan (Merck, No7961), fazendo-se então a leitura ao microscópio óptico comum.

3.2.4.3. Reação imunofluorescência (IF)

A reação de imunofluorescência indireta baseia-se na ligação de um anticorpo monoclonal (primário), não-marcado, com um antígeno específico no tecido, que é revelado por um anticorpo secundário marcado com um fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína-FITC), que foi produzido em outra espécie de animal, contra o anticorpo primário. A leitura foi feita em microscópio de imunofluorescência. Para detecção do antígeno do VHC no tecido hepático, foram utilizados o anticorpo monoclonal primário específico anti-VHC (clone TORDJI-32, Clonatec Biosoft-Paris, ref. 217-90) e o anticorpo secundário conjugado com FITC (Anti-mouse IgG , Fab specific, -FITC, Sigma, ref. 5262). A técnica, a seguir, constava nas especificações do fabricante.

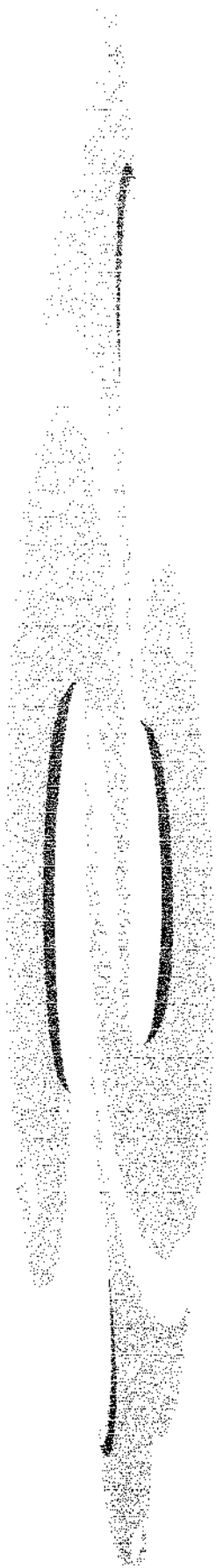
Resumidamente, aderiram-se secções de 2 a 3µm de tecido hepático a lâminas com silano. As lâminas preparadas permaneceram à temperatura ambiente até o momento

da reação. Procedeu-se à desparafinação das mesmas através de banho de xilol a 60°C, por 15 minutos, seguido por outro banho de xilol à temperatura ambiente, por 10 minutos, para retirar-se o excesso de parafina. A hidratação do material foi realizada em gradiente decrescente de álcoois à temperatura ambiente, através de três banhos: um de álcool absoluto, 2 minutos; outro em álcool 80%, por 2 minutos e finalmente em álcool 50%, 2 minutos. A reidratação foi completada pela permanência das lâminas em banho contendo solução de PBS pH 7,2 por 30 minutos. Em seguida fez-se o tratamento do material pela digestão enzimática, com uma solução de 0,1% de protease tipo XXIV (Sigma) diluída em uma solução de tampão tris-HCl 0,5M pH 7,5, a 37°C por 30 minutos. A digestão enzimática permite uma melhor exposição dos antígenos levando a uma marcação mais efetiva dos antígenos específicos. Após a digestão enzimática, fez-se a transferência das lâminas para um banho com PBS pH 7,2, por 5 minutos. A seguir, o excesso de PBS foi retirado e as lâminas incubadas com anticorpo primário anti-HCV monoclonal produzido em camundongo, diluição 1:10 em PBS, com 0,1% de soro albumina humana, mantendo-se em temperatura ambiente por 2 horas. Após o período de incubação, retirou-se o excesso de anticorpo primário e fez-se transferência das lâminas para um banho em PBS pH 7,2 por 30 minutos. Em seguida, aplicou-se o conjugado marcado com FITC, (desenvolvido em cabra) contra anticorpos de camundongo (antimouse FITC conjugate, Sigma, ref.5262), diluído 1:150, incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a retirada do excesso do conjugado, transferiram-se as lâminas para o banho com PBS pH 7,2 por 5 minutos. Após esta etapa, foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5 e lamínula, cobertas e imediatamente levadas à leitura no microscópio de imunofluorescência equipado com epiiluminação. As lâminas foram analisadas e fotografadas com filme Ektachrome 100.

3.2.5. Análise Estatística

Na análise estatística deste trabalho foram utilizados os testes de X^2 e o teste exato de Fisher.



4. *RESULTADOS*

4.1. RESULTADOS DO ELISA E RIBA

Dos 178 doadores de sangue, 147 (82,6%) foram classificados como EIA reagentes (≥ 1) e 31 (17,4%) como EIA não-reagentes ($< 0,7$). Do total de 178 amostras, 130 (73%) foram EIA fortemente reagentes ($EIA \geq 3$), 17 (9,6%) EIA fracamente reagentes ($EIA \geq 1$ e < 3) e 31 (17,4%) não apresentaram reatividade para o EIA ($< 0,7$). Entre os 130 doadores de sangue $EIA \geq 3$ (fortemente positivos), 6 (4,6%) apresentaram valores normais de ALT (< 1), enquanto que 124 (95,4%) apresentaram alterações nos níveis de ALT (> 1). Destes 124, em 52 (41,9%) os níveis de ALT variaram de 1 e 2 vezes o valor normal e em 72 (58,1%) foram 2 vezes maiores. Entre os 17 doadores com $EIA \geq 1$ e < 3 (fracamente reagentes), 9 (52,9%) apresentaram níveis de ALT dentro dos padrões normais e 8 (47,1%) tiveram os níveis de ALT aumentados. Destes 8 EIA fracamente reagentes e com ALT aumentada, 6 (75%) apresentaram os níveis de ALT entre 1 e 2 vezes o valor normal, enquanto apenas em 2 (25%) o valor de ALT foi 2 vezes maior. Nos 31 indivíduos considerados $EIA < 0,7$, todos apresentaram valores de ALT dentro dos padrões de normalidade. Ao final, quando se analisou apenas o padrão de ALT encontrado na amostra, verificou-se que em 46 (25,8%) os níveis de ALT foram normais e em 132 (74,2%) encontravam-se aumentados.

Usando-se o teste de χ^2 podem ser observadas evidências de associação entre o grau de positividade do EIA e o nível de ALT ($p < 0,05$). Estes dados estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição dos 178 doadores de sangue com base no resultado do EIA e os valores do ALT observados na amostra.

	ALT* > 1									
	ALT* = 1		ALT* 1-2		ALT* > 2		Subtotal		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
EIA* ≥ 3	6	(4,6)	52	(41,9)	72	(58,1)	124	(95,4)	130	(100)
EIA* ≥ 1 e < 3	9	(52,9)	6	(75)	2	(25)	8	(47,1)	17	(100)
EIA* < 0,7	31	(100)	--	--	--	--	--	--	31	(100)
Total	46	(25,8)	58	--	74	--	132	(74,2)	178	(100)

EIA* = Densidade óptica da amostra / valor de corte

ALT* = valor em UI/l da amostra / valor em UI/l normal

Na tabela 4, observa-se que dos 130 doadores de sangue EIA fortemente reagentes (≥ 3), 126 (96,9%) apresentaram resultados positivos pelo RIBA-2, enquanto que apenas 4 (3,1%) mostraram resultados indeterminados. Nenhum destes doadores foi negativo. Entre os 17 considerados EIA fracamente reagentes (≥ 1 e < 3), encontraram-se 9 (53,0%) RIBA-2 positivos, 4 (23,5%) indeterminados e 4 (23,5%) negativos. No grupo considerado controle (EIA $< 0,7$), os 31 doadores tiveram resultados negativos no RIBA-2. Das 178 amostras submetidas ao RIBA, 135 (75,8%) apresentaram resultados positivos, 8 (4,5%) foram indeterminados e 35 (19,7%) resultaram negativos. Utilizando-se o teste exato de Fisher pode-se concluir que existem evidências de associação entre os resultados do EIA e do RIBA-2 ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Distribuição dos valores dos 178 doadores de sangue, considerando-se os resultados do EIA em relação ao teste complementar RIBA-2 .

	RIBA							
	Positivo		Indeterminado		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
EIA ≥3	126	(96,9)	4	(3,1)	--	--	130	(100)
EIA ≥1 e <3	9	(53,0)	4	(23,5)	4	(23,5)	17	(100)
EIA <0,7	--	--	--	--	31	(100)	31	(100)
Total	135	(75,8)	8	(4,5)	35	(19,7)	178	(100)

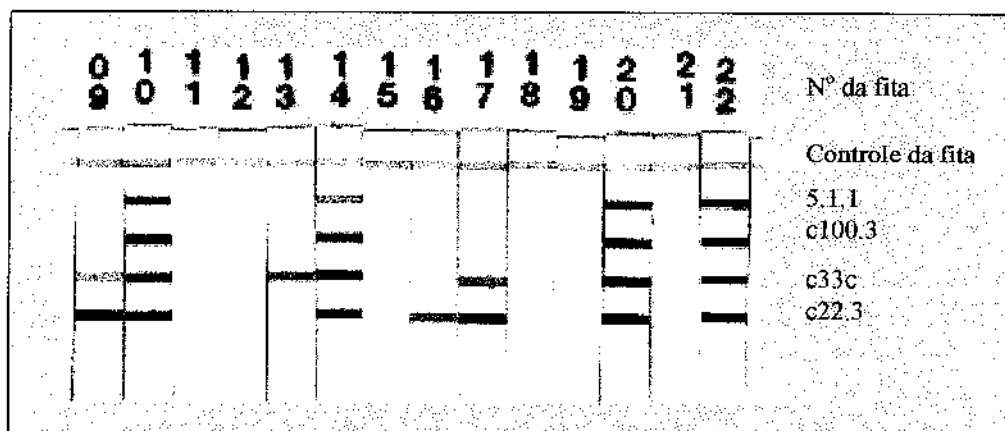


Figura 4. Resultado do RIBA para anticorpos ao VHC: 9 - controle positivo (padrão +2); 10 - controle positivo (padrão +4); 11 - controle negativo; 12,18,19 - pacientes com RIBA negativo (padrão 0); 13 e 16 - paciente com RIBA indeterminado (padrão +1); 14,20 e 22 - paciente RIBA positivo (padrão +4); 15 e 21 - paciente RIBA indeterminado (padrão +2 fraco e +3 fraco) e 17 - paciente RIBA positivo (padrão +2).

Na tabela 5, estratificaram-se os 178 doadores de sangue de acordo com a razão de positividade do EIA, associado ao valor de ALT, e com os resultados de RIBA. Entre os EIA ≥3, o RIBA mostrou-se positivo em 6 (100%) dos indivíduos com ALT normal e em

120 (96,8%) dos indivíduos com ALT aumentada. Apenas em 4 (3,2%) dos EIA fortemente reagentes (≥ 3) com ALT aumentada encontrou-se o resultado de RIBA indeterminado. Nenhum indivíduo com $EIA \geq 3$ foi negativo pelo RIBA, independentemente dos níveis de ALT dosados. No grupo dos $EIA \geq 1$ e < 3 , nota-se que, entre os indivíduos com ALT normal, 4 (44,4%) foram positivos, enquanto entre os 8 indivíduos com ALT aumentada, foram 5 (62,5%). Todos os indivíduos RIBA negativos encontrados neste estudo apresentavam ALT normais e $EIA \geq 1$ e < 3 . No grupo com $EIA < 0,7$, todos os indivíduos apresentaram níveis de ALT normais e o RIBA negativo.

Tabela 5 - Resultados de EIA associados aos níveis de ALT e o resultado do RIBA II, nos 178 doadores de sangue estudados.

	RIBA								
	Positivo		Indeterminado		Negativo		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
ALT • 1	6	(100)	--	--	--	--	6	(100)	
EIA ≥ 3.									
ALT > 1	120	(96,8)	4	(3,2)	--	--	124	(100)	
ALT • 1	4	(44,4)	1	(11,2)	4	(44,4)	9	(100)	
EIA ≥ 1 e < 3									
ALT > 1	5	(62,5)	3	(37,5)	--	--	8	(100)	
EIA < 0,7	ALT • 1	--	--	--	--	31	(100)	31	(100)
Total	135	(75,8)	8	(4,5)	35	(19,7)	178	(100)	

Os dados sumarizados na Tabela 6 mostram que, dos 147 doadores de sangue EIA reagentes, 135 (91,8%) apresentaram resultado do RIBA positivo, 8 (5,5%) indeterminados, e 4 (2,7%), negativos. Analisando-se os dois subgrupos de EIA, nota-se que nos EIA ≥ 3 com ALT normal e EIA ≥ 1 e < 3 com ALT normal, ocorreram 100 e 44,5% de positividade, respectivamente, para o RIBA. Nos indivíduos EIA fortemente reagentes (≥ 3) com ALT aumentada de 1 a 2 vezes o valor normal, houve 98,1% de positividade ao RIBA, em contraste com os 66,7% observados no subgrupo EIA ≥ 1 e < 3 com ALT também aumentada de 1 a 2 vezes o normal. No subgrupo de EIA fortemente reagente (≥ 3) e ALT maior que 2 vezes o normal, nota-se 95,8% de positividade para o RIBA, enquanto no subgrupo EIA fracamente reagente (≥ 1 e < 3) com ALT também maior (2 vezes) que o valor normal, notam-se 50% de soropositividade para o RIBA. Nota-se que no subgrupo de EIA ≥ 3 e ALT normal ausência de resultados indeterminados ou negativos no RIBA, e 11% de RIBA indeterminado e 44,5% de resultados RIBA negativo no subgrupo EIA ≥ 1 e < 3 e ALT normal. Verifica-se ainda que, entre os EIA ≥ 3 com ALT aumentada, encontraram-se resultados de RIBA indeterminados (1,9%) nos indivíduos com níveis de ALT 1 a 2 vezes maior que o normal e 4,2% entre indivíduos com ALT 2 vezes maior que o normal. Contrastando com isso, observou-se que havia 33,3% de RIBA indeterminado no subgrupo com EIA ≥ 1 e < 3 e ALT 1 a 2 vezes o valor normal e 50,0% de RIBA indeterminado entre doadores com EIA ≥ 1 e < 3 e ALT maior que o normal (2 vezes).

Tabela 6 - Análise dos 147 doadores de sangue que apresentaram EIA reagente associado aos diferentes níveis de ALT, considerando-se sua correlação com os resultados de RIBA-2.

		RIBA							
		Positivo		Indeterminado		Negativo		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
EIA ≥ 3	ALT•1	6	(100)	--	--	--	--	6	(100)
	ALT1-2	51	(98,1)	1	(1,9)	--	--	52	(100)
	ALT>2	69	(95,8)	3	(4,2)	--	--	72	(100)
EIA ≥ 1 e < 3	ALT•1	4	(44,5)	1	(11,0)	4	(44,5)	9	(100)
	ALT1-2	4	(66,7)	2	(33,3)	--	--	6	(100)
	ALT>2	1	(50,0)	1	(50,0)	--	--	2	(100)
Total		135	(91,8)	8	(5,5)	4	(2,7)	147	(100)

Na Tabela 7, buscou-se associar as bandas presentes no RIBA-2 aos dados de EIA e ALT. Entre os EIA fortemente reagentes (≥ 3) e nível de ALT normal ($\bullet 1$), encontraram-se 6 (100%) casos com reatividade contra os 4 antígenos presentes. Na análise dos EIA ≥ 3 com ALT aumentada (>1), foram encontrados 78 (63%) casos com reatividade aos 4 antígenos, 22 (17,7%) com positividade para duas bandas, sendo que 21 (16,9%) apresentavam reatividade para as bandas c22.3 e c33c e 1 (0,8%) para as bandas 5.1.1 e c100.3. Observaram-se, ainda, entre os EIA ≥ 3 com ALT >1 , 20 (16,2%) com reatividade para 3 antígenos, sendo 15 (12,1%) positivos para o c100.3; c22.3; c33c, e 5 (4,1%) para os antígenos 5.1.1; c22.3; c33c. Entre os EIA fracamente reagentes (≥ 1 e < 3), com nível de ALT $\bullet 1$, encontraram-se 4 (44,4%) indivíduos com RIBA negativo, 1 (11,2%) RIBA

indeterminado com reatividade para a banda c22.3 e 4 (44,4%) com RIBA positivo e presença de 4 bandas. Porém, entre os EIA fracamente reagentes (≥ 1 e < 3) e com níveis de ALT aumentado (> 1), 5 (62,5%) apresentavam reatividade às 4 bandas, 3 (37,5%) foram considerados como indeterminados, sendo 2 (25%) reativos à banda c22.3 e 1 (12,5%) com reatividade ao c33c.

Tabela 7 - Distribuição dos 147 doadores de sangue com EIA positivo, com diferentes níveis de ALT associados às bandas presentes no RIBA-2.

RIBA	EIA ≥ 3				EIA ≥ 1 e < 3				TOTAL	
	ALT < 1		ALT > 1		ALT < 1		ALT > 1			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausência de bandas	--	--	--	--	4	(44,4)	--	--	4	(2,7)
(c22.3)	--	--	4	(3,2)	1	(11,2)	2	(25)	7	(4,8)
(c33c)	--	--	--	--	--	--	1	(12,5)	1	(0,7)
(c 22.3;c33c)	--	--	21	(16,9)	--	--	--	--	21	(14,2)
(c100.3; 5.1.1)	--	--	1	(0,8)	--	--	--	--	1	(0,7)
(c100.3; c22.3; c33c)	--	--	15	(12,1)	--	--	--	--	15	(10,2)
(5.1.1; c22.3; c33c)	--	--	5	(4)	--	--	--	--	5	(3,4)
(5.1.1; c100.3;c22c;c33c)	6	(100)	78	(63)	4	(44,4)	5	(62,5)	93	(63,3)
Total	6	100	124	100	9	100	8	100	147	(100)

4.2. RESULTADOS DE RT-“NESTED” PCR

Na Tabela 8, foram sumarizados os dados correspondentes aos resultados encontrados nas amostras dos 178 doadores de sangue, quando submetidos ao teste de RT-PCR. Entre o grupo de indivíduos EIA fortemente reagentes (≥ 3), foram encontrados 119 (91,5%) resultados de RT-PCR positivos, enquanto entre os EIA fracamente reagentes (≥ 1 e < 3) apenas 3 (17,6%) apresentaram positividade à RT-PCR. Na análise dos resultados

negativos para RT-PCR, observa-se que entre os EIA fortemente reagentes houve apenas 11 (8,5%) e 14 (82,4%) foram entre os indivíduos EIA fracamente reagentes (≥ 1 e < 3). Quanto aos EIA não-reagentes ($< 0,7$), todos se apresentaram negativos à pesquisa pela RT-PCR. Na análise dos 147 doadores do grupo dos EIA positivos estudados, 122 (83,0%) apresentaram positividade quando submetidos à pesquisa RT-PCR e 25 (17,0%) mostraram resultados negativos para RT-PCR.

A análise dos dados, usando-se o teste exato de Fisher, mostrou uma forte associação entre os resultados do EIA e da RT-PCR ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Correlação entre os resultados do EIA e do RT-PCR do VHC nos 178 doadores de sangue.

EIA	RT-PCR positivo		RT-PCR negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
≥ 3	119	(91,5)	11	(8,5)	130	(100)
≥ 1 e < 3	3	(17,6)	14	(82,4)	17	(100)
$< 0,7$	--	--	31	(100)	31	(100)
Total	122	(68,5)	56	(31,5)	178	(100)

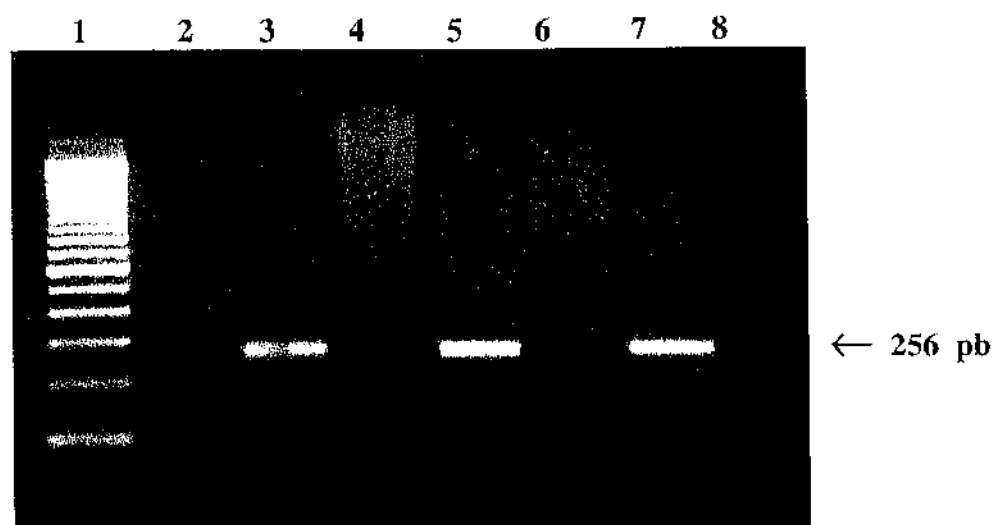


Figura 5. Produto de amplificação do RNA do VHC por RT-“nested” PCR, em eletroforese de gel de agarose corado com brometo de etídio.

- Linha 1 - Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).
 2 - Controle negativo.
 3 - Controle positivo.
 4, 5, 6, 7 e 8 - Amostras de doadores de sangue EIA positivos.

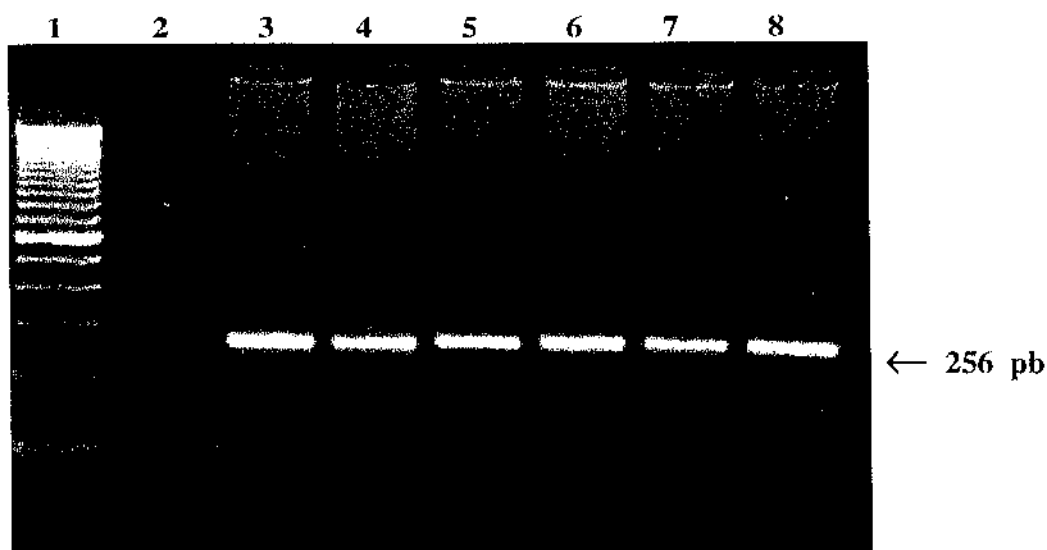


Figura 6. Produto de amplificação do RNA do VHC por RT-“nested” PCR, amostras de soro de doadores positivos para anticorpos ao VHC por EIA. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

- Linha: 1 - Marcador de peso molecular (Ladder - 100pb)
 2 - Controle negativo
 3, 4, 5, 6, 7 e 8 - Soros de doadores positivos para anti-VHC por EIA.

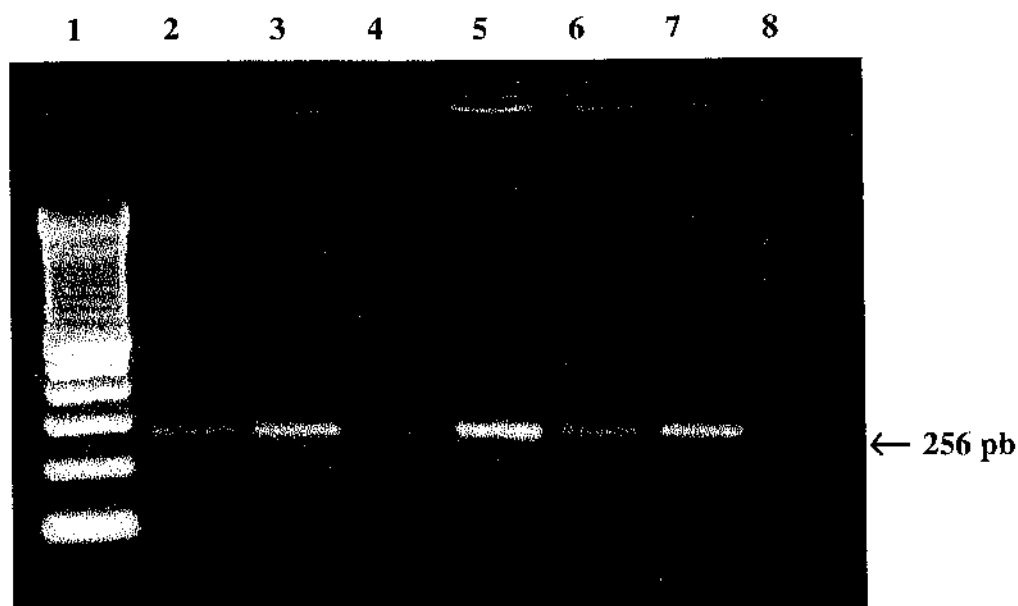


Figura 7. Produto de amplificação do RNA do VHC por RT-“nested” PCR, em eletroforese de gel de agarose corado com brometo de etídio.

- Linha 1 - marcador de peso molecular (Ladder 100pb).
 2 - controle positivo.
 3, 4, 5, 6, e 7 - Soros de doadores EIA anti-VHC positivos.
 8 - controle negativo.

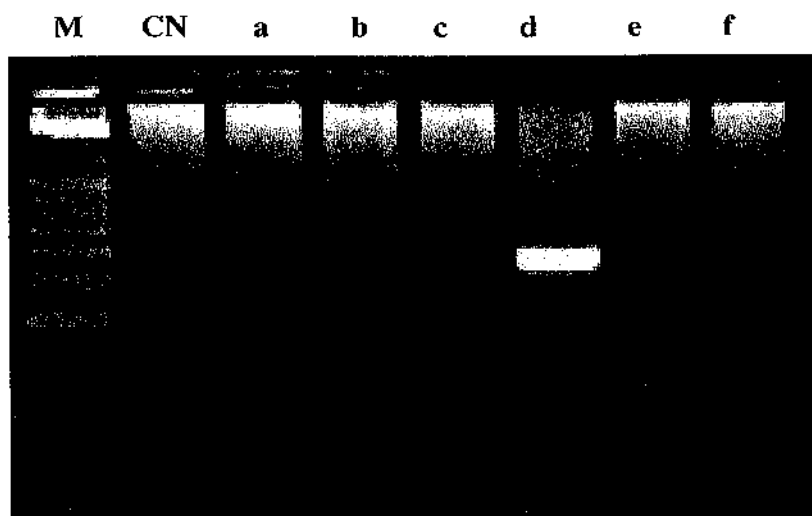


Figura 8. Produto de amplificação do RNA do VHC por RT “nested” PCR em amostras de pacientes. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

- M - marcador de peso molecular (Ladder 100 pb)
 CN - controle negativo
 a,b,c,e,f - Amostras de doadores negativos para pesquisa do RNA do VHC (VHC-EIA positivo)
 e - Amostra de doador positivo para pesquisa do RNA do VHC (VHC-EIA positivo)

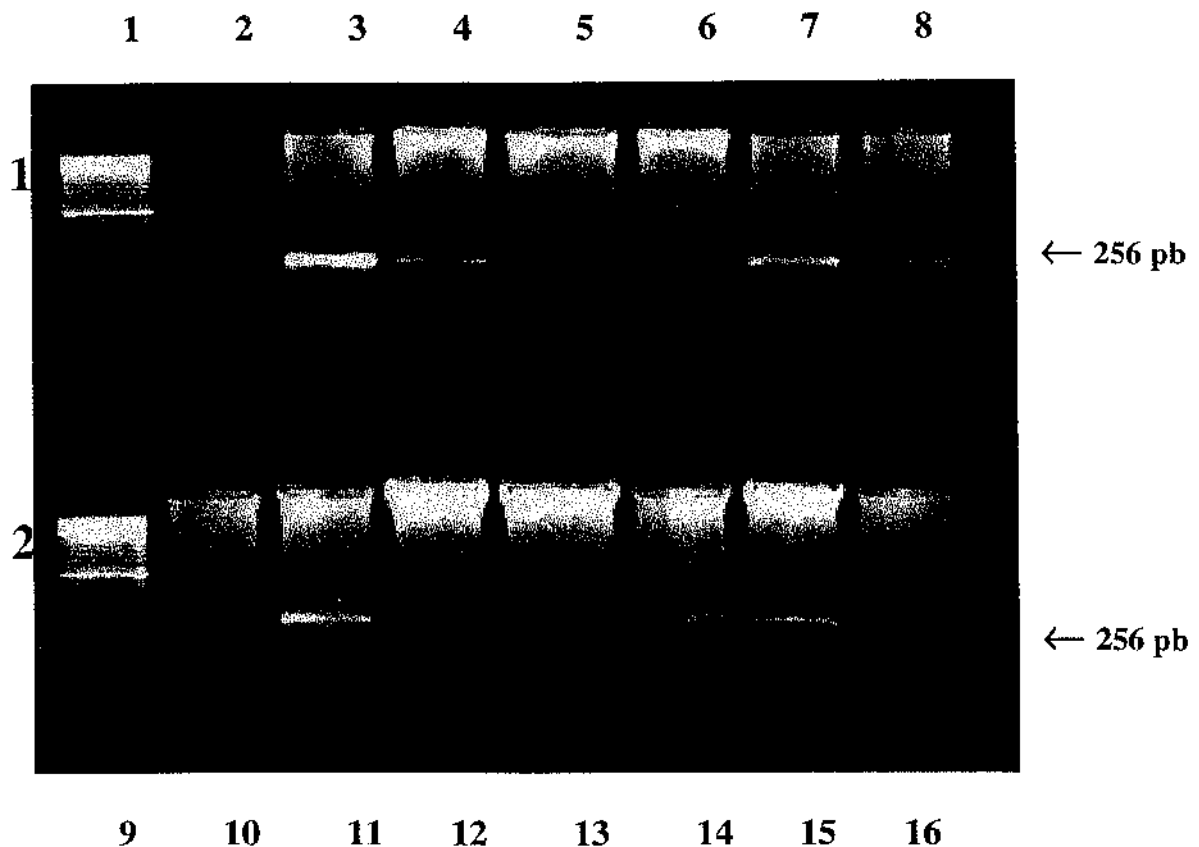


Figura 9. Gel de agarose corado com brometo de etídio de RNA do VHC em amostras de doadores de sangue, após amplificação por RT“nested” PCR. (“Primers” da região 5’ não-transcrita)

Linhas: 1 e 9 - Marcador de peso molecular (Ladder 100pb)

2 - Controle negativo (H₂O)

3 - Controle positivo

4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 - Doadores de sangue anti-VHC positivos por EIA.

4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15 - Amostras de doadores positivos para pesquisa do RNA-VHC.

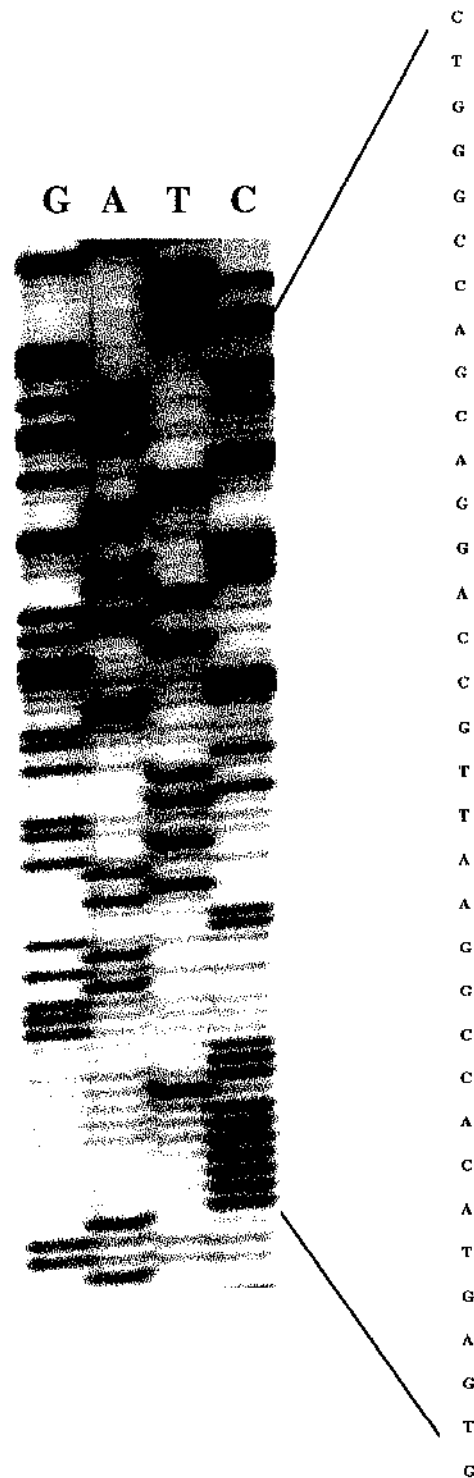


Figura 10. Auto-radiografia do gel de seqüenciamento do fragmento de DNA de pacientes, amplificado e seqüenciado com o "primer" F₃ da região 5'NCR do VHC.

Como controle da especificidade do fragmento de DNA amplificado, algumas amostras foram submetidas ao seqüenciamento de nucleotídeos. Os dados obtidos mostraram-se de acordo com a seqüência de nucleotídeos descrita para o vírus C. A figura 10 representa a porção seqüenciada da amostra que corresponde à região 5' NCR do VHC(-120 A 169), idêntica à descrita na literatura (TANAKA *et al.*, 1992).

Na análise da Tabela 9, pode-se observar que entre os doadores EIA positivos com níveis de ALT normais, 8 (53,3%) mostraram-se positivos pelo método da RT-PCR., e 7 (46,7%) negativos. Em contrapartida, entre os doadores com níveis de ALT >1, 114 (86,4%) mostraram resultados da RT-PCR positivos e 18 (13,6%), negativos. Utilizando-se o teste exato de Fisher, pode-se observar na população EIA positiva, forte associação entre os níveis de ALT e o resultado da RT-PCR ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Nível de ALT comparado com os resultados do RT-PCR para o VHC entre 147 doadores de sangue positivos pelo EIA.

Nível de ALT	RT-PCR positivo		RT-PCR negativo		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
•1	8	(53,3)	7	(46,7)	15	(100)
>1	114	(86,4)	18	(13,6)	132	(100)
Total	122	(83,0)	25	(17,0)	147	(100)

Os dados relacionados na Tabela 10 mostram que, entre os indivíduos EIA positivos com resultado de RIBA positivo, 116 (85,9%) apresentavam RNA do VHC nos soros que foram detectados pela RT-PCR, enquanto que em 19 (14,1%) os resultados foram negativos. Entre a população RIBA indeterminado, conseguiu-se detectar a presença do VHC em 6 (75%) pela RT-PCR, e em 2 (25%) os resultados foram negativos. Todos os indivíduos que apresentaram RIBA negativo também se mostraram negativos pela RT-PCR. O teste exato de Fisher permitiu observar evidências de associação entre o RIBA e a RT-PCR ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Correlação entre os resultados de RIBA II dos 147 doadores EIA positivos e da RT-PCR.

RIBA	RT-PCR positivo		RT-PCR negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	116	(85,9)	19	(14,1)	135	(100)
Indeterminado	6	(75)	2	(25)	8	(100)
Negativo	--	--	4	(100)	4	(100)
Total	122	(82,9)	25	(17,1)	147	(100)

Na Tabela 11a foram sumarizados os dados dos dois subgrupos EIA reagentes que apresentaram resultado de RIBA positivo, correlacionadas com o resultado da RT-PCR. Houve 100% de positividade para a RT-PCR no subgrupo EIA ≥ 3 e ALT $\cdot 1$, e 90,8% no EIA ≥ 3 e ALT >1 . Neste subgrupo (EIA ≥ 3 /ALT >1) foram observados 11 (9,2%) resultados de RT-PCR negativos. Analisando-se o subgrupo EIA ≥ 1 e <3 e ALT normal, todos apresentaram resultados negativos para a RT-PCR. Entre os EIA ≥ 1 e <3 com ALT alterada, 1 (20%) doador foi encontrado com RT-PCR positivo e 4 (80%) com resultados negativos para a RT-PCR. Assim, entre os doadores de sangue com RIBA positivo, 116 (85,9%) apresentaram RT-PCR positivos e 19 (14,1%) tiveram resultados da RT-PCR negativos.

Tabela 11a - Resultados dos EIA associados aos níveis de ALT, entre os RIBA positivos, correlacionados com o resultado da RT-PCR.

RT-PCR	RIBA positivo						
	RNA-VHC positivo		RNA-VHC negativo		Total		
	n	%	n	%	n	%	
EIA ≥ 3.	ALT • 1	6	(100)	--	--	6	(100)
	ALT > 1	109	(90,8)	11	(9,2)	120	(100)
EIA ≥ 1 e < 3	ALT • 1			4	(100)	4	(100)
	ALT > 1	1	(20,0)	4	(80)	5	(100)
Total		116	(85,9)	19	(14,1)	135	(100)

Os dados sumarizados na Tabela 11b correspondem aos doadores EIA reagentes associados ao valor de ALT, que apresentaram o resultado de RIBA indeterminado. Analisando-se o grupo de 8 doadores com RIBA indeterminado, notou-se que entre os EIA ≥ 3 todas as amostras foram positivas para a RT-PCR, e apresentavam níveis de ALT aumentado. Em um único caso EIA ≥ 1 e < 3 com ALT • 1, a RT-PCR foi negativa. Entre os EIA ≥ 1 e < 3 com ALT alterado, nota-se que 2 (66,7%) foram RT-PCR positivas e 1 (33,3%) apresentou resultado da RT-PCR negativa. Assim, entre o grupo dos doadores com RIBA indeterminado, 75% apresentaram RT-PCR positiva, e 25% foram caracterizados como negativos.

Tabela 11b - Resultados dos EIA associados com os níveis de ALT entre os RIBA indeterminados, correlacionados com o resultado da RT-PCR.

RT-PCR	RIBA indeterminado						
	RNA-VHC positivo		RNA-VHC negativo		Total		
	n	%	n	%	n	%	
EIA ≥ 3.	ALT • 1	--	--	--	--	--	--
	ALT > 1	4	(100)	--	--	4	(100)
EIA ≥ 1 e < 3	ALT • 1	--	--	1	(100)	1	(100)
	ALT > 1	2	(66,7)	1	(33,3)	3	(100)
Total		6	(75)	2	(25)	8	(100)

Na tabela 11c, foram sumarizados os dados relativos aos resultados de EIA, associados a ALT e ao RIBA negativo e em correlação com os resultados de RT-PCR. No grupo RIBA negativo, todas as amostras apresentaram valores de ALT • 1. Entre os resultados de EIA analisados, não se encontrou nenhum caso de EIA fortemente reagentes (≥ 3) associado ao RIBA negativo. Entre os EIA fracamente reagente (≥ 1 e < 3) foram encontrados 4 casos de RIBA negativo com RT-PCR negativo. No subgrupo com EIA negativo ($< 0,7$), que correspondeu ao grupo controle, 31 casos foram estudados, todos apresentaram RIBA negativo e RT-PCR negativo.

Tabela 11c - Resultados dos EIA associados aos níveis de ALT entre os RIBA negativos, correlacionados com os resultados da RT-PCR.

		RIBA negativo					
		RT-PCR positivo		RT-PCR negativo		Total	
		n	%	n	%	n	%
EIA ≥ 1 e < 3	ALT $\bullet 1$	--	--	4	(100)	4	(100)
EIA $< 0,7$	ALT $\bullet 1$	--	--	31	(100)	31	(100)
Total		--	--	35	(100)	35	(100)

A tabela 12 apresenta os dados obtidos quando se analisa o padrão das bandas do RIBA, encontradas no estudo, entre os EIA positivos, comparados com o resultado da RT-PCR. Pode-se verificar das 147 amostras de doadores de sangue, 93 (63,3%) apresentaram reatividade para os 4 antígenos do VHC presentes no RIBA II (padrão 4+). Destes, 78 (83,9%) eram EIA ≥ 3 e RT-PCR positivas e 15 (16,1%) RT-PCR negativas, sendo 6 (40%) EIA ≥ 3 e 9 (60%) EIA ≥ 1 e < 3 . Em 20 casos (13,6%) de RIBA positivos, padrão 3+(reatividade para 3 antígenos do VHC no RIBA), 19 (95%) eram EIA ≥ 3 com RT-PCR positivas e 1 (5%) era EIA ≥ 3 e RT-PCR negativa. A presença de reatividade para 2 antígenos do VHC no RIBA II (padrão 2+) foi encontrada em 22 casos (14,9%), sendo 19 (86,4%) EIA ≥ 3 e RT-PCR positiva e 3 (13,6%) EIA ≥ 3 e RT-PCR negativa. No padrão 1+ (reatividade para apenas 1 banda do RIBA), RIBA indeterminado, encontraram-se 8 casos (4,5%), dos quais 4 (50%) eram EIA ≥ 3 e RT-PCR positiva, 2 (25%) eram EIA ≥ 1 e < 3 com RT-PCR positiva e 2 (25%) EIA ≥ 1 e < 3 e RT-PCR negativa. Foram também encontrados 4 casos (2,7%) de RIBA negativo entre os EIA ≥ 1 e < 3 e RT-PCR negativa.

Tabela 12 - Padrão do RIBA-2 de acordo com o número de bandas presentes nas 147 amostras de soros de doadores EIA positivos comparadas com os resultados da RT-PCR para o VHC.

RNA-VHC bandas presentes	Padrão	EIA									
		≥3				≥1 e <3				Total	
		Positivo		Negativo		Positivo		Negativo			
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
5.1.1; c100.3; c22.3;c33c	4+	78	(65)	6	(60)	--	--	9	(60)	93	(63,3)
c100.3; c22.3; c33c	3+	15	(12,5)	--	--	--	--	--	--	15	(10,2)
5.1.1; c22.3; c33c	3+	4	(3,3)	1	(10)	--	--	--	--	5	(3,4)
5.1.1; c100.3	2+	--	--	1	(10)	--	--	--	--	1	(0,7)
c22.3; c33c	2+	19	(15,9)	2	(20)	--	--	--	--	21	(14,2)
c22.3	1+	4	(3,3)	--	--	2	(100)	1	(6,6)	7	(4,8)
c33c	1+	--	--	--	--	--	--	1	(6,6)	1	(0,7)
ausência de bandas	0	--	--	--	--	--	--	4	(26,8)	4	(2,7)
Total		120	(100)	10	(100)	2	(100)	15	(100)	147	(100)

Na tabela 12a relacionaram-se os resultados do RIBA com os resultados da RT-PCR. Entre os 135 casos considerados RIBA positivos (padrão 4+; 3+; 2+ da tabela 12), encontraram-se 116 (85,9%) de RT-PCR positivas e 19 (14,1%) de RT-PCR negativas. Dos 8 casos de RIBA indeterminados presentes na amostra (padrão 1+ da tabela 12), houve 6 (75%) com resultados de RT-PCR positivos, enquanto 2 (25%) eram negativos. Entre os 35 casos de RIBA negativos (padrão 0 da tabela 12), encontram-se os 31 (88,6%) indivíduos do grupo controle e 4 (11,4%) casos de EIA fracamente reagentes.

Tabela 12a - Resultados do RIBA comparados com os resultados da RT-PCR para o VHC em 178 doadores de sangue.

RT-PCR	Padrão do RIBA							
	4+, 3+, 2+		1+		0		Total	
	Positivo		Indeterminado		Negativo			
	n	%	n	%	n	%	n	%
RNA-VHC Positivo	116	(85,9)	6	(75)	--	--	122	(68,5)
RNA-VHC Negativo	19	(14,1)	2	(25)	35	(100)	56	(31,5)
Total	135	(100)	8	(100)	35	(100)	178	(100)

Na Tabela 13 pode-se observar que, entre os 147 casos estudados, 91 apresentavam ao exame histológico do fígado evidências de hepatites crônicas pelo VHC, 30 foram classificados como doentes com alterações hepáticas inespecíficas e outros 26 não foram submetidos a biópsias hepáticas. Entre os 91 casos com hepatite crônica, 88 (96,7%) apresentavam o EIA para o anti-VHC fortemente reagente ($\bullet 3$) e 3 (3,3%) EIA fracamente reagentes ($\bullet 1$ e <3). Quando se submeteu esta mesma população ao teste de RIBA, observou-se que 87 (95,7%) eram RIBA positivos e 4 (4,4%) indeterminados. Em relação, ao estudo deste grupo pela RT-PCR, nota-se que 84 (92,3%) apresentavam resultados positivos e 7 (7,7%), negativos. No estudo do grupo classificado como portadores de alterações histológicas hepáticas inespecíficas, pode-se observar que, 24 (80%) apresentavam EIA fortemente reagente e em 6 (20%) o EIA foi considerado fracamente reagente. Analisando-se, esta mesma população, pelo RIBA, nota-se que 26 (86,7%) foram positivos, 3 (10%) indeterminados e 1 (3,3%) negativo. No estudo do grupo com alterações inespecíficas pela RT-PCR pode-se notar que em 22 (73,4%) o resultado foi positivo e em 8 (26,6%) o resultado foi negativo. O grupo sem estudo histológico apresentou 18 (69,3%)

casos com EIA fortemente reagente e 8 (30,7%) com EIA fracamente reagente. O resultado de RIBA neste grupo mostrou 22 (84,6%) positivos, 1 (3,8%) indeterminados e 3 (11,6%) negativos. O resultado da RT-PCR observado neste grupo apontou 16 (61,5%) positivos e 10 (38,5%) negativos.

Tabela 13 - Apresentação dos dados de EIA, RIBA II e PCR em relação aos achados histopatológicos em biópsia de fígado.

Indicação	ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS					
	Hepatites Crônicas		Alterações Inespecíficas		Sem Dados Histopatológicos	
	n	%	n	%	n	%
n	91	(100)	30	(100)	26	(100)
EIA						
• 3	88	(96,7)	24	(80)	18	(69,3)
• 1 e <3	3	(3,3)	6	(20)	8	(30,7)
RIBA II	n	%	n	%	n	%
Positivo	87	(95,6)	26	(86,7)	22	(84,6)
Indeterminado	4	(4,4)	3	(10)	1	(3,8)
Negativo	--	--	1	(3,3)	3	(11,6)
RT - PCR	n	%	n	%	n	%
RNA-VHC Positivo	84	(92,3)	22	(73,4)	16	(61,5)
RNA-VHC Negativo	7	(7,7)	8	(26,6)	10	(38,5)

Os 7 casos de RT-PCR negativos com hepatite crônica eram todos RIBA positivos, padrão 4+; 5 eram EIA ≥ 3 e ALT aumentada, dos quais 2 apresentavam hepatite crônica persistente e 3 hepatite crônica ativa. Os 2 outros casos eram EIA ≥ 1 e <3 , sendo 1 com ALT normal e diagnóstico histológico de hepatite crônica ativa e o outro com ALT aumentada e hepatite crônica persistente.

Entre os 18 pacientes estudados, 14 (77,7%) apresentavam EIA ≥ 3 e 4 (22,3%) EIA ≥ 1 e <3 . Em relação aos EIA ≥ 3 e ALT ≤ 1 (normal), encontrou-se 1 caso (50%) com resultado da biópsia hepática rotulando-o como fígado normal e 1 caso (50%) onde o exame histopatológico não foi realizado. Entre os EIA ≥ 3 com níveis de ALT aumentados (>1), encontramos 8 (66,7%) pacientes com hepatites crônicas, 1 (8,3%) como esteatose e 3 (25%) não foram submetidos à biópsia hepática no momento do estudo. Na avaliação dos pacientes que apresentaram EIA ≥ 1 e <3 com ALT normal (≤ 1), encontrou-se 1 caso (100%) com diagnóstico da biópsia hepática de hepatite crônica. Porém, quando avaliou-se os pacientes com EIA ≥ 1 e <3 com ALT aumentada (>1), verificou-se que 1 (33,3%) apresentava fígado reacional e 2 (66,7%) não foram submetidos à biópsia hepática. Entre os indivíduos com hepatites crônicas 8/9 (88,9%) apresentavam EIA fortemente reagente com ALT aumentada. Apenas 1/9 (11,1%) dos pacientes com hepatites crônicas histologicamente documentadas mostrou ser EIA fracamente reagente e também apresentava ALT dentro dos valores normais.

Tabela 14 - Apresentação dos dados referentes aos resultados de EIA e ALT encontrados entre os 18 pacientes estudados.

Histologia	EIA ≥ 3				EIA ≥ 1 e <3				Total	
	ALT ≤ 1		ALT >2		ALT ≤ 1		ALT >2			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hepatites Crônicas	--	--	8	(66,7)	1	(100)	--	--	9	(50)
Esteatose	--	--	1	(8,3)	--	--	--	--	1	(5,5)
Fígado reacional	--	--	--	--	--	--	1	(33,3)	1	(5,5)
Fígado normal	1	(50)	--	--	--	--	--	--	1	(5,5)
Sem dados	1	(50)	3	(25)	--	--	2	(66,7)	6	(33,5)
Total	2	(100)	12	(100)	1	(100)	3	(100)	18	(100)

Entre os RIBA e RT-PCR positivos, encontraram-se 5 (100%) de casos de hepatite crônica. O estudo também mostrou entre os RIBA positivos e RT-PCR negativos, 3 (33,3%) de casos de hepatite crônica, 1 (16,7%) de fígado normal, 1 (16,7%) de esteatose e 1 (16,7%) caso que não foi submetido à biópsia hepática. Entre os 2 casos de RIBA indeterminados todos foram negativos para a RT-PCR e não avaliados pela biópsia hepática. Entre os pacientes com RIBA e RT-PCR negativos observaram 1 (20%) caso de hepatite crônica, 1 (20%) caso de fígado reacional e 3 (60%) casos nos quais não foi realizada a biópsia hepática. Entre 9 pacientes do subgrupo com hepatites crônicas histologicamente documentadas, observamos 8 (88,9%) com RIBA positivo e 1 (11,1%) com RIBA negativo. Neste mesmo subgrupo 5 (55,6%) eram positivos para a RT-PCR. Houve 1 caso (11,1%) com RIBA e RT-PCR negativos. A RT-PCR só foi positiva no subgrupo com hepatites crônicas.

Tabela 15 - Distribuição dos 18 pacientes considerando-se os resultados do RIBA e RT-PCR e correlacionados com os dados histológicos.

Histologia	RIBA+		RIBA+		RIBA*		RIBA-		TOTAL	
	RT-PCR-		RT-PCR+		RT-PCR-		RT-PCR-			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hepatites Crônicas	3	(33,3)	5	(100)	--	--	1	(20)	9	(50)
Esteatose	1	(16,7)	--	--	--	--	--	--	1	(5,5)
Fígado reacional	--	--	--	--	--	--	1	(20)	1	(5,5)
Fígado normal	1	(16,7)	--	--	--	--	--	--	1	(5,5)
Sem dados	1	(16,7)	--	--	2	(100)	3	(60)	6	(33,3)
Total	6	(100)	5	(100)	2	(100)	5	(100)	18	(100)

Tabela 16 - Pacientes, exames sorológicos, resultados de biópsia, PCR e dados epidemiológicos

Nº	Iniciais	Idade	Sexo	EIA	ALT	RIBA	Biópsia	RT-PCR	Epidemiologia
1	JT	44	M	>3	>2	e100,3	HCA leve	+	etilismo/cirurgia/transfusão
2	CEZ	31	F	-	-	-	HCP	-	hepatite A - anti -HAV igM
3	RMF	31	F	-	-	-	-	-	gama alterado = 1,66 (1,60 nl)
4	VAS	37	M	+	-	+	esteatose	-	etilismo
5	SAB	35	F	+	-	+	normal	-	contactante paciente HCV +
6	APCV	24	F	+	-	+	-	-	indeterminado
7	JCB	27	M	-	+	-	-	-	cirurgia
8	EJR	32	M	+	-	+	HCA leve	-	HBsAg +/- AHBc +/- alcoolismo
9	NNM	45	F	+	-	+	HCA leve	+	etilismo/contactante paciente HCV+
10	SLB	38	M	+	-	+	HCA leve	+	pós transplante hepático - HCV+
11	LPM	27	F	+	-	+	-	-	AHBc+
12	OS	51	M	+	-	-	-	-	triglicérides alterados - colesterol(257); triglic (500)
13	RAS	34	F	+	-	+	-	-	cirurgia
14	AVR	42	M	-	+	-	F.reacional.	-	indeterminado
15	KCS	18	F	+	-	+	HCA leve	+	contactante paciente HCV +
16	SLS	53	M	+	-	+	HCA grave	-	gama alterado = 2,30 (1,60 nl)
17	MJCP	30	F	+	-	+	HCA leve	+	indeterminado
18	DCA	47	F	+	-	+	HCA leve	-	gama alterada = 1,75 (1,60 nl)

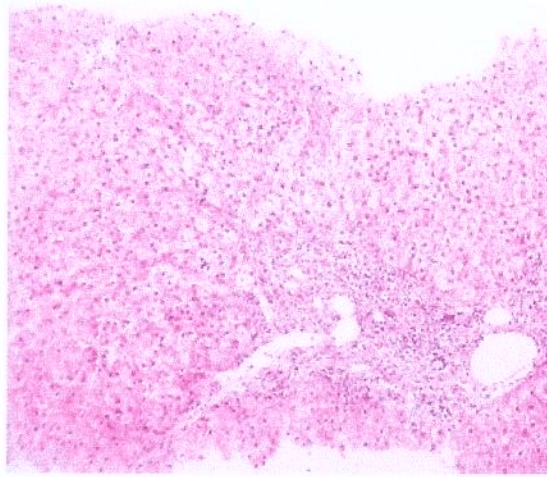


Fig. 11: Hepatite crônica com leve grau de atividade. 100 x HE

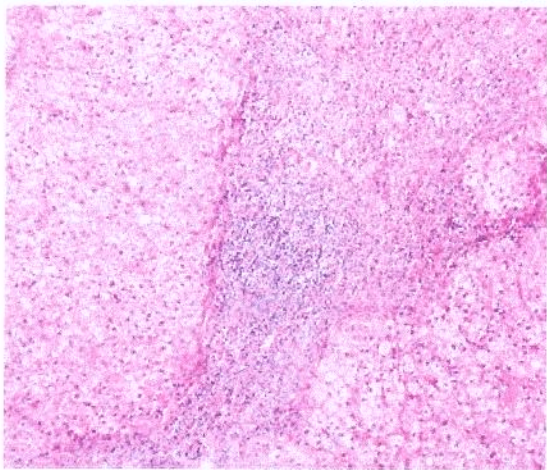


Fig. 12: Hepatite crônica com moderado grau de atividade. 100 x HE

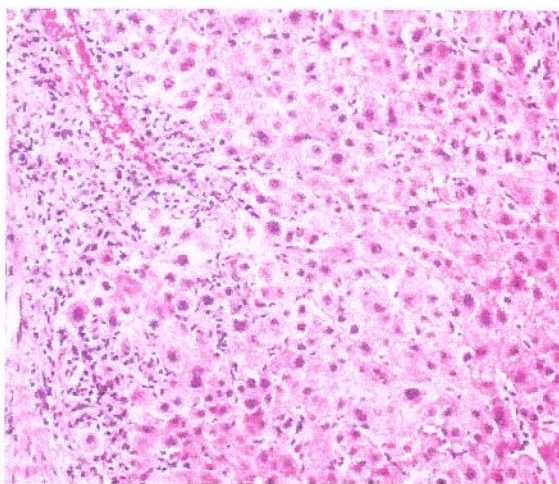


Fig. 13: Hepatite crônica com intenso grau de atividade .100 x HE

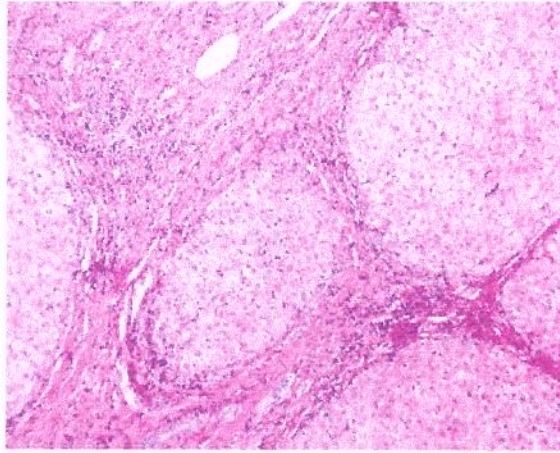


Fig. 14: Cirrose hepática. 100 x HE

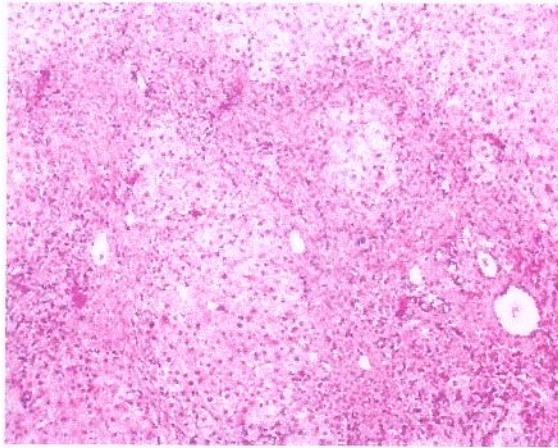


Fig. 15: Cirrose hepática. 100 x HE

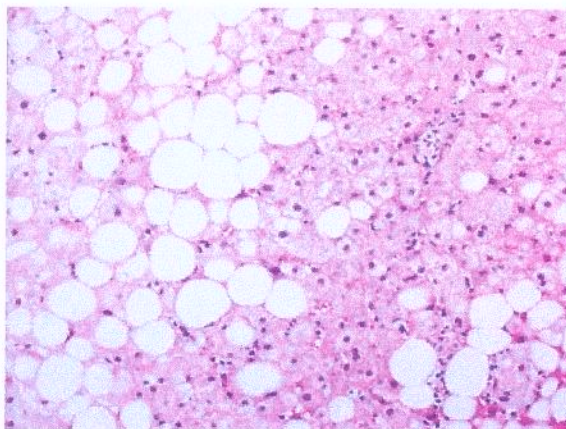


Fig. 16: Esteatose. 200 x HE

4.3. RESULTADO DO ESTUDO DE CORTES DE TECIDO HEPÁTICO PARAFINADO

4.3.1. Imuno-histoquímica e Imunofluorescência

De todos os pacientes biopsiados apenas 35 foram submetidos ao estudo imuno-histoquímico. Dos casos estudados, as lâminas coradas pelo HE (último corte) mostraram material adequado, em quantidade e qualidade, para diagnóstico morfológico de infecção pelo VHC.

Quando realizada a técnica de imunofluorescência indireta para tecido parafinado com anticorpo monoclonal TORDJI-22 anti-VHC (segundo especificações do fabricante), não se obteve a fluorescência citoplasmática preconizada em nenhum dos casos estudados. Observou-se uma quantidade muito grande de pontos fluorescentes no citoplasma e núcleo, denotando reação inespecífica. O padrão do controle negativo foi o esperado para a técnica de imunofluorescência (ausência de fluorescência no tecido).

A técnica de imuno-histoquímica padronizada, com utilização de digestão enzimática pela protease XXIV, por 30 minutos à 37 °C (de acordo com as especificações do fabricante do anticorpo monoclonal TORDJI-22 anti-VHC), levou a uma digestão excessiva do tecido, o que impediu a leitura, uma vez que a positividade era esperada no citoplasma dos hepatócitos. A modificação do tempo de digestão enzimática para 15 minutos, a 37 °C, com preservação dos outros parâmetros da técnica, conseguiu-se a integridade do tecido, porém não se observou a presença de grânulos acastanhados no citoplasma dos hepatócitos do controle positivo e sim reações nucleares inespecíficas. O controle negativo apresentou uma coloração de fundo bastante importante.

Modificou-se a técnica de imuno-histoquímica anteriormente padronizada pela utilização do microondas, com a finalidade de se expor mais os antígenos, permitindo uma melhor ligação antígeno - anticorpo. Utilizaram-se todos os passos da técnica anterior, sem digestão enzimática, que foi substituída pela presença do microondas (tampão citrato pH6, 0, ebulição 3 vezes 5 minutos e incubação 2 horas, à temperatura ambiente). Não foi

possível a identificação de reação positiva citoplasmática devido a presença de uma reação inespecífica de fundo, muito intensa.

A última modificação foi realizada com intuito de melhorar a qualidade da reação através do aumento de tempo de contato do anticorpo com o antígeno do tecido, passando de 2 horas de incubação para 18 horas. O tempo de digestão enzimática foi diminuído para 20 minutos, para evitar o excesso de digestão tecidual. Não foi observada positividade esperada para este tipo de reação, que é a presença de grânulos acastanhados no citoplasma do hepatócito. Observaram-se reações nucleares inespecíficas.

5. DISCUSSÃO

A clonagem e o seqüenciamento do genoma do VHC, no início desta década, por CHOO *et al.*(1989), representaram o passo fundamental no estudo da infecção por estes vírus. Os resultados obtidos neste estudo, facilitaram o desenvolvimento de testes sorológicos e permitiram sua aplicação, em larga escala, como instrumento de investigação e diagnóstico. Assim, foi possível determinar a prevalência de infecção pelo VHC, medida pela presença do anticorpo anti-VHC em soros, de diversos grupos populacionais. Além disto, diversos mecanismos e fatores relacionados com a HVC puderam ser estabelecidos. Foi possível constatar que a positividade para o anti-VHC estava correlacionada com infecção prévia por este vírus, com ou sem desenvolvimento de imunidade, com evolução para estado de portador ou para quadros de hepatites crônicas. Por isto, pela simples pesquisa de anticorpos, não se consegue determinar em qual estágio o indivíduo infectado pelo VHC se encontra (GARSON *et al.*, 1990a; HOUGHTON *et al.*, 1991; PUOTI *et al.*, 1992).

Algumas limitações dos testes sorológicos para o anti-VHC (EIA, RIA) tornaram-se rapidamente conhecidas. O fenômeno conhecido como soroconversão tardia para o anti-VHC, observado por alguns autores (ALTER *et al.*, 1989c; ESTEBAN *et al.*, 1990; GONÇALES Jr. *et al.*, 1993b), permitiu supor que os baixos níveis virêmicos na HVC produzem uma leve estimulação do sistema imune com a produção de anticorpos em baixos títulos, após longo tempo. Assim, é comum observar-se a soroconversão somente alguns meses após o quadro de hepatite aguda pelo VHC. Esta dinâmica produz dificuldades diagnósticas em casos de indivíduos sabidamente portadores do vírus, que estejam nos primeiros meses de infecção (GIUBERTI *et al.*, 1994).

Desde o início, observaram-se resultados falsos positivos para o anti-VHC, quando eram utilizados testes de EIA de 1ª geração (COUROUCÉ *et al.*; 1991, NICHOLSON *et al.*, 1991), principalmente em populações de baixo risco, como doadores de sangue, e na presença de hipergamaglobulinemias (ALTER, 1991; MACFARIANE *et al.*, 1990). Com o intuito de melhorar a sensibilidade e especificidade do teste de EIA de 1ª geração, foi desenvolvido um novo teste denominado EIA de 2ª geração. Foram introduzidos então, dois antígenos recombinantes, sendo o primeiro, o c33c (provável

protease/helicase) e o segundo, o c22-3 (proteína do *core*). Isto conferiu ao teste maior sensibilidade, mas a questão da especificidade ainda permaneceu em aberto (FRÖSNER, 1991, McHUTCHINSON *et al.*, 1992), mostrando que estes testes comerciais podiam ainda apresentar resultados falsos-positivos (DOW *et al.*, 1993).

A busca de testes complementares, como o “immunoblot” (RIBA-2), visou eliminar principalmente resultados falsos-positivos e diagnosticar casos dentro do período de soroconversão tardia (VAN DER POEL *et al.*, 1991). O teste de “immunoblot”, na verdade, também procura detectar a presença de anticorpos anti-VHC e para tanto utiliza as mesmas proteínas antigênicas encontradas nos testes de EIA-2, portanto apresenta os mesmos problemas de resultados positivos e indeterminados que não se confirmam por técnicas de pesquisa de antígeno, como a PCR.

Deste modo, tornou-se necessária a introdução de novos testes para detecção do VHC, visando reduzir os resultados indeterminados e detectar infecção corrente sem necessidade de testes confirmatórios. Foram então desenvolvidos novos ensaios denominados de 3ª geração (EIA-3 e RIBA-3), que incluíram 2 antígenos recombinantes do VHC (c33 produzida em *E. coli* e NS-5, produzida em fungo) e 2 peptídeos sintéticos derivados do nucleocapsídeo (c22) e da região não-estrutural (c100) do genoma do VHC (VAN DER POEL *et al.*, 1993). O estudo conduzido por GARCIA-SAMANIEGO *et al.* (1993) mostrou que estes testes permitiam eliminar resultados falsos positivos produzidos pelos de 2ª geração. Porém, o mais importante foi a demonstração de que uma proporção significativa de doadores com RIBA-2 indeterminados eram considerados pelo RIBA-3 como positivos ou indeterminados. Como cerca de 30% destes casos apresentaram positividade para a pesquisa do RNA do VHC, parece razoável a reavaliação do conceito de falsa positividade em casos de RIBA-2 indeterminado, principalmente quanto aos critérios sugeridos pelos fabricantes. Assim, de acordo com dados obtidos por alguns autores (YUN *et al.*, 1993; WAUMANS *et al.*, 1993; CRAXI *et al.*, 1994), os resultados de RIBA-2 indeterminados merecem uma avaliação mais detalhada, com novos métodos diagnósticos, como a pesquisa da presença do RNA do VHC por PCR.

Um dos maiores problemas enfrentados na prática clínica é decidir se um paciente é infectado, uma vez que, em um grande número de casos, os testes comerciais não fornecem dados suficientes para decidir se a infecção pelo VHC está ativa. Assim, entre os vários problemas encontrados, estão os resultados falsos negativos devido à demora do aparecimento do anti-VHC durante infecção aguda, amostras que apresentam baixa reatividade ao EIA/RIBA (pacientes imunossuprimidos, por exemplo) ou pacientes com sinais clínicos de hepatites, mas com sorologia negativa. A detecção do RNA do VHC por PCR, nestes casos, pode ser o meio para obtenção um resultado definitivo (NOWICKI & BALISTRERI, 1995).

A PCR detecta partículas de RNA viral, permitindo assim a identificação direta da presença do vírus. Esta viremia pode ser detectada por este método poucos dias após a exposição ao vírus e várias semanas antes da elevação dos níveis de ALT e anticorpos no soro (SHIMIZU *et al.*, 1990). A PCR também fornece informações importantes quanto ao *status quo* da infecção, quando os anticorpos anti-VHC estão presentes e as funções hepáticas são normais (ALBERTI *et al.*, 1991). Além disso, a PCR é útil para monitorar a eficácia terapêutica (KANAI *et al.*, 1990) e o diagnóstico de infecção pelo VHC, em pacientes com hepatites crônicas não-A, não-B que apresentam resultados sorológicos negativos ou indeterminados. Finalmente, a PCR é de particular interesse para o estudo da transmissão materno-fetal do VHC (THALER *et al.*, 1991; RODOUT-THORAVALL *et al.*, 1993).

É importante salientar que a correlação entre os testes sorológicos que detectam antígenos e as alterações bioquímicas e histológicas presentes nestas infecções pode fornecer dados adicionais para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na dinâmica da infecção pelo VHC (ZEUZEM *et al.*, 1996).

No nosso estudo comparamos os testes de triagem sorológica (EIA-2) com o teste complementar (RIBA-2), com o teste bioquímico (ALT) e com um método de biologia molecular para pesquisar sequências do VHC genômico no soro. Para o estudo molecular, optou-se por um método cuja utilização permitisse que amostras de soro

submetidas ao aquecimento prévio não necessitassem da extração clássica do RNA. Este método foi baseado no teste desenvolvido por RAVAGGI *et al.* (1992), que se mostrou mais rápido e sem influência significativa no resultado final. Todas as etapas de execução da técnica seguiram rigidamente os padrões descritos por KWOK & HIGUCHI (1989) para se evitar contaminação e resultados falsos positivos. Também foram usados dois pares de “primers” da região 5’ não-transcrita (NCR) do genoma do VHC, por apresentarem homologia em 98% dos VHC isolados, o que diminui a chance de resultados falsos negativos (OKAMOTO *et al.*, 1990a; CHOO *et al.*, 1991; HOUGHTON *et al.*, 1991; FUCHS *et al.*, 1991).

Assim, pudemos observar (tabela 3), uma relação direta com evidências de associação ($p < 0,05\%$) entre os soros com maiores graus de positividade para o EIA-2 e níveis elevados de ALT sérica. Estes achados também foram observados por outros autores (CARDOSO *et al.*, 1993). Entendemos que esta associação se estabelece porque nos EIA fortemente reagentes, a infecção é de longa data. Presumimos que exista maior carga viral, e como o VHC é citopático (GONZALEZ-PERALTA *et al.*, 1994) em sua essência, produzirá maior grau de lesão hepatocítica e, portanto, maiores níveis séricos da enzima. Nesta tabela, notamos também que o grupo de EIA fracamente reagente, apresentou uma alta proporção (52,9%) de indivíduos com dosagens de ALT normais, contrastando com a baixa porcentagem de dosagens de ALT normal (4,6%) entre os EIA fortemente reagentes. Em nossa opinião, a razão unitária (DO/C), utilizada para expressar a reatividade da amostra deve constar na emissão do resultado para que o clínico seja informado sobre a intensidade da infecção, com orientação sobre as relações deste resultado com o observado nos níveis de transaminases, e que, em última análise, refletirá o comprometimento hepático.

Houve, conforme podemos constatar na tabela 4, alto grau de co-positividade entre os resultados dos testes de EIA e do RIBA (96,9%) entre os indivíduos EIA fortemente reagentes. Entre os 3,1% restantes, todos apresentaram resultados de RIBA indeterminado. Cabe ressaltar, que estes indivíduos RIBA indeterminados nesta população eram positivos para a presença do anticorpo contra o antígeno do *core* (c22.3) e

apresentaram positividade para o RNA do VHC pela PCR (tabelas 7 e 12). Esta observação permite supor que casos com RIBA indeterminado e com presença isolada da banda c22.3 podem ser, na verdade, positivos. Esta observação também foi sugerida em estudo recentemente publicado (ZEIN *et al.*, 1997), que considera que amostras com forte reatividade para a banda c22.3 estão provavelmente associadas com viremia para o VHC e também se associam com genótipos menos frequentes do VHC. O estudo de TANAKA *et al.*(1993) também mostrou a presença constante de viremia em indivíduos com HPT causadas pelo VHC, cujos soros eram reagentes para os anticorpos anti-*core* (p22). Isto demonstra, a nosso ver, que em populações EIA fortemente reagentes a realização do teste complementar pode ser desnecessária, pois não observamos a ocorrência de falsos positivos para o anti-VHC neste grupo.

Entretanto, quando analisamos o grupo dos indivíduos com resultados do EIA fracamente reagente, notamos que apenas 53% dos casos confirmam a infecção pelo VHC, enquanto 23,5% permanecem com resultados indeterminados e 23,5% com RIBA negativo. Isto somado representa 47% dos casos, que necessitam de exames complementares para definição de suas reais condições frente à infecção pelo VHC. Entre os RIBA indeterminados deste grupo, 75% apresentaram reatividade para a banda c22.3 e 25% para c33c (tabela 7). Em 50% dos RIBA indeterminados deste grupo, confirmou-se a presença do RNA do VHC pela PCR, ambos apresentando reatividade para a banda c22.3 (tabela 12). Por outro lado, VAN DER POEL *et al.*(1994) observaram que entre os doadores de sangue EIA-2 positivos 31% apresentaram RIBA indeterminado, com 58% reagindo com o antígeno c22.3, dos quais 8% apresentaram-se positivos pela PCR. Outros autores também relataram a presença de RNA do VHC em pacientes cronicamente infectados com EIA fracamente reagentes (LAZIZI *et al.*, 1992). Estes achados nos permitem afirmar que, frente a resultados de EIA fracamente reagentes para o VHC, é imprescindível complementar a investigação pelo RIBA e posteriormente sua confirmação pela PCR, principalmente em populações onde as prevalências desta infecção são baixas.

Na análise dos dados presentes nas tabelas 5 e 6, quando correlacionamos os resultados do EIA com o RIBA e os níveis de ALT, notamos que entre os EIA fortemente

reagentes o RIBA confirma a quase totalidade dos casos (96,8%), independentemente do nível de transaminases. Nos raros casos (3,2%) em que se mostrou indeterminado, na verdade, havia anticorpos anti-core (c22.3) presentes, e a pesquisa do RNA do VHC pela RT-PCR foi positiva. De acordo com estes dados, podemos inferir que a concordância do EIA fortemente reagente e do RIBA-2 positivo, em nosso estudo, foi de 100% e não dependeu do nível de ALT para confirmar a infecção. Estes dados estão de acordo com os trabalhos encontrados na literatura, onde foi observado que durante a infecção pelo VHC ocorrem marcantes flutuações nos níveis de ALT, com súbitas elevações seguidas por meses de normalização (ALTER *et al.*, 1992). A causa destas flutuações ainda é incerta, mas a reinfeção por alguma variante do VHC é uma hipótese concebível, assim como pela regeneração de células hepáticas danificadas ou pela infecção e morte de novos hepatócitos (ALTER *et al.*, 1991). Na população EIA fracamente reagente também notamos que o resultado do RIBA se relacionou mais com a intensidade de reação do EIA do que com os diferentes níveis de ALT. Exceção deve ser feita ao grupo EIA fracamente reagente com ALT normal, onde encontramos cerca de 45% dos indivíduos com RIBA negativo, o que difere do observado na população anterior, onde isto não ocorreu. Estes achados poderiam ser explicados como resultados falsos positivos do EIA fracamente reagentes. Quanto à população EIA fortemente reagente, a ocorrência de falsos positivos não se confirmou neste estudo. As afirmações contrárias (DOW *et al.*, 1993) devem ser consideradas como verdadeiras para populações EIA fracamente reagentes.

Quando analisamos o padrão das bandas do RIBA-2 em nosso estudo, notamos que 62,5% apresentavam reatividade aos 4 antígenos presentes na fita, sendo que o padrão c100.3 e 5.1.1 o menos prevalente (0,7%) para o padrão de positividade. Estes dados mostram que, se o teste utilizado para triagem sorológica fosse o EIA-1 (5.1.1 e c100.3), não teríamos detectado 29 (19,7%) casos positivos deste estudo (tabela 7). Por outro lado, dos 8 casos indeterminados de nosso estudo, 7 (87,5%) apresentaram o padrão c22.3, dos quais apenas 1 não foi confirmado pela PCR. Se o teste de triagem fosse o EIA-1, estes 8 casos indeterminados não teriam sido detectados e, portanto, poderia haver transmissão de HVC aos receptores de sangue, e estariam engrossando as estatísticas das hepatites pós-transfusionais por este vírus.

Em muitos estudos, os autores buscam associação entre a resposta a um anticorpo em particular e viremia. PARVAZ *et al.* (1994) não acharam associação entre a resposta a um anticorpo particular (contra c100.3; 5.1.1; c33c ou c22.3) e viremia. Por outro lado, notaram que a presença de resposta a mais de um anticorpo associava-se diretamente à presença do vírus no soro. Por outro lado, KRADJEN *et al.* (1996) observaram que a reatividade contra o antígeno do *core* do VHC (c22.3) estava diretamente relacionada com a positividade do PCR, não observando o mesmo com as amostras que eram positivas apenas para os antígenos c100.3 e c33c. Isto sugere que o padrão de resposta aos diversos antígenos do “immunoblot” é importante para a caracterizar a infecção (BUSCH *et al.*, 1993; CRAXI *et al.*, 1994). Em estudos recentes ficou demonstrado, pela detecção do RNA do VHC no soro, que alguns casos de infecção pelo VHC não são passíveis de detecção pelos testes comerciais disponíveis no mercado, por não apresentarem reatividade a nenhum deles (CERINO *et al.*, 1997). Isto mostra a necessidade de desenvolvimento de novos testes bem como a melhora dos testes em uso com novas porções antigênicas do VHC, a fim de se garantir maior sensibilidade e especificidade aos testes de triagem (FEUCHT *et al.*, 1995).

Com o teste da RT-PCR pudemos detectar a presença do RNA viral em cerca de 91,5% dos casos EIA fortemente reagentes e em somente 17,6% fracamente reagentes, como observamos na tabela 8. Entre os EIA fracamente reagentes notamos o inverso, ou seja, a frequência de resultados negativos pelo teste de RT-PCR foi cerca de dez vezes maior quando comparada com a do grupo EIA fortemente reagente. É razoável imaginarmos que nos EIA fortemente reagentes altas concentrações de anticorpos são acompanhadas por RNA viral detectável, fazendo supor uma maior transmissibilidade e infectividade destes indivíduos. A presença destes anticorpos seguramente não protege os indivíduos da agressão viral nem leva ao clareamento do vírus diferentemente do observado em outras viroses, como por exemplo, a hepatite B. Não houve casos de falsa positividade com o teste de RT-PCR empregado. Seria interessante, no futuro, fazer a correlação dos títulos expressos no EIA com as cargas virais, para melhor entendermos estes achados.

O encontro de forte associação entre altos níveis de ALT na população EIA reagentes com a RT-PCR pode ser explicada pela maior lesão hepatocítica, decorrente da

presença de grande quantidade do vírus no hepatócito, dado o grande efeito citopático presente nesta infecção (KUMAR, THOMAS & MONJARDINO, 1994) ou pelo maior tempo de doença (tabela 9). De 122 casos com RNA do VHC positivos, enquanto 114 (93,5%) apresentam níveis de ALT alterados, em 8 (6,5%) encontram-se níveis de ALT normais. Isto sugere que existe uma porcentagem de casos de infecção ativa pelo VHC que não apresentam evidências bioquímicas de hepatite. Esta afirmação encontra referências no trabalho desenvolvido por AREIAS *et al.*(1996) que, estudando pacientes portadores de HVC com níveis de ALT persistentemente normais, puderam constatar que os níveis de viremia eram mais baixos do que nos pacientes com níveis de ALT aumentados, porém, a injúria hepatocítica era freqüente. Além disto, observaram também que estes casos não se correlacionaram com nenhum genótipo viral significativamente diferente da outra população.

Neste estudo pudemos também observar uma forte correlação entre os resultados de RIBA e da RT-PCR (85,9%), mostrando que estes testes, isolados ou seqüencialmente realizados em indivíduos EIA repetidamente reagentes, são capazes de confirmar a doença para o clínico (tabela 10). Em outro estudo onde correlacionaram a presença do RNA do VHC no soro com a positividade para o teste de RIBA-2, os autores encontraram 89% de confirmação pelo PCR (KOERNER *et al.*, 1995), número bastante próximo do observado em nosso estudo. Dados semelhantes foram referidos por ZHANG *et al.*(1993), que mostraram uma alta taxa de correlação entre os resultados do RIBA e do PCR. A correlação de positividade entre estes testes foi de 89 a 93%, enquanto a de negatividade foi de 100%.

A correlação dos testes EIA, RIBA e RT-PCR permite algumas observações. Assim, nos indivíduos com EIA fortemente reagente com ALT alterada e RIBA positivo, confirmamos a presença do RNA do VHC pelo PCR em 90,8% dos casos (tabela 11a). Entendemos que em 9,2% dos indivíduos, embora sejam EIA fortemente reagente com níveis de ALT aumentados e RIBA positivo, não se verificou a presença do RNA viral ou porque não o tinham mais e a alteração do nível de ALT ocorreu por outras razões, ou porque, na verdade, eram indivíduos com concentrações virais abaixo do limite de sensibilidade da RT-PCR (ZHANG *et al.*, 1993). É possível considerar, também, que estes

apresentavam pequenas cargas virais que se perderam devido à degradação do RNA por RNases (HALFON *et al.*, 1996) ou ainda, pela persistência de anticorpos para o VHC sem viremia (PORCHON *et al.*, 1992). Sabemos que testes de quantificação viral, que utilizam metodologias de PCR ou similares (NASBA), não detectam cargas virais abaixo de um determinado número de cópias (limite de detecção). Consideramos assim, que estes casos estão abaixo do limite de detecção da reação do RT-*"nested"*PCR ou representam, na verdade, resultados falsos positivos para o VHC no EIA .

No grupo com EIA fracamente reagente com ALT normal e RIBA positivo, verificamos 100% de resultados negativos para a RT-PCR. Em contraposição, observamos 100% de positividade para a RT-PCR do VHC entre os casos de EIA fortemente reagente com níveis de ALT normais e RIBA positivo. Parece clara, a necessidade de se realizar a pesquisa do RNA do vírus nos indivíduos com EIA reagente e ALT normal, pois só assim poderemos identificar casos de portadores bioquimicamente normais. Somente o estudo histológico mostrará se estes indivíduos apresentam lesões hepatocíticas e qual o grau deste comprometimento. Como já referido por outros autores (MAcMaHON *et al.*, 1994), existem períodos em que indivíduos sabidamente portadores do VHC podem apresentar-se normais do ponto de vista bioquímico (níveis de ALT na faixa da normalidade), devido a níveis virêmicos baixos no momento da análise. Entretanto, do ponto de vista histológico, mostram importante comprometimento hepático característico das hepatites crônicas (NAITO *et al.*, 1994).

GRETCH, LEE & COREY (1992), no estudo comparativo do EIA com RIBA e ALT, encontraram 93% de especificidade para o EIA e ressaltaram que, para o cálculo da especificidade do RIBA, deve-se interpretar o real significado de um RIBA indeterminado.

Assim, quando estes autores consideraram o RIBA indeterminado como um resultado positivo, a especificidade deste teste foi de 94%. Por outro lado, se todos os casos de RIBA indeterminado forem considerados negativos, a especificidade será de 100%. No final, devido à existência de RIBA indeterminados com PCR positivos, os autores consideraram, que o resultado para a especificidade mais próxima do real seria de 94%. Utilizando este mesmo raciocínio para nossa casuística, observamos que em 147 casos, se considerarmos o PCR e o RIBA (apenas os positivos) como *"gold-standard"* a

especificidade do EIA utilizado será, respectivamente de 83% (122) e 92% (135). Se considerarmos o PCR como “gold-standards” para o cálculo da especificidade do RIBA, assumindo-se o RIBA indeterminado como positivo, a especificidade do RIBA neste estudo será de 85 % (122, em 143 casos).

Na população que apresentou RIBA indeterminado, notamos também dois padrões: nos EIA fortemente reagentes, a RT-PCR se mostrou positiva, independente dos valores de ALT; nos indivíduos com RIBA indeterminado e EIA fracamente reagente, 33,3% mostraram-se negativos para pesquisa do antígeno pela RT-PCR, enquanto 66,7% foram positivos para a mesma. Estes indivíduos apresentaram níveis elevados de ALT. Assim, cabe destacar, que cerca de 75% dos indivíduos com RIBA indeterminados mostraram-se positivos para a RT-PCR. Estes achados podem talvez indicar a detecção de indivíduos no início da soroconversão. Por estes resultados é imperativa a realização da RT-PCR em casos de RIBA indeterminado. Nos casos em que o RT-PCR foi negativo (25%), poderíamos considerar que havia imunidade ao VHC, ou ainda, que estivamos frente a pacientes com baixas concentrações virais, como observado por ULRICH *et al* (1990). A presença de viremia intermitente durante a infecção pelo VHC é destacada por outros autores (ALLAIN *et al.*, 1991; PRINCE *et al.*, 1993; PETERS *et al.*, 1994), bem como a ocorrência de falsa-positividade do teste de EIA (TOBLER *et al.*, 1994). Segundo alguns autores (Di BISCEGLIE *et al.*, 1991; ALTER *et al.*, 1992), devido à alta taxa de cronicidade associada a infecção pelo VHC, estes doadores deverão ser considerados potencialmente infecciosos. Já na população RIBA negativo com EIA negativo, não encontramos nenhum caso da RT-PCR positivo (grupo controle).

Entre os indivíduos com hepatite crônica, confirmada histologicamente, pudemos verificar que 96,7% apresentaram EIA fortemente reagentes (tabela 13), fazendo supor que nestes casos, com o maior tempo de exposição à doença, havia maior grau de lesão hepatocelular e portanto uma exacerbação da resposta imune. Como se sabe, a infecção pelo VHC freqüentemente evolui para um quadro crônico, com persistência viral e contínua lesão hepática de baixo grau. O modo pelo qual o VHC estabelece infecção persistente e causa lesão hepatocelular de longo tempo é pouco conhecido, porém, parece que os mecanismos virus-relacionados e imunológicos jogam um papel importante. O VHC

parece ser capaz de reduzir ou baixar a taxa de replicação, inibindo a regulação imunológica, nos períodos silentes da doença. Estes dados sugerem que durante estes ciclos da doença, a replicação viral é mínima, o vírus está em latência, como para evitar a detecção pelo sistema de defesa do hospedeiro. Este pode ser um dos mecanismos pelo qual o VHC sobrevive no hospedeiro (FARCHI *et al.*, 1991). Assim, a baixa resposta imune do hospedeiro pode providenciar proteção para o vírus, contribuindo para a lesão hepática (SPENGLER *et al.*, 1996).

Entre os casos de indivíduos com hepatites crônicas histologicamente determinados, observou-se que 95,6% apresentavam RIBA positivos e apenas 4,4% RIBA indeterminado, não se encontrando nenhum caso negativo. O papel de exame complementar do RIBA fica bem evidente, principalmente se considerarmos como infectados pelo VHC os casos de RIBA com presença de c22.3. Neste estudo pudemos verificar que os testes de EIA/RIBA utilizados apresentaram altas sensibilidades e especificidades, quando consideramos como “gold standard” a população com diagnóstico histológico de infecção pelo vírus C.

Nos indivíduos em que o exame histopatológico mostrou apenas alterações inespecíficas, encontramos 86,7% de RIBA positivo e 10% de RIBA indeterminado. Estes dados nos mostram que as alterações inespecíficas podem ser causadas pela presença do VHC no tecido hepático (tabela 13). Assim, necessitamos de métodos teciduais que nos permitam esclarecer estes casos, uma vez que a infecção pelo VHC pode não produzir nenhum sinal ou lesão específica no tecido hepático (GOODMAN & ISHAK, 1995).

Conseqüentemente, um diagnóstico seguro requer a demonstração do vírus no soro do paciente ou no tecido hepático, preferencialmente pela presença de RNA viral através da reação de RT - PCR. Uma grande variedade de técnicas tem sido utilizada para demonstrar e localizar o vírus em cortes teciduais, mas nenhuma ainda é segura o bastante para ser usada no diagnóstico de rotina.

No grupo de indivíduos com diagnósticos histopatológicos de hepatites crônicas, a positividade para a RT-PCR foi de 92,3%, o que nos leva a buscar métodos teciduais para a comprovação de 7,7% dos casos restantes. A presença do RNA do VHC

detectável no soro é um indicador confiável de infectividade (FARCI *et al.*, 1991), mas a sua ausência não assegura o estado de não-infecção (GARSON *et al.*, 1990b). As limitações da pesquisa do RNA viral no soro ficam evidentes nestes casos, talvez por uma baixa quantidade de vírus circulantes (HAGIWARA *et al.*, 1993) ou porque outros agentes possam ser os verdadeiros responsáveis pelas alterações hepáticas encontradas nestes indivíduos. Cabe ressaltar, no entanto, que estes outros agentes atuariam associadamente ao vírus C, dada a presença de alterações bioquímicas e sorológicas observadas nestes indivíduos. Nas populações cujos laudos histopatológicos mostraram alterações inespecíficas, encontramos 73,4% de resultados positivos pela RT-PCR no soro. É lícito afirmar que o laudo histopatológico de alterações inespecíficas em indivíduos sorologicamente reagentes para o VHC, e que tenham RT-PCR positivo deve ser analisado com cuidado. A presença do vírus no sangue e lesões hepáticas não características de hepatites crônicas podem significar estádios iniciais ou intermediários desta infecção, que mais tarde se expressarão com o desenvolvimento de lesões histopatológicas características de hepatites crônicas.

Analisando-se os resultados do RIBA e do RT-PCR nos 8 pacientes RIBA positivo (tabela 15 e figura 11) com hepatite crônica pelo VHC (pacientes números 1, 8, 9, 10, 15, 16, 17 e 18), notamos que 3 (37,5%) eram RIBA isoladamente positivos, enquanto 5 (62,5%) apresentavam-se com RIBA e RT-PCR positivos. Os pacientes 1, 9, 10, 15 e 17 apresentavam níveis de ALT aumentados, EIA fortemente reagente (tabela 14), RIBA e RT-PCR positivos e risco epidemiológico para VHC. Os pacientes de números 8, 16 e 18 apresentavam EIA reagente, níveis de ALT aumentados, risco epidemiológico para o VHC (pacientes 8, 18), RIBA positivo e PCR negativo. O paciente 8 era usuário de drogas endovenosas e também apresentava marcadores sorológicos para o VHB. Neste caso, a presença do HBsAg e do anti- HBc indica que o quadro histológico de hepatite crônica existia provavelmente pela presença de VHB, uma vez que não foi possível detectar o RNA do VHC no soro. De acordo com os resultados, este paciente seria classificado como imune ao VHC (EIA e RIBA positivos e PCR negativo). Poderia também estar com o nível de viremia abaixo do limite de detecção do teste e ser portador de hepatite crônica pelo VHB e VHC. Somente a demonstração de marcadores teciduais do VHC poderia eliminar esta dúvida.

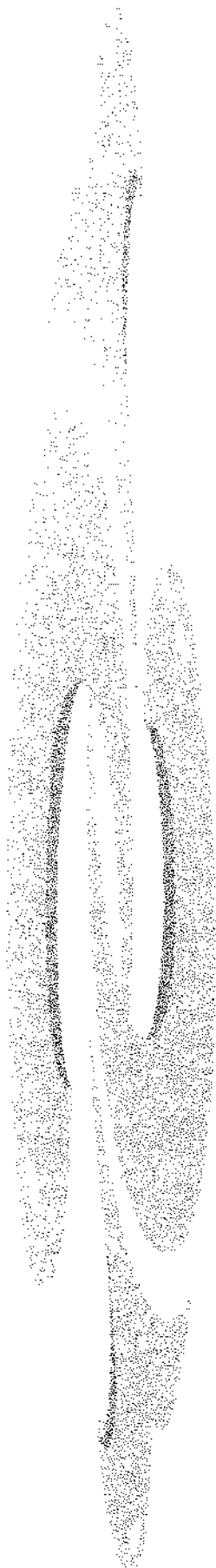
O paciente número 16 foi diagnosticado posteriormente como infectado pelo vírus da hepatite G (VHG). Neste indivíduo foi possível confirmar e seqüenciar o VHG. Somente os marcadores teciduais do VHC poderiam diagnosticar esta infecção neste paciente, pois, a RT-PCR foi exaustivamente repetida, inclusive com técnica de extração do ácido nucléico sendo repetidamente negativa.

A paciente de número 18 apresentava-se também com aumento das gamaglobulinas na eletroforese de proteínas, porém sua investigação não foi completada pois perdeu-se o contacto com a mesma. Isto poderia caracterizar falsa positividade do teste de EIA ou seria um caso de infecção pelo VHC curado ou não detectado por este método.

Poucos trabalhos relatados na literatura referem com sucesso na obtenção de reatividade para o VHC, utilizando-se técnicas imuno-histoquímicas em tecido hepático incluído em parafina (INFANTOLINO *et al.*, 1990; YAP *et al.*, 1992; WELLMANN *et al.*, 1994). Outros autores referem que muitos anticorpos dirigidos diretamente contra as regiões NS1, NS3, NS4, NS5, *core* e envelope do VHC requerem criofixação do tecido hepático para apresentarem reatividade (HIRAMATSU *et al.*, 1992; YAP *et al.*, 1992; BLIGHT *et al.*, 1994). Esta técnica seria de grande aplicação prática para o histopatologista, uma vez que os achados morfológicos são, no conjunto, sugestivos, porém não patognomônicos (FISHER *et al.*, 1996). A determinação *in situ* da presença do vírus viria confirmar as suspeitas levantadas à microscopia de rotina, a exemplo de outros agentes como o papilomavírus, o vírus da hepatite B, o citomegalovírus, o vírus de Epstein-Barr, além de outros. Nosso objetivo ao estudar este material foi o de avaliar se esta técnica poderia ter utilidade na rotina, uma vez que os casos estavam bem estudados do ponto de vista clínico, morfológico e laboratorial. Isto teria como consequência a introdução do método em nosso Serviço. Porém, infelizmente, a constante negatividade, quer utilizando-se a técnica preconizada pelo fabricante do anticorpo TORDJI-22 (imunofluorescência), quer as variantes desenvolvidas em nosso Laboratório de Imuno-histoquímica foram infrutíferas. A tentativa em cortes congelados não foi feita, mesmo porque fugiria a uma conduta rotineira da hepatopatologia e deveria ser feita prospectivamente. Por outro lado, métodos moleculares executados sobre material de biópsias hepáticas preparados com fixadores de rotina, freqüentemente geram resultados falsos negativos, devido a problemas

com as amostras, baixa carga viral e degradação do RNA nas células infectadas (KOMMINOTH et al., 1994). Ainda, segundo KOMMINOTH *et al.*(1994), a análise do RNA do VHC por RT-PCR, em extração total do tecido, é mais sensível que a RT-PCR *in situ* ou hibridização *in situ*. Pelo exposto, fica evidente que as técnicas *in situ* são mais complexas que as sorológicas, impedindo sua realização na rotina. Por isto, aguardamos a produção de anticorpos monoclonais mais sensíveis para que esta técnica se torne realidade.

O acompanhamento de casos de hepatites virais tem trazido aos clínicos muitas dúvidas diagnósticas e dificultado as correlações anatomoclínicas. A análise de nossos dados mostram que devemos incorporar todos os dados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos, a fim de buscarmos entender e elucidar as inter-relações e as variáveis envolvidas na hepatite pelo VHC.



6. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- 1- É possível desenvolver-se um método para detecção de partículas virais do VHC no soro, sem a extração clássica do RNA viral, pela RT-PCR, utilizando-se dois pares de “primers” da região 5' não-transcrita do genoma do VHC, que permitem detectar a maioria dos genótipos do VHC conhecidos, uma vez que fazem parte da região mais conservada do genoma deste vírus.
- 2- A utilização deste método possibilitou identificar partículas virais do VHC no soro de 89,5% dos doadores de sangue positivos para o teste de EIA-2 .
- 3- Existe forte associação entre o grau de positividade do EIA e do RIBA e a presença de partículas virais no soro pela RT-PCR.
- 4- O RIBA mostrou-se necessário para definir a condição sorológica dos indivíduos com baixa reatividade para o anti-VHC-EIA, uma vez que em apenas 53% se confirmou a positividade inicial do teste de EIA, permanecendo 23,5% como indeterminado e 23,5% como negativo. Deste modo, o RIBA permitiu a exclusão dos resultados falsos-positivos do EIA.
- 5- Pode-se observar uma correlação direta entre a reatividade contra o antígeno do *core* do VHC (c22.3) e a presença de partículas virais no soro. Nestes casos de RIBA indeterminado verificaram-se 87,5% de positividade para o RNA-VHC pela RT-PCR.
- 6- O RNA-VHC foi detectado pela RT-PCR em 91,5% dos casos com elevada reatividade para o EIA. Observou-se o inverso nos casos de EIA com baixa reatividade, ou seja, a frequência de resultados negativos para o RNA-VHC pela RT-PCR foi de cerca 10 vezes maior. Estes dados fazem supor que a presença de altas concentrações de anticorpos se acompanha da presença de antígeno detectável, e portanto de uma maior transmissibilidade e infectividade destes indivíduos.

- 7- Houve concordância de 85,9% entre os resultados positivos de RIBA e RT-PCR. Por isto, conclui-se que, estes dois testes devem ser aplicados isolada ou sequencialmente para confirmar a infecção pelo VHC, principalmente em populações onde as prevalências desta infecção são baixas.
- 8- Nos indivíduos com hepatites crônicas histologicamente confirmados não se encontrou nenhum caso com resultado de RIBA negativo, e houve 92,3% de positividade para o RNA do VHC por RT-PCR. Estes dados nos fazem supor que indivíduos cronicamente infectados apresentam partículas virais circulantes no soro.
- 9- Os testes de EIA e RIBA utilizados apresentaram altas sensibilidades e especificidades, no grupo de indivíduos com diagnóstico histopatológico de hepatites crônicas que apresentaram positividade para o RNA do VHC pela RT-PCR.
- 10- A triagem sorológica utilizada para prevenir transmissão do VHC na transfusão de sangue mostrou-se eficiente e capaz de selecionar os doadores infectados, principalmente se for usada como critério a relação DO/C no teste de EIA.
- 11- A utilização do anticorpo monoclonal específico, TORDJI-22, em tecido hepático parafinado, pela técnica de imuno-histoquímica ou imunofluorescência, não permitiu evidenciar a presença do VHC no tecido hepático em nossa casuística.
- 12- A utilização dos testes de triagem sorológica (EIA e RIBA) associada ao método da RT-PCR e ao diagnóstico anatomopatológico, propiciará ao clínico identificar e estadiar a infecção, bem como entender melhor as inter-relações e as variáveis envolvidas na infecção pelo vírus C.



7. SUMMARY

The transmission of hepatitis C virus in Brazil is currently monitored either by an anti-HCV enzyme-immunoassay (EIA) or by the determination of ALT serum levels. However specificity of the anti-HCV EIA in low seroprevalence populations has been questioned. In order to evaluate the efficiency of this test, blood samples were screened for the presence of viral RNA using RT-PCR and the results then compared with those of the EIA and recombinant protein immunoblot assay (RIBA) tests. Immunohistochemistry and immunofluorescence of paraffin embedded hepatic tissue were employed to detect HCV tissue markers using a specific monoclonal antibody.

A total of 178 serum samples obtained from voluntary blood donors at the Hematology and Hemotherapy Center (UNICAMP) and 18 samples from patients who were attended by the Hepatitis Group of the Infectious and Parasitic Diseases Unit were studied between January, 1994 and December 1995.

One hundred and forty-seven samples (82.6%) consistently reacted with anti-HCV antibody but not with HBsBAG, anti-HBc, anti-HIV1/2, or anti-HTLVI/II antibodies; these samples were negative for syphilis and the Chagas' disease. The remaining 31 samples (17.4%) were consistently negative for all of the above serological markers and showed normal ALT levels (control group). The 18 samples obtained from hepatitis patients were negative for anti-HIV1/2 antibody.

The 147 positive donors were divided into subgroups based on the cutoff (C) for the optical density readings (OD) of the anti-HCV EIA test and on their ALT levels. The RNA sequence of HCV was detected by RT-nested PCR using primers from the 5' non-transcribed region which is the most conserved of the viral genome. A RIBA-2 was also performed on these samples.

The majority (95.4%) of the samples that gave a strongly reactive EIA result also showed an increase in the serum ALT levels while only 47.1% of the weakly reactive EIA subgroup had elevated serum ALT levels. The co-positivity of the EIA test with the RIBA test in the strongly reactive EIA subgroup was 96.9%. The RIBA test proved to be important and necessary in defining the serological status of the weakly reactive EIA

subgroup; thus, 53% of the samples were EIA positive, 23.5% were negative and in 23.5% was not determined.

There was a direct positive relationship between the reactivity to the HCV core (c22.3) and the presence of serum viral particles. Among indeterminate RIBA results (reactive only to c22.3) 87.5% were positive by RT-PCR. HCV-RNA was detected in 91.5% of the strongly reactive EIA samples compared to only 17.6% observed in the weakly reactive EIA group. There was a high level of agreement 85.9% between the RIBA results and RT-PCR test. Based on this findings these two tests may be used either separately or sequentially to confirm an HCV infection, particularly in populations where the prevalence of this infection is low (as in the case of blood donors). There were no RIBA negative results in individual with histologically confirmed chronic hepatitis. Using RT-PCR, RNA-HCV was detected in 92.3% of this group. Our results showed a high sensitivity and specificity for EIA and RIBA tests in individuals with a histopathological diagnosis of chronic hepatitis and who were positive by the RT-PCR test.

In conclusion, the serological screening as performed in our laboratory for HCV transmission in blood transfusions is efficient and capable of detecting infected donors, particularly if the OD/C report of the EIA test is used as a criterion. The specific monoclonal antibody TORDJI-22 was unable to detect the presence of HCV in the hepatic tissue evaluated by immunohistochemical or immunofluorescent techniques.

The EIA and RIBA tests, association with RT-PCR method and anatomico-pathological diagnosis, may be useful in evaluating the relationships and parameters involved HCV infections.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACH, R.D. - Viral hepatitis. In: FEIGIN, R.D. & CHERRY, J.D., EDS. - **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. Philadelphia, W.B. Saunders Co., v.1,1981, p.513-532.
- AACH, R.D.; SZMUNES,W.; MOSLEY, J.W.; HOLLINGER, F.B.; KAHN, R.A.; STEVENS, C.E.; EDWARDS, V.M. ;WERCH, J. - Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A,non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted virus study. **N. Engl. J. Med.**, **304**: 989-994, 1981.
- ABE, K. & INCHAUSPE, G. - Transmission of hepatitis C by saliva. **Lancet.**, **337**: 248,1991.
- ALBERTI, A.; CHEMELLO, L.; CAVALLETO, D.; TAGGER, A.; DAL CANTON, A.; BIZZARO, N.; TAGARIELLO, G.; RUOL, A. - Antibody to hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donors. **Ann. Intern. Med.**, **114**: 1010-1012, 1991.
- ALBERTI, A.; MORSICA, G.; CHEMELLO, L.; CAVALLETO, D.; NOVENTA, F.; PONTISSO, P.; RUOL, A. - Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals. **Lancet**, **340**: 697-698, 1992.
- ALLEN, T.C. - Hematoxylin and Eosin. In PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H., ed. - **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1992, p53-57.
- ALLEN, J.G. & SAYMAN, W.A. - Serum hepatitis from transfusions of blood. **JAMA**, **180**: 1079-1085, 1962.
- ALLAIN, J-P.; DAILEY, S.; LAURIAN,Y.; VALLARI, D.; RAFOWICZ, A.; DESAI, S.; DEVARE, S. - Evidence for persistent hepatitis C virus (HCV) infection in hemophiliacs. **J. Clin. Invest.**, **88**: 1672-1679, 1991.
- ALMEIDA, J.D.; RUBEINSTEIN, D.; STOTT, E.J. - New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. **Lancet**, **2**: 1225-1227, 1971.

- ALTER, H.J. -Clinical, virological and epidemiological basis for the treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. **J. Hepatol.**, 11(Suppl. 1): S19-S25, 1990.
- ALTER, H.J. - Descartes before the horse: I clone therefore I am: the hepatitis C in current perspective. **Ann. Intern. Med.** 115: 644-649, 1991.
- ALTER, M.J.; AHTONE, J.; WEISFUSE, I.; STARKO, K.; VACALIS, D.; MAYNARD, J.E. - Hepatitis B virus transmission between heterosexuals. **JAMA**, 256: 1307-1310, 1986.
- ALTER, M.J.; COLEMAN, P.J.; ALEXANDER, W.J.; KRAMER, E.; MILLER, J.K.; MANDEL, E.; HADLER, S.C.; MARGOLIS, H.S. - Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. **JAMA.**, 262: 1201-1205, 1989a.
- ALTER, H.J.; HOLLAND, P.V.; PURCELL, R.H.; LANDER, J.J.; FEINSTONE, S.M.; MORROW, A.G.; SCHMIDT, P.J. - Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. **Ann. Intern. Med.**, 77: 691-699, 1972.
- ALTER, M.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWCZYNSKI, K.; JUDSON, F.; MARES, A.; ALEXANDER, W.; HU, P.; MILLER, J.; GERBER, M.; SAMPLINER, R.; MEEKS, E.; BEACH, M. - The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **N. Eng. J. Med.**, 327: 1899-1905, 1992.
- ALTER, H.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWCZYNSKI, K.; MARES, A.; JUDSON, F.N.; HU, P.Y.; ALEXANDER, W.J.; SAMPLINER, R.E.; GERBER, M.A.; KUO, G.; HOUGHTON.; BRADLEY, D.W. - Clinical outcome and risk factors associated with hepatitis C in the United States. **Hepatology**, 10: 581, 1989b.
- ALTER, H.J.; PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V.; ALLING, D.W.; KOZIOL, D.E. - Donors transaminase and recipient hepatitis: impact on blood transfusion services. **JAMA.**, 246: 630-634, 1981.

- ALTER, H.J.; PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V.; FEINSTONE, S.M.; MORROW, A.G.; MORITSUGU, Y. - Clinical and serological analysis of transfusion associated hepatitis. **Lancet.**, 2: 838-841, 1975.
- ALTER, H.J.; PURCELL, R.H.; SHIH, J.W.; MELPOLDER, J.C.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q.L.; KUO, G. - Detection of antibodies to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, 321: 1494-1500, 1989c.
- ANNICCHINO - BIZZACCHI, J.M.; GONÇALES Jr., F.L.; RIBEIRO, C.C.; SIEGL, T.F.G.M.; GALLIZONI, A.M.; SILVA, V.M.A. - Hemostasis in hepatitis C virus. **Rev. Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia**. VI (2): 184, 1993.
- APPELBAUM, E. & KALKSTEIN, M. - Artificial transmission of viral hepatitis among intravenous diacetylmorphine addicts. **JAMA**, 147: 222-224, 1951.
- AREIAS, J.; PEDROTO, I.; FREITAS, T.; CERQUEIRA, R.; TEIXEIRA, R.; PINHO, I.; JUSTIÇA, B.; SARAIVA, A.M. - Hepatitis C virus carriers with normal ALT activity: viraemia, genotype and effect of interferon therapy. **Gastroenterology**, 110: A1143, 1996.
- BANG, N.U.; RUEGSEGGER, P.; LEY, A.B.; La DUE, J.S. - Detection of hepatitis carrier by serum glutamic oxalacetic transaminase activity. **JAMA**, 171: 2303-2306, 1959.
- BEESON, P.B. - Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. Report of seven cases. **JAMA**, 121: 1332-1334, 1943.
- BENAMOUZIG, R.; EZRATTY, V.; CHAUSSADE, S. - Risk for type C hepatitis through sexual contact. **Ann. Inter. Med.**, 113 (8): 638, 1990.
- BENSABATH, G.; HADLER, S.C.; SOARES, M.C.P.; FIELDS, W.; DIAS, L.B.; POPPER, K.; MAYNARD, J.E. - Hepatitis delta virus infection and Lábrea hepatitis: prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Brazil. **JAMA**, 258: 479-483, 1987.

- BLIGHT, K.; LESNIEWSKI, R.R.; La BROOY, J.T.; GOWANS, E.J. - Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. **Hepatology**, **20**: 553-557, 1994.
- BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. - A new antigen in leukemia sera. **JAMA**, **191**: 541-546, 1965.
- BLUMBERG, B.S.; SUTNICK, A.I.; LONDON, W.T. - Australia antigen and hepatitis. **JAMA**, **207**: 1895-1896, 1969.
- BOUDART, D.; LUCAS, J.C.; MULLER, J.Y.; LE CARRER, D.; PLANCHON, B.; HAROUSSEAU, J.L. - False-positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinaemia. **Lancet**, **336**: 63, 1990.
- BRADLEY, D.W. - The agents of non-A, non-B hepatitis. **J. Virol. Methods**, **10**: 307-319, 1985.
- BRADLEY, D.W. & MAYNARD, J.E. - Etiology and natural history of post-transfusional enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Semin. Liver Dis.**, **6**: 56-66, 1986.
- BRADLEY, D.W.; McCAUSTLAND, K. A.; COOK, E.H.; SCHABLE, C.A.; EBERT, J.W.; MAYNARD, J.E. - Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: physicochemical evidence that the tubule-forming agent is small, enveloped virus. **Gastroenterology**, **88**: 773-779, 1985.
- BUSCH, M.P.; TOBLER, L.; QUAN, S.; WILBER, J. C.; JOHNSON, P.; POLITO, A.; STEANE, E.; ZOLA, A.; BAHL, C.; NELLES, M.; LEE, S. R. - A pattern of 5-1-1 and c100-3 only on hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay does not reflect HCV infection in blood donors. **Transfusion**. **33**: 84-88, 1993.
- CARDOSO, M.S.; KOERNER, K.; EPPLE, S.; KUBANEK, B. - Prevalence of HCV-RNA-positive blood donors and correlation to ELISA and RIBA status. **Ann. Hematol.** **66**: 147-151, 1993.

- CERINO, A.; BISSOLATI, M.; CIVIDINI, A.; NICOSIA, A.; ESUMI, M.; HAYASHI, N.; MIZUNO, K.; SLOBBE, R.; OUDSHOOM, P.; SILINI, E.; ASTI, M.; MONDELLI, M.U. - Antibody response to the hepatitis C virus E2 protein: relationship, to viraemia and prevalence in anti-HCV seronegative subjects. **J. Med. Virol.**, **51**: 1-5, 1997.
- CHEN, D.S.; KUO, G.C.; SUNG, J.L.; LAY, M.Y.; SHEU, J.C.; CHEN, P.J.; YANG, P.M.; HSU, H.; CHANG, M.H.; CHEN, C.J.; HAHN, L.C.; CHOO, Q.L.; WANG, T.H.; HOUGHTON, M. - Hepatitis C virus infection in area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease: the Taiwan experience. **J. Infect. Dis.**, **162**: 817-822, 1990.
- CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. - Isolation of a DNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. **Science.**, **224**: 359-362, 1989.
- CHOO, Q.L.; RICHAMN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER, A.J.; BRADLEY, D.W.; KUO, G.; HOUGHTON, M. - Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 2451-2455, 1991.
- CHOO, Q.L.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; KUO, G.; HOUGHTON, M.; BRADLEY, D.W. - Hepatitis C virus: The major causative agent of viral non-a, non-B hepatitis. **Br. Med. Bul.**, **46**: 423-441, 1990.
- COUROUCÉ, A.M.; JANOT, C. ; THE HEPATITIS STUDY GROUP OF THE FRENCH SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION. Recombinant immunoblot assay first and second generations on 732 blood donors reactive for antibodies to hepatitis C virus by ELISA. **Vox Sang.**, **61**: 177-180, 1991.
- CILLA, G.; PEREZ-TRALLERO, E.; ITURRIZA, M.; CARCEDO, A. - Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. **Ped. Infect. Dis. J.**, **11**: 417, 1992.

- COSTA, F.F. & COSTA, S.C.B. - Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas . **Rev. Bras. Reumatol.**, **32**(3): 142-146, 1992.
- CRAZI, A.; VALENZA, M.; FABIANO, C.; MAGRIN, S.; FIORENTINO, G.; DIQUATTRO, O.; PAGLIARO, L. - Thrid-generation hepatitis C virus tests in asymptomatic anti-HCV-positive blood donors. **J. Hepatol.**, **21**: 730-734, 1994.
- DANE, D.S.; CAMERON, C.H.;BRIGGS, M. - Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet** ., **1**: 695-698, 1970.
- DAVIS, G.L.; BALART, L.A.; SCHIFF, E.R.; LINDSAY, K.; BODENHEIMER, H.C.; PERILLO, R.P.; CAREY, W.; JACOBSON, I.M.; PAYNE, J.; DIENSTAG, J.L.; VanTHIEL, D.H.; TAMBURRO, C.; LEFKOWITCH, J.; ALBRECHT, J.; MESCHIEVITZ, C.; ORTEGO, T.J.; GIBAS, A.; THE HEPATITIS INTERVENCIONAL THERAPY GROUP. - Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. **N. Engl. J. Med.**, **321**: 1501-1506, 1989.
- De GROOT, J. - Prevalence and significance of anti-HCV antibodies. **Acta Gastroenterologica Belgica**, **54**(3-4): 248-256, 1991.
- DI BISCEGLIE, A.; GOODMAN, Z.; ISHAK, K.; HOOFNAGLE, J.; MELPOLDER, J.; ALTER, H. - Long term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. **Hepatology**, **14**: 969-974, 1991.
- DOURAKIS, S.; BROWN, J.; KUMAR, U.; KARAYIANNIS, P.; KERNOFF, P.; CHIBA, J.; OHBA, H.; MIYAMURA, T.; SAITO, I.; MONJARDINO, J.; THOMAS, H. - Serological response and detection of viraemia in acute hepatitis C viral infection. **J. Hepatol** ., **14**: 370-376, 1992.
- DOW, B.C.; COOTE, I.; MUNRO, H.; McOMISH, F.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P.; FOLLET, E.A.C. - Confirmation of hepatitis C virus antibody in blood donors. **J. Med. Virol.** **41**: 215-220, 1993.

- DUSHEIKO, G.M.; SMITH, H.M.; SHEVER, P.J. - Hepatitis C virus transmitted by human bite. **Lancet**, **336**(8713): 503-504, 1990.
- EBELING, F.; NAUKKARINEN, R.; LEIKOLA, J. - Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as a predictor of infectivity. **Lancet**, **335**: 982-983, 1990.
- ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. - Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, **252**: 1643-1651, 1991.
- ESTEBAN, J.I.; ESTEBAN, R.; VILADOMIU, L.; LOPEZ-TALAVERA, J.C.; GONZALEZ, A.; HERNANDES, J.M.; ROGET, M.; VARGAS, V.; GENESCA, J.; BUTI, M.; GUARDIA, J.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q.L.; KOU, G. - Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. **Lancet**, **2**: 294-297, 1989.
- ESTEBAN, J.I.; GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, J. M.; VILADOMIU, L.; SANCHES, C.; LOPEZ-TALAVERA, J.C.; LUCEA, D.; MARTIN-VEGA, C.; VIDAL, X.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J. - Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a contemporary study of transfusion-associated hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, **323**: 1107-1112, 1990.
- ESTEBAN, J.I.; LOPEZ-TALAVERA, J.C.; GENESCA, J.; MADOZ, P.; VILADOMIU, L.; MUNIZ, E.; MARTIN-VEGA, C.; ROSELL, M.; ALLENDE, H.; VIDAL, X. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. **Ann. Intern. Med.**, **115** : 443-449, 1991.
- EVERHART, J.E.; DI BISCEGLIE, A.M.; MURRAY, L.M.; ALTER, H.J.; MELPOLDER, J.J.; KUO, G.; HOOFNAGLE, J.H. - Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. **Ann. Intern. Med.**, **112**: 544-545, 1990.
- EYSTER, M. E.; ALTER, H.J.; ALEDORT, L.M.; QUAN, S.; HATZAKIS, A.; GOEDERT, J.J. - Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). **Ann. Intern. Med.**, **115**: 764-768, 1991.

- FAGAN, E. A. & WILLIAMS, R. - Fulminant viral hepatitis. **Br. med. Bul.**, **46**: 462-480, 1990.
- FARCI, P.; ALTER, J.H.; WONG, D.; MILLER, R.H.; SHIH, J.W.; JEFF, B.; PURCELL, R.H.; -A Long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.** **325**: 98-104, 1991.
- FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; PURCELL, R.H.; ALTER, H.J.; HOLLAND, P.V. - Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N. Engl. J. Med.**, **292** : 767-770, 1975.
- FEUCHT, H. H.; ZÖLLNER, B.; POLYWKA, S.; LAUFS, R. - Study on reliability of commercially available hepatitis C virus antibody tests. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 620-625, 1995
- FISHER, H.P.; WILLSCH, E.; BIERHOFF, E.; PFEIFER, U. - Histopathologic findings in chronic hepatitis C. **J. hepatol.**, **24**: 35-42, 1996.
- FONG, T.; SHINDO, M.; FEINSTONE, S.M.; HOOFNAGLE, J.H.; BISCEGLIE, A.M. - Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral in liver and serum of patients with chronic hepatitis. **J. Clin. Invest.**, **88**: 1058-1060, 1991.
- FOX, J.P.; MANSO, C.; PENNA, H.A.; PARÁ, M. - Observation on the occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever . **Amer. J. Hyg.**, **36**: 68-116, 1942.
- FRÖSNER, G.G. Sensitivity of second-generation anti-HCV for diagnosis of acute hepatitis C. **Infection**, **19**: 434,1991.
- FUCHS, K.; MOTZ, M.; SCHREIER, E; ZACHOVAL, R.; DEINHARDT, F.; ROGGENDORF, M. - Characterization of nucleotide sequences from European hepatitis C virus isolates. **Gene**, **103**: 163-169, 1991.

- GARCIA-SAMANIEGO, J.; ENRIQUEZ, A.; SORIANO, V.; GUTIERREZ, M.; BAQUERO, M.; MUNOZ, F. - Third-generation recombinant immunoblot assay to confirm hepatitis C virus-indeterminate serological samples. *Vox Sang.*, **64**: 191-192, 1993.
- GARSON, J.A.; TEDDER, R.S.; BRIGGS, M.; TUKE, P.; GLAZEBROOK, J.A.; TRUTE, A.; PARKER, D.; BARBARA, J.A.J.; CONTRERAS, M.; AOLYSIUS, S. - Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet.*, **335**: 1419-1422, 1990a.
- GARSON, J.A.; TUKE, P.W.; MARKIS, M.; BREGGS, M.; MACHIN, S.J.; PRESTON, F.E.; TEDDER, R.S. - Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis-C-virus contaminated factor VII concentrates. *Lancet*, **336**: 1022-1025, 1990b.
- GERLICH, W.H.; LUER, W.; THOMSEN, R.; THE STUDY GROUP FOR VIRAL HEPATITIS OF DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT. - Diagnosis of acute and inapparent hepatitis B virus infections by measurement of IgM antibody to hepatitis B core antigen. *J. Infect. Dis.*, **142**: 95-101, 1980.
- GILES, J.P.; McCOLLUM, R.W.; BERNDTSON, I.W., Jr.; KRUGMAN, S. - Relation of Australia/SH antigen to the Willowbrook MS-2 strain. *N. Engl. J. Med.*, **281**: 119-121, 1969.
- GIOVANNINI, M.; TAGGER, A.; RIBEIRO, M.L.; ZUCCOTTI, G.; POGLIANI, L.; GROSSI, A.; FERRONI, P.; FIOCCHI, A. - Maternal-infant transmission of hepatitis C virus and HIV infections: a possible interaction. *Lancet*, **335**: 1166, 1990.
- GIUBERTI, T.; MARIN, M.G.; FERRARI, C.; MARCHELLI, S.; SCHIANCHI, C.; ANTONI, A.M.D.; PIZZOCOLO, G.; FIACCADORI, F. - Hepatitis C virus viremia following clinical resolution of acute hepatitis C. *J. Hepatol.* **20**: 666-671, 1994.
- GONÇALES Jr., F.L. & BARRAVIERA, B. - Hepatite por virus C. *JBM.*, **69(2)**: 38-48, 1995.

- GONÇALES Jr, F.L.; BOCCATTO, R.S.B.S.; PEDRO, R.J.; PAPAIOORDANOU, P.M.O.; SOUZA, C.A.; GONÇALES, N.S.L.; PELLEGRINO JR.,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**,35(1): 45-51, 1993a.
- GONÇALES Jr., F.L.; PEDRO,R.J.; SILVA, L.J.; BOCCATTO, R.S.B.S.; RAMOS, M.C.; GONÇALES, N.S.L. - Hepatites pós transfusionais na cidade de Campinas, SP, Brasil: I. incidência,agentes etiológicos e aspectos clínico-epidemiológicos da hepatite por vírus C. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 35(1): 53-62, 1993b.
- GONÇALES Jr., F.L.; PEDRO,R.J.; SILVA, L.J.; BOCCATTO, R.S.B.S.; RAMOS, M.C.; GONÇALES, N.S.L - Hepatitis pós-transfusionais na cidade de Campinas, SP,Brasil. II - Presença dos anticorpos anti-HBc e anti-HCV em candidatos a doadores de sangue e ocorrência de hepatitis pós-transfusionais pelo vírus C nos receptores de sangue ou derivados. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 35(1): 63-71, 1993c.
- GONZALEZ-PERALTA , R.P.; FANG, J.W.S.; DAVIS, G.L.; GISH, R.G.; WU, P.C.; MIZOKAMI, M.; LAU, JYN. - Immunopathobiology of chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**. 20: 232A, 1994.
- GOODMAN, Z.D.& ISHAK, K.G. - Histopathology of hepatitis C virus infection. **Sem. Liver. Dis.** 15: 70-81, 1995.
- 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.** 30: 2145-2149, 1992.
- HADLER, S.C.; DE MONZON, M.; PONZETTO, A; ANZOLA, E.; RIVERO, D.; MONDOLFI, A;BRACHO, A.; FRANCIS, D.P.; GERBER, M.A.; THUNG, S.;GERIN, J.; MAYNARD, J.E.; POPPER, H.; PURCELL, R.H. - Delta virus infection and severe hepatitis: an epidemic in the Yucpa indians of Venezuela. **Ann.Intern.Med.**,100: 339-344, 1984.

- HAGIWARA, H.; HAYASHI, N.; MITA, E.; TAKEHARA, T.; KASAHARA, T.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. - Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. **Gastroenterology**, **104**(3): 877-883, 1993.
- HALFON, P.; KHIRI, H.; GEROLAMI, V.; BOURLIERE, M.; FERYN, J.M.; REYNIER, P.; GAUTHIER, A.; CARTOUZOU, G. - Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. **J. Hepatol.** **25**: 307-311, 1996.
- HAN, J.H.; SHYAMALA, V.; RICHMAN, K.H.; BRAUER, M.J.; IRVINE, B.; URDEA, M.S.; TEKAMP-OLSON, P.; KUO, G.; CHOO, Q-L.; HOUGHTON, M. - Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at 3' end. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **88**: 1711-1715, 1991.
- HAVENS, W.P.Jr. - Infectious hepatitis. **Medicine**, **27**: 279-326, 1948.
- HAYASHI, N.; HIGASHI, H.; KAMINAKA, K.; SUGIMOTO, H.; ESUMI, M.; KOMATSU, K.; HAYASHI, K.; SUGITANI, M.; SUZUKI, K.; TADAO, O.; NOZAKI, C.; MIZUNO, K.; SHIBATA, T. - Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. **J. Hepatol.**, **17**: S94-S107, 1993.
- HE, L.F.; ALLING, D.; POPKIN, T.; SHAPIRO, M.; ALTER, H. J.; PURCELL, R.H. - Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. **J. Infect. Dis.**, **156**: 636-640, 1987.
- HIRAMATSU, N.; HAYASHI, N.; HARUMA Y.; KASAHARA, A.; FUSAMOTO, H.; MORI, C.; FUKU, I.; OKAYAMA, H.; KAMADA, T. - Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome. **Hepatology**, **16**: 306-11, 1992.
- HOOFNAGLE, J.H.; GERETY, R.J.; NI, L.Y.; BARKER, L.F. - Antibody to hepatitis B core antigen. A sensitive indicator of hepatitis B replication. **N. Engl. J. Med.**, **290**: 1336-1340, 1974.

- HOOFNAGLE, J.H.; SEEFF, L.B.; BALES, Z.B.; ZIMMERNAN, H.J.; THE VETERANS ADMINISTRATION HEPATITIS COOPERATIVE STUDY GROUP. - Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N. Engl. J. Med.*, **298**: 1378-1383, 1978.
- HOUGHTON, M.; WEINER, A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q-L. - Molecular biology of hepatitis C viruses : implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, **14**: 381-388, 1991.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. - A comparative study of peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Ann. J. Clin. Pathol.*, **75**: 734-738, 1981.
- IKEDA, Y.; TODA, G.; HASHIMOTO, N.; KUROKAWA, K. Antibody to superoxidase dimutase, autoimmune hepatitis and antibody tests for hepatitis C. *Lancet*, **335**: 1345-1346, 1990.
- INFANTOLINO, D.; BONINO, F.; ZANETTI, A. R.; LESNIEWSKI, R. R.; BARBAZZA, R.; CHIARAMONTE, M. - Localization of hepatitis C virus (HCV) antigen by immunohistochemistry on fixed-embedded liver tissue. *Ital. J. Gastroenterol.*, **22**: 198-199, 1990.
- KAMITSUKASA, H.; HARADA, H.; YAKURA, M.; FUKUDA, A.; KOBAYASHY, A.; SAITO, I.; MIYAMURA, T.; CHOO, Q.L.; HOUGHTON, M.; KUO, G. - Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet.*, **2(8669)**: 987, 1989.
- KANAI, K.; IWATA, J.; NAKAO, K.; KAKO, M.; OKAMOTO, H. - Supression of hepatitis C virus RNA by interferon alpha. *Lancet*, **336**: 245, 1990.
- KANE, M.A.; BRADLEY, D.W.; SHRESTHA, S.M.; MAYNARD, J.E.; COOK, E.H.; MISHRA, R.P.; JOSHI, D.D. - Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA*, **252**: 3140-3145, 1984.

- KATO, N.; HUIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKIGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SUGIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. - Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from japanese patients with non-A, non-B type. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **87**: 9524-9528, 1990.
- KHUROO, M.H. - Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis .Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. **Am. J. Med.**, **68**: 818-824, 1980.
- KIYOSAWA, K.; AKAHANE, Y.; NAGATA, A.; FURUTA, S. - Hepatocellular carcinoma after non-A, non-B post-transfusion hepatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, **79**: 777-781, 1984.
- KOERNER, K.; CARDOSO, M.S.; DENGLER, T.H.; KEROWGAN, M.; KUBANEK, B. - Look back on hepatitis C virus infections of HCV-RIBA-2-positive blood donors and their respective recipients. **Vox Sang.**, **69**: 78-79, 1995.
- KOFF,R.S.; SLAVIN, M.; CONNELLY, L.J., ROSEN, D.R. - Contagiousness of acute hepatitis B: secondary attack rates in household contacts. **Gastroenterology**, **72**: 297-300, 1977.
- KOMMINOTH, P.; ADAMS, V.; LONG, A.A.; ROTH, J.; SAREMASLANI, P.; FLURY, R.; SCHMID, M.; HEITZ, U. - Comparison of histology, immunohistochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) *in situ* hibridization and *in situ* RT-PCR for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. **Verh. Dtsch. Ges. Path.**, **78**: 220-225, 1994
- KRAJDEN, M.; ZHAO, J.; BOURKE, C.; SCALIA, V.; GILL, P.; LAU, W. - Detection of hepatitis C virus by PCR in second-generation enzyme immunoassay-seropositive blood donors by using matched pairs of fresh frozen plasma and pilot tube sera. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 2191-2195, 1996.

- KRAWCZYNSKI, K.; BEACH, M.J.; BRADLEY, D.W.; KUO, G.; DI BISCEGLIE, A.M.; HOUGHTON, M.; REYES, G.R.; KIM, J.P.; CHOO, Q-L.; ALTER, M.J. - Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology*, **103**: 622-629, 1992.
- KRUGMAN, S.; GILES, J.P.; HAMMONDS, J. - Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA*, **200**: 365-373, 1967.
- KUMAR, U.; THOMAS, H. C.; MONJARDINO, J. - Serum HCV RNA levels in chronic HCV hepatitis measured by quantitative PCR assay; correlation with serum AST. *J. Virol. Methods*, **47**: 95-102, 1994.
- KUO, G.; CHOO, Q.L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L.; ALTER, M.J.; STEVENS, C.E.; TEGTMEIER, G.E.; BONINO, F.; COLOMBO, M.; LEE, W.S.; KUO, C.; BERGHER, K.; SHUSTER, J.R.; OVERBY, L.R.; BRANDLEY, D.W.; HOUGHTON, M. - An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non B hepatitis. *Science*, **224**: 352-364, 1989.
- KWOK, S. & HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, **339**: 237-238, 1989.
- LAM, J.P.H.; McOMISH, F.; BURNS, S.M.; YAP, P.L.; MOK, J.Y.Q.; SIMMONDS, P. - Infrequent vertical transmission of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.*, **167**: 572-576, 1993.
- LAU, J.Y.N.; DAVIS, G.L.; KNIFFEN, J.; QIAN, K-P.; URDEA, M.S.; CHAN, C.S.; MIZOKAMI, M.; NEUWALD, P.D.; WILBER, J.C. - Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet*, **341**: 1501-1504, 1993.
- LAZIZI, Y.; ELFASI, E.; PILLOT, J. - Detection of hepatitis C virus sequence in sera with controversial serology by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **30(4)**: 931-934, 1992.

- LENZI, M.; BALLARDINI, G. ; FUSCON, M.; CASSANI, F.; SELLERI, L.; VOLTA, U.; ZAULI, D.; BIANCHI, F.B. - Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. **Lancet**, **335**: 258-259, 1990.
- MACCALUM, F.O. & BRADLEY, W.H. - Transmission of infective hepatitis to human volunteers. **Lancet**, **2**: 228, 1944.
- MACFARIANE, I. G.; SMITH, H.M.; JOHNSON, P.J.; BRAY, G.P.; VERGANI, D.; WILLIAMS, R. - Hepatitis virus antibodies in chronic active hepatitis pathogenic factor or false positive results? **Lancet.**, **335**: 754-757, 1990.
- MACMAHON, R.F.T.; YATES, A.J.; McLINDON, J.; BABBS, C.; LOVE, E.M.; WARNES, T.W. - The histopathological features of asymptomatic hepatitis C virus-antibody positive blood donors. **Histopathology**, **24**: 517-524, 1994.
- MARTELL, M.; ESTEBAN, J.I.; QUER, J.; GENESCÀ, J.; WEINER, A.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J.; GOMEZ, J. - Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J. Virol.**, **66**: 3225-3229, 1992.
- McHUTCHINSON, J.G.; PERSON, J.L.; GOVINDARAJAN, S.; VALINLUCK, B.; GORE, T.; LEE, S.R.; NELLES, M.; POLITO, A.; CHIEN, D.; Di NELLO, R.; QUAN, S.; KUO, G.; REDEKER, A.G. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. **Hepatology**, **15**: 19-25, 1992.
- MELBYE, M.; BIGGAR, R.J.; WANTZIN, P.; KROGSGARRD, K.; EBBESEN, P.; BECKER, N.G. - Sexual transmission of hepatitis C virus: cohort study (1981-9) among European homosexual men. **Br. Med. J.**, **301**: 210-212, 1990.
- MENTOVE, J.; RICHARDS, W.A.; DESTREE, M. - Early U.S. experience with anti-HCV Kit in blood donors. **Lancet**, **336**: 243-244, 1990.
- MILLER, R.H. & PURCELL, R.H. - Hepatitis C virus shares aminoacids with pestivirus and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **87**: 2057-2061, 1990.

- MURRAY, R.; DIEFENBACH, W.C.L.; RATNER, F.; LEONE, N.C.; OLIPHANT, J.W.-
Confirmation of carrier state by transmission experiments in volunteers. **JAMA**, **154**:
1072-1074, 1954.
- NAITO, M.; HAYASHI, N.; HAGIWARA, H.; HIRAMATSU, N.; KASAHARA, A.;
FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. - Serum hepatitis C virus RNA quantity and
histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels.
Hepatology, **19**: 871-875, 1994.
- NEEFE, J.R.; NORRIS, R.F.; REINHOLD, J.G.; MITCHELL, C.B.; HOWELL, D.S. -
Carriers of hepatitis virus in the blood and viral hepatitis in whole blood recipients.
JAMA, **154**: 1066-1071, 1954.
- NEGRO, F.; PACCHIONI, D.; SHIMIZY, Y.; MILLER, R.H.; BUSSOLATI, G.;
PURCELL, R.H.; BONINO, F. - Detection of intrahepatic replication of hepatitis C
virus RNA by *in situ* hybridization and comparison histopathology. **Proc. Natl. Acad.
Sci. USA**, **89**: 2247-51, 1992.
- NGATCHU, T.; STROFFOLINI, T., RAPICETTA, M. - Seroprevalence of anti-HCV in
urban child population: a pilot survey in a developing area, Cameroon. **J. Trop. Med.
Hyg.**, **95**(1): 57-61, 1992.
- NICHOLSON, S.; LESLIE, D.E.; EFANDIS, T.; FAIRLEY, C.K.; GUST, I.D. Hepatitis C
antibody-testing: problems associated with non-specific binding. **J. Virol. Methods**,
33: 311-317, 1991.
- NISHIGUCHI, S.; KUROKI, T.; UEDA, T.; FUKUDA, K.; TAKEDA, T.; NAKAJIMA,
S.; SHIOMI, S.; KOBAYASHI, K.; OTANI, S.; HAYASHI, N.; SHIKATA, T. -
Detection of hepatitis C virus antibody in the absence of viral RNA in patients with
autoimmune hepatitis. **Ann. Intern. Med.** **116**: 21-25, 1992.
- NOVATI, R.; THIERS, V.; MONFORTE, A.A.; MAISONNEUVE, P.; PRINCIPI, N.;
CONTI, N.; LAZZARIN, A.; BRECHOT, C. - Mother-to-child transmission of
hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, **165**:
720-723, 1992.

- NOWICKI, M.J. & BALISTRERI W.F. - The hepatitis C virus: identification, epidemiology, and clinical controversies. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**,**20**: 248-274, 1995.
- NUOVO, G.J.; BECKER, J. - PCR *in situ* hibridization in viral detection. In: LATCHMAN, D.S. - **PCR applications in pathology: principles and practice**. United States. Oxford University press,1995. p64-91.
- NUOVO, G.J.; LIDONNICI, K.; MACCONNELL, P.; LANE, B. - Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. **Am. J. Surg. Pathol.** **17**(7): 683-690, 1993.
- OHTO, H.; TERAZAWA, S.; SASAKI, N., SASAKI, N.; HINO, H.; ISHIWATA, C.; KAKO, M.; UIHE, N.; ENDO, C., MATSUI, A.; OKAMOTO, H.; MISHIRO, S. - Transmission of hepatitis C virus from mothers to infant. **N. Engl. J. Med.**, **330**: 744-750, 1994.
- OKAMOTO, H.; OKADA, S.; SUGIYAMA, Y.; TANAKA, T.; SUGAI, Y.; AKAHANE, Y.; MACHIDA, A.; MISHIRO, S.; YOSHIZAWA, Y.; MAYUMI, M. Detection of hepatitis c virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. **Jpn. J. Exp. Med.** **60**: 215-22, 1990a.
- OKAMOTO, H.; OKADA, S.; SUGIYAMA, Y.; YOTSUMOTO, S.; TANAKA, T.; YOSHIZAWA, Y.; TSUDA, F.; MIYA KAWA, Y.; MAYUMI, M. The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. **Jpn. J. Exp. Med.** **60**: 167-177, 1990.
- OKOCHI, K. & MURAKAMI, S. - Observations on Australia antigen in japonese. **Vox. Sang.**, **15**: 374-385, 1968.
- PARVAZ, P.; GUICHARD, E.; CHEVALLIER, P.; RITTER, J.; TREPO, C.; SEPSTJAN, M. - Hepatitis C: description of a highly sensitive method for clinical detection of viral RNA. **J. Virol. Meth.**, **47**: 83-94, 1994.
- PEAKE, I. - The polymerase chain reaction. **J. Clin. Pathol.**, **42**:673-676, 1989.

- PETERS, T.; MOHR, L.; SCHEIFFELE, F.; SCHLAYER, H-J; PREISLER, S.; BERTHOLD, H.; GERO, K.W.; RASENACK, J. - Antibodies and viremia in acute posttransfusion hepatitis C. **J. Med. Virol.**, **42**: 420-427, 1994.
- PORCHON, C.; KREMSDORF, D.; POL, S.; LUNEL-FABIANNI, F.; DRISS, F.; OPOLON, P.; BERTHELOT, P.; BRÉCHOT, C. - Serum hepatitis c virus RNA and hepatitis B virus DNA in non-A, non-B, post-transfusional and sporadic chronic hepatitis. **J. Hepatol.**, **16**: 184-189, 1992.
- PRINCE, A.M. - An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **60**: 814-821, 1968.
- PRINCE, A.M.; BROTMAN, B.; GRADY, G.F.; KUHNS, W.J.; HAZZI, C.; LEVINE, R.W.; MILLIAN, S.J. - Long incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. **Lancet.**, **2**: 241-246, 1974.
- PRINCE, A.M.; BROTMAN, B.; INCHAUSPE, G.; PASCUAL, D.; NASSOF, M.; HOSEIN, B.; WANG, C.Y. - Patterns and prevalence of hepatitis C virus infection in posttransfusion non-a, non-b hepatitis. **J. Infect. Dis.**, **167**: 1296-1301, 1993.
- PUOTI, M.; ZONARO, A.; RAVAGGI, A.; MARTIN, M.G.; CASTELNUOVO, F.; CARIANI, E. - Hepatitis C RNA antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. **Hepatology**, **16**: 877-881, 1992.
- RAKELA, J.& REDEKER, A.G.- Chronic liver disease after acute non-A, non-B viral hepatitis. **Gastroenterology.**, **77**: 1200-1202, 1979.
- RAVAGGI, A.; PRIMI, D.; CARIANI, E. - Direct PCR amplification of HCV RNA from human serum. **PCR Meth. Applic.**, **1**: 291-292, 1992.
- REALDI, G.; ALBERTI, A.; RUGGE, M.; RIGOLI, A.M.; TREMOLADA, F.; SCHIVAZAPPA, L.; RUOL, A. - Long-term follow up of acute and chronic non-a, non-B post-transfusion hepatitis. Evidence of progression to liver cirrhosis. **Gut**, **23**: 270, 1982.

- RIZZETTO, M.; CANESE, M.G.; ARICÓ, S.; CRIVELLI, O.; TREPO, C.; BONINO, F.; VERME, G. - Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carries. *Gut.*, **18**: 997-1003, 1977.
- RIZZETTO, M.; SHIH, J.W.K.; GOCKE, D.J.; PURCELL, R.H.; VERME, G.; GERIN, J.L. - Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet.*, **2**: 986-990, 1977a.
- RODOUT-THORAVAL, F.; PAWLOTSKY, J.M.; THIERS, V.; DEFORGES, L.; GIROLLET, P.P.; GUILLOT, F.; HURAU, C.; AUMONT, P.; BRECHOT, C.; DHUMEAUX, D. - Lack of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus in human immunodeficiency virus seronegative Women: a prospective study with hepatitis C virus RNA testing. *Hepatology*, **17**: 722-727, 1993.
- ROSINA, F.; SARACCO, G.; RIZZETTO, M. - Risk of post-transfusion infection with the hepatitis delta virus. A multicenter study. *N. Engl. J. Med.*, **312**: 1488-1491, 1985.
- SAIKI, R.; GELFAND, D.H.; STAFFEL, S.; SCHERF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. - Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science.*,: 487-491, 1988.
- SAWYER, W.A.; MEYER, K.F.; EATON, M.D.; BAUER, J.H.; PUTNAN, P.; SCHWENTKER, F.F. - Jaundice in army personnel in the Western Region of the United States and its relation to vaccination against yellow fever. *Amer. J. Hyg.*, **39**: 337-430, 1944.
- SCHMILOVITZ-WEISS, H.; LEVY, M.; THOMPSON, N.; DUSHEIKO, G. Viral markers in the treatment of hepatitis B and C. *Gut*, **34** (suppl 2): S 26-S 35, 1993.
- SHERLOCK, S. & DUSHEIKO, G. - Hepatitis C virus updated. *Gut.*, **32**: 965-967, 1991.
- SHIEH, Y.S.C.; SHIM, K.S.; LAMPERTICO, P.; BALART, L.A.; JEFFERS, L.J.; THUNG, S.N.; REGENSTEIN, F.; REDDY, K.R.; FARR, G.; SCHIFF, E.R.;

- GERBER, M. A. - Detection of hepatitis C virus sequence in liver tissue by the polymerase chain reaction. **Labor. Invest.**, **65**: 408-411, 1991.
- SHIMIZU, Y.K.; WEINER, A.J.; ROSENBLATT, J.; et al. - Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 6441-6444, 1990.
- SILVA, L.C. - Conceito, tipos de hepatites por virus e evolução dos conhecimentos. In: _____, ed. - **Hepatites agudas e crônicas.**, ed. São Paulo, Savier, 1986, p. 1-7.
- SILVERSTEIN, M.D.; MULLEY, A.G.; DIENSTAG, J.L. - Should donor blood be screened for elevated alanina aminotransferase levels? A cost-effectiveness analysis. **JAMA.**, **252** : 2839-2845, 1984.
- SIMMONDS, P.; ZHANG, L.Q.; WATSON, H.G.; REBUS, S.; FERGUSON, E.D.; BALFE, P.; LEADBETTER, G.H.; YAP, P.L.; PEUTHERER, J.F.; LUDLAM, C.A. - Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs and drug users. **Lancet**, **2**: 1469-1472, 1990.
- SIMONETTI, R.G.; CAMMA, C.; FIORELLO, F.; COTTONE, M.; RAPPICOTTA, M.; MARINO, L.; FIORENTINO, G.; CRAXI, A.; CICCAGLIONE, A.; GUISEPPETTI, R.; STOFFOLINI, T.; PAGLIARO, L. - Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. **Ann. Intern. Med.**, **116**: 97-102, 1992
- SPENGLER, U.; LECHMANN, M.; IRRGANG, B.; DUMOLIN, F.L.; SAUERBRUCH, T. - Immune response in hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.** **24**: 20-25, 1996.
- STEIGMANN, F.; HYMAN, S.; GOLDBLOOM, R. - Infectious hepatitis (homologous serum type) in drug addicts. **Gastroenterology**, **15**: 642-646, 1950.
- STOKES, J.; BERK, J.E.; MALAMUT, L.L.; DRAKE, M.E.; BARONDESS, J.A.; BASHE, W.J.; WOLMAN, I.J.; FARQUHAR, J.D.; BEVAN, B.; DRUMMOND, R.J.; MAYCOCK, W.D.A.; CAPPS, R.B.; BENNETT, A.M. -The carrier state in viral hepatitis. **JAMA**, **154**: 1059-1065, 1954.

- TABOR, E.; GERETY, R.S.; DRUCKER, J.A.; SEEFF, L.B.; HOOFNAGLE, J.H.; JACCKSON, D.R.; APRIL, M.; BARKER, L.F.; PINEDA-TAMONDONG, G.-
Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. **Lancet**, 1:
463-466, 1978.
- TAKAMIZAWA, A.; MORI, C.; FUKU, I.; MANABE, S.; MURAKAMI, S.; FUJITA, J.;
ONISHI, E.; ANDOH, T.; YOSHIDA, I.; OKAYAMA, H. - Structure and
organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **J. Virol.**,
65: 1105-1113, 1991.
- TANAKA, T.; KATO, N.; NAKAGAWA, M.; OOTSUYAMA, Y.; CHO, M-J.;
NAKAZAWA, T.; HIJIKATA, M.; ISHIMURA, Y.; SHIMOTOHNO, K.; -
Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier:
sequence variation within the same individual and among infected individuals. **Virus
Res.**, 23: 39-53, 1992.
- TANAKA, E.; KIYOSAWA, K.; NAKATSUJI, Y.; INOUE, Y.; MIYAMURA, T.;
CHIBA, J.; FURUTA, S. - Clinical significance of antibodies to nonstructural and
core proteins of hepatitis C virus in posttransfusional hepatitis during long-term follow
up. **J. Med. Virol.**, 39: 318, 1993.
- THALER, M.M.; PARK, C-K.; LANDERS, D.V.; WARA, D.W.; HOUGHTON, M.;
VEEREMAN-WAUTERS, G.; SWEET, R.L.; HAN, J.H. - Vertical transmission of
hepatitis C virus. **Lancet**, 338: 17-18, 1991.
- THEILMAN, L.; BLAZEK, M.; GOESER, T.; GMELIN, K.; KOMMERELL, B.; FIEHN,
W. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. **Lancet**, 335: 1346, 1990.
- TINÉ, F.; MAGRIN, S.; CRAZI, A.; PAGLIERO, L. - Interferon for non-A, non-B chronic
hepatitis: a meta analysis of randomized clinical trial. **J. Hepatol.**, 13: 192-199, 1991.
- TOBLER, L.; BUSCH, M.; WILBER, J.; DINELLO, R.; QUAN, S.; POLITO, A.;
KOCHEFSKY, R.; BAHL, C.; NELLES, M.; LEE, S. - Evaluation of indeterminate
c22-3 reactivity in volunteer blood donors. **Transfusion**, 34: 130-134, 1994.

- TOR, J.; LLIBRE, J.M.; CARBONELL, M.; MUGA, R.; RIBERA, A.; SORIANO, V.; CLOTET, B.; SABRIÁ, M.; FOZ, M. - Sexual transmission of hepatitis C virus and its relation with hepatitis B virus and HIV. **Br. Med. J.**, **301**: 1130-1133, 1990.
- ULRICH, P.; ROMEO, J.; LANE, P.; KELLY, I.; DANIEL, L.; VYAS, G. - Detection, semiquantitation, and genetic variation in hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase. **J. Clin. Invest.** **86**: 1609-1614, 1990.
- VAN DER POEL, C.; CUYPERS, H.T.; REESINK, H.W. Hepatitis C virus six years on. **Lancet**, **334**: 1475-1479, 1994.
- VAN DER POEL, C.L.; CUYPERS, H.T.M.; REESINK, H.W.; WEINER, A.J.; QUAN, S.; DI NELLO, R.; VAN BOVEN, J.J.P.; WINKEL, I.; MULDER-FOLKERTS, D.; EXEL-OEHLERS, T.J.; SCHAASBERG, W.; LEENTVAAR-KUYPERS, A.; POLITO, A.; HOUGHTON, M.; LELIE, P.N. - Confirmation of hepatitis infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. **Lancet.**, **337**: 317-319, 1991.
- 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.**, **335** : 558-560, 1990.
- VAN DER POEL, C.; VRIELINK, H.; REESINK, H.W. QUAN, A.; POLITO, A.; ZAAIJER, H.L.; LELIE, P.N. - Detection of anti-HCV seroconversion with a new third-generation HCV ELISA (ELISA-3) and immunoblot (RIBA 3). **Transfusion.**, **33**: S121, 1993.
- VILLAREJOS, V.M.; VISONA, K.A.; EDUARTE, C.A.; PROVOST, P.J.; HILLEMANN, M.R. - Evidence for viral hepatitis other than type A or type B among persons in Costa Rica. **N. Engl. J. Med.**, **293**: 1350-1352, 1975.

- WATANABE, J.; MINEGISHI, K; MITSUMORI, T ; ISHIFUJI, M.; OGUCHI, T.; UEDA, M.; TOKUNAGA, E.; TANAKA, E.; KIYOSAWA, K.; FURUTA, S.; KATAYAMA, T; KUO, G.; CHOO, Q-L.; HOUGHTON, M.; NESHIOKA, K. - Prevalence of anti-HCV antibody in blood donors in the Tokio area. **Vox Sang.**, **59**: 86-88, 1990.
- WAUMANS, L.; CLAYES, H.; VERHAERT, H.; MERTENS, W.; VERMYLEN, C. - Hepatitis C virus confirmation in blood donor screening. **Vox Sang.**,**64**: 145-149, 1993.
- WEINSTOCK, H. S.; BOLAN, G.; REINGOLD, A.L.; POLISH, L.B. - Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. **JAMA**, **269**: 392-394, 1993.
- WEJSTAL, R.; WIDELL, A.; MANSSON, A-S.; HERMODSSON, S.; NORKRANS, G. - Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. **Ann. Inter. Med.**, **117**: 887-890, 1992.
- WELLMANN, A.; MASCHEK, H.; GÖKE, M.; GEORGII, A. - Detection and localization of hepatitis C viral antigen in human liver. **Path. Res. Prat.**,**190**(3): 267, 1994.
- WRIGHT, R.A. - Hepatitis B and the carrier: outbreak related to sexual contact. **JAMA**, **232**: 717-721, 1975.
- WRIGHT, P.A.& WYNFORD, T.D. - The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J. Pathol.**, **162**: 99-117, 1990.
- WONG, D.C.; DIWAW, A.R.; ROSEN, L.; GERIN, J.L.; JOHNSON, P.J.; POLITO,A.; PURCELL, R.H. - Non especificity of antibodies test for seroepidemiological analysis. **Lancet.**, **336** : 750-751, 1990.

- YAMADA, G.; NISHIMOTO, H.; ENDOU, H.; DOI, T.; TAKAHASHI, M.; TSUJI, T.; YOSHIZAWA, H.; NOZAWA, M.; KOJI, T.; NAKANE, P.K. - Localization of hepatitis C viral RNA and capsid protein in human liver. *Dig. Dis. Sci.*, **38**(5): 882-887, 1993.
- YAP, S-H.; WILLEMS, M.; VAN DEN OORD, J.; HABETS, W.; MIDDELDORP, J.M.; HELLINGS, J-A.; NEVENS, F.; MOSHAGE, H.; DESMET, V.; FEVERY, J. - Detection of hepatitis C virus antigen by immunohistochemical staining: a histological marker of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, **20**: 275-281, 1992.
- YOSHIOKA, K.; KAKUMU, S.; WAKITA, T.; ISHIKAWA, T.; ITOH, Y.; TAKAYANAGI, M.; HIGASHI, Y.; SHIBATA, M.; MORISHIMA, T. - Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon alpha therapy relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, **16**: 293-299, 1992.
- YUASA, T.; ISHIKAWA, G.; MANABE, S.I.; SEKIGUCHI, S.; TAKEUCHI, K.; MIYAMARA, T. - The particle size of hepatitis C virus estimated through filtration through microporus regenerated cellulose fibre. *J. Gen. Virol.*, **72**: 2021-2024, 1991.
- YUN, Z-B.; LINDH, G.; WEILAND, O.; JOHANSSON, B.; SONNERBORG, A. - Detection of hepatitis C virus RNA by PCR related to HCV antibodies in serum and liver histology in Swedish blood donors. *J. Med. Virol.*, **39**: 57-61, 1993.
- ZEIN, N.N.; GERMER, J.J.; WENDT, N.K.; SCHIMEK, C.M.; THORVILSON, J.N.; MITCHELL, P.S.; PERSING, D.H. - Indeterminate results of the second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of high-level c22.3 reactivity and influence of HCV genotypes. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 311-312, 1997.
- ZEUZEM, S.; FRANKE, A.; LEE, J-H.; HERRMANN, G.; RÜSTER, B.; ROTH, W.R. - Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology*, **24**: 1003-1009, 1996.

ZHANG, H. Y.; KURAMOTO, I. K.; MAMUSH, D.; SAZAMA, K.; HOLLAND, P. V.;
ZELDIS, J.B. - Hepatitis C virus in blood samples from volunteer donors. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 606-609, 1993.

ZUCKERMAN, A.J. - The elusive hepatitis C virus. **Br. Med. J.**, **229**: 871-873, 1989.



9. ANEXO

Anexo I

Sexo	1 → masculino	0 → negativo
	2 → feminino	1 → positivo
		9 → sem dados histológicos
EIA	1 → S/C → ≥ 3	0 → negativo
	2 → S/C → ≥ 1 e < 3	1 → positivo
		9 → sem dados histológicos
AJT	0 → normal	0 → negativo
	1 → 1 a 2 vezes o normal	1 → positivo
	2 → > 2 vezes o normal	9 → sem dados histológicos
RIBA	0 → negativo	0 → negativo
	1 → positivo	1 → positivo
	2 → indeterminado	9 → sem dados histológicos
Bandas RIBA	0 → ausência	0 → negativo
	1 → presença com intensidade ≥ ao padrão	1 → positivo
	2 → presença com intensidade < que o padrão	9 → sem dados histológicos
Biopsia	1 → Hepatite crônica ativa grave	0 → negativo
	2 → Hepatite crônica ativa moderada	1 → positivo
	3 → Hepatite crônica ativa leve	9 → sem dados histológicos
	4 → Hepatite crônica persistente	
	5 → Fígado reacional	
	6 → Esteatose	
	7 → Cirrose	
	9 → sem dados histológicos	
RT-PCR	0 → negativo	0 → negativo*
	1 → positivo	1 → positivo
	9 → sem dados histológicos	9 → sem dados histológicos
Parc. Mult.	0 → negativo	0 → negativo
	1 → positivo	1 → positivo
	9 → sem dados histológicos	9 → sem dados histológicos

CASUÍSTICA, EXAMES SOROLÓGICOS, RESULTADOS DE BIÓPSIA, PCR E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

n°	Iniciais	idade	sexo	EIA	ALT	HIBA	5.II	c100.3	c22.3	c33.c	biópsia	PCR	etilismo	droga	c.hepat	tatuagem	cirurgia	t.sangue	par. mult	
1	ELFA	22	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	JLSV	28	1	1	2	1	0	2	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	AF	20	1	2	2	1	1	1	1	1	9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
5	CAD	30	1	2	1	2	0	0	1	0	5	1	1	1	0	0	1	0	0	0
6	DFV	42	1	1	2	2	0	0	1	0	3	1	1	0	0	0	1	0	0	1
7	AMM	21	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0
8	CLL	21	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	LARN	32	1	1	2	1	0	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1
10	JP	46	1	1	2	1	0	0	1	1	3	1	0	0	0	0	1	1	0	0
11	NT	30	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0
12	NIT	28	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
13	NOT	31	1	1	2	1	0	0	1	1	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0
14	CJR	32	1	1	0	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0
15	CAA	40	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
16	SPO	37	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
17	LPS	43	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	1	0	0	0
18	MCM	32	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	1	0	0	1
19	DS	27	1	1	2	1	0	0	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
20	JSF	34	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
21	JLS	32	1	1	2	1	0	1	1	1	4	1	1	1	0	1	0	0	0	1
22	WF	37	1	1	1	1	0	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
23	VLR	27	1	1	2	1	0	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	1
24	ACMA	29	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1
25	CT	28	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
26	JHOB	40	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
27	AFS	47	2	1	1	1	0	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
28	AAB	28	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
30	ERG	26	1	1	2	1	1	0	1	1	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0
31	PSN	39	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
32	EAM	37	1	1	0	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
33	IAA	28	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
34	JCA	32	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	0	0	0	0	0	1
37	CAGF	20	1	1	2	1	1	1	1	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
38	JRP	31	1	1	2	1	1	1	1	1	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
39	PCN	35	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
40	GSF	33	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
41	JSN	32	1	1	1	1	0	1	1	1	6	1	1	0	0	0	0	0	0	1
42	VF	30	1	1	0	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
44	ACF	43	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
45	IL	49	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
46	MFO	34	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
47	BMCN	33	1	1	1	1	0	0	1	1	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
48	ACC	35	1	1	1	1	0	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
49	JAG	27	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
50	AGG	50	1	1	2	1	2	1	1	1	9	1	1	0	0	0	0	0	0	1

CASUÍSTICA, EXAMES SOROLÓGICOS, RESULTADOS DE BIÓPSIA, PCR E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

n°	Iniciais	Idade	sexo	E/A	ALT	RIBA	S.11	g100.3	g22.3	g33.6	biópsia	PCR	elífilismo	droga	c.hepat	tatuagem	cirurgia	t.sangue	par. mult.	
51	LAP	35	1	1	2	1	0	0	1	1	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0
52	ASO	40	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	1	0	1	0
53	CLS	25	1	1	2	1	1	1	1	1	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0
54	EJF	45	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	1	0
55	OJ	40	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	1	0
56	NLY	43	1	1	1	1	0	0	1	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
57	OS	42	1	1	2	1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0
58	OCC	30	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1	0	1	1	0	0	0
59	SJOB	38	2	1	0	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0
60	LRO	31	1	1	2	1	1	1	1	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
61	CRS	33	1	2	0	1	1	1	1	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
62	PDC	41	1	1	1	1	0	2	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	1	1
63	ELM	27	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1	0	0	0	0	1	1
64	MRC	53	1	1	1	1	0	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
65	NHC	28	1	1	1	1	0	2	1	1	2	1	0	0	0	1	1	0	1	1
66	JAD	31	1	1	1	1	0	1	1	1	3	1	1	0	0	1	1	0	0	0
67	JLO	32	1	1	1	1	0	0	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
68	PRP	33	1	1	2	1	0	2	1	1	4	1	0	0	0	0	0	0	1	1
69	MEA	32	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	0	1	0	0	0	0	1	1
70	PTL	44	1	2	0	1	1	1	1	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
71	WG	35	1	1	0	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	0	0	0	0
72	ACS	44	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
73	ECF	32	1	1	2	1	1	1	1	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
74	FAT	24	1	1	2	1	1	1	1	1	6	1	0	0	0	0	0	0	0	1
75	CMR	26	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1
76	LHC	37	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	1	0	1	1
77	MHD	42	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
78	PPC	32	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0
80	MAP	26	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	0	0	1	0	0	1	1
81	NAS	33	1	1	1	1	0	2	1	1	5	1	1	1	0	0	1	0	0	0
82	RAS	30	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	0	0	0	1	0	0
83	WFS	19	1	1	2	1	0	1	1	1	9	1	0	0	0	1	0	0	1	1
84	EN	44	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	1	1
85	OSV	47	1	2	2	2	0	0	1	0	5	0	1	0	1	0	1	0	0	0
86	CDC	32	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0
88	JAJSF	34	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
89	OSJ	22	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
90	ACP	22	1	1	1	1	0	0	1	1	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0
91	MG	38	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92	NAJ	27	1	1	1	2	0	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93	AJSM	38	1	1	2	1	0	2	1	1	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0
94	NBO	34	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
95	JNS	44	1	1	1	1	0	0	1	1	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0
96	PRF	37	1	1	2	1	0	0	1	1	3	1	1	0	0	0	0	1	0	0
97	JVC	32	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
98	BRP	27	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0

