

KÁTIA LUZ TORRES SILVA

Caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da hepatite C
(HCV) em doadores de sangue do Estado do Amazonas

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

Área de concentração:

Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Kátia Luz Torres

Caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em doadores de sangue do Estado do Amazonas / Kátia Luz Torres Silva. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Eduardo Levi.

Descritores: 1.Vírus da hepatite C/diagnóstico 2.Hepatite C 3.Doadores de sangue
4.Sorologia 5.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/SBD-445/08

Aos meus pais Julio e Maria Auxilium Torres
Agradeço pelo exemplo de amor verdadeiro
e de fé em Deus.

Ao meu esposo Paulo Roberto,
Meus filhos Felipe, Vinícius e Guilherme
e a minha “grande família”
agradeço pelo amor, compreensão e apoio.

Agradecimentos

Ao Dr. José Eduardo Levi, meu orientador e amigo que com muita atenção, dedicação e disponibilidade deu o suporte e orientação necessários. Com quem, durante este período de convivência, tive oportunidade de crescimento profissional e a partir daí de construir forte parceria para continuidade das linhas de pesquisa que temos em comum.

Ao Prof. Dr. Cláudio Pannuti, que me acolheu no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT-SP tornando viável a realização deste estudo.

A Adriana Tateno, especialmente agradeço pelo completo suporte técnico nos ensaios moleculares e análises de sequenciamento. Principalmente pela total presteza, gentileza e atenção.

A Prof^a. Dra. Norma Cavalheiro, Msc. Carlos Melo e Susana Rie Morimitsu que proporcionaram suporte técnico na realização das análises quantitativas deste estudo, além de momentos agradabilíssimos de convivência.

Ao Prof. Dr. Antonio Alci Barone, chefe do Laboratório de Hepatites do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e toda equipe do laboratório que permitiram a realização das análises quantitativas de carga viral.

Ao Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira pelo apoio e incentivo oferecidos.

À equipe do Laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Dr. Luiz Vicente Ribeiro da Silva Filho, Dra. Vanda de Souza, Dra. Clarisse Machado, Dr. Aluízio Segurado, Dra. Daisy Machado, Adriana

Tateno, Maria Cristina Fink, Laura M. Sumita, Cynthia do Canto, Renato Reis Oliveira, Ana Carolina Mamona, Maria Carolina Bernal, Rodrigo Zerbinati, Anderson Molina, Célia Rodrigues, Adriana Freire, Wilton Freire, Silvia Helena Lima, Lucy Vilas Boas, Jaila Borges, José de Paula Paz, Tânia Tozetto, Sônia Ferraz, Jussara Moraes, Cícero Raimundo da Silva Junior, Daniel Raimundo da Silva, Luciano Monteiro da Silva, Maria Auxiliadora Felix de Lima, agradeço pela verdadeira acolhida e pelo suporte sempre dispensado.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e parasitárias pelo suporte oferecido.

À Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM pelo suporte e incentivo a realização deste estudo.

À Dra. Leny Nascimento da Motta Passos Diretora Presidente da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM pela oportunidade e confiança.

A equipe técnica do Laboratório de Sorologia da Fundação HEMOAM em nome da Dra. Márcia Poinho Encarnação de Moraes, pela amizade, pelo apoio e suporte técnico dispensados.

À Dra. Adriana Malheiro, pela co-orientação, incentivo e suporte técnico dispensados.

À equipe da Diretoria de Ensino e Pesquisa da Fundação HEMOAM, Hedylamar Marques, Márcia Almeida, Edson Lira, Felicien Vasquez, Josiane Neves, Erbênia Araújo, Julaide Coutinho, Ana Cristina Chagas, agradeço não só pelo apoio, mas principalmente pela amizade, parceria e torcida.

Aos estudantes de graduação e pós-graduação vinculados ao nosso grupo de pesquisa “Aspectos hemoterápicos no Amazonas”, Christiane Melo Usui, Laura Patrícia Maia, Angelito Chaves, João Paulo Pimentel, Roselane Pacheco, Flavia Braga, Iza Azevedo, Igor Araújo, Débora Galvão, Luana Karen Holanda, Tatiane Amabile, Daniel Barros, Hariana Rombaldi e Andréa Tarragô pelo apoio na coleta e processamento de amostras.

Aos Estatísticos Edson Lira e Felicien Vasquez pelas valiosas contribuições nas análises estatísticas.

À equipe da Coordenadoria de Unidades Hemoterápicas do Interior da Fundação HEMOAM pelo apoio na busca de doadores do Interior do Estado do Amazonas.

Aos amigos da Fundação HEMOAM pela torcida e carinhosa amizade sempre me impulsionando para frente.

Ao Dr. Julio Luz Torres pelas contribuições na diagramação da tese.

Aos doadores de sangue que se prontificaram voluntariamente a contribuir e participar deste estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM e ao CNPq que participaram do financiamento deste estudo.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo: Faculdade de Medicina Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marivalda de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
O Vírus da Hepatite C (HCV)	1
Epidemiologia	5
Formas de transmissão	10
Transfusão de sangue	12
História natural e Características clínicas do vírus da Hepatite C	15
Resposta Imune ao Vírus da Hepatite C	19
Diagnóstico laboratorial	22
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS	31
MÉTODOS	32
Modelo do estudo	32
Características da área de estudo	32
População de estudo e casuística	39
Critérios de seleção	39
Critérios de exclusão	40

Desenvolvimento do estudo.....	40
Amostras controles	42
Testes laboratoriais	44
Teste de triagem.....	44
Imunoblot – RIBA.....	46
Teste de amplificação de ácidos nucléicos.....	48
Determinação da carga viral	60
Controle de contaminação	61
Análise e tratamento dos dados	62
Apoio financeiro.....	63
Aspectos Éticos.....	64
RESULTADOS.....	65
DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÕES.....	120
ANEXOS	121
REFERÊNCIAS	132

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS.

5'NCR	Região 5' não-codificante
Anti- HBc	Anticorpo anti Core do vírus da Hepatite B
Anti- HBs	Anticorpo anti antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico (DNA) complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO	“ cut-off” – Ponto de corte
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DTT	Dithiothreitol
E1	Glicoproteína 1 do envelope
E2	Glicoproteína 2 do envelope
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
<i>et al.</i>	e colaboradores
FAPEAM	Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas
gp	Glicoproteína
HAV	Vírus da Hepatite A

HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
HVR1	Região hipervariável 1
hSOD	Superóxido Dismutase Humana
IATA	International Air Transport Association
IgG	Imunoglobulina G
Kb	Kilobase
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NS2	Região não-estrutural 2
NS3	Região não-estrutural 3
NS4	Região não-estrutural 4
NS5	Região não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
ORF	Fase aberta de leitura

p	p valor
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PPT	Plasma Preparation Tube – Tubo de preparação de plasma
Primer	Oligonucleotídio iniciador
RIBA	Ensaio de imunoblotting recobinante
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcriptase reversa PCR
SAD	Sistema de Acompanhamento de doadores
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris-ácido bórico e EDTA
TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
Th	Linfócito T helper
TMB	Tetrametilbenzidina
UCT	Unidade de Coleta e Transfusão
µg	Micrograma
µL	Microlitro
V	Volts
VDRL	Veneral Diseases Reseach Laboratory
U.V.	Luz ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura do genoma do vírus da Hepatite C

Figura 2. Divisão territorial com indicação das mesorregiões, microrregiões geográficas e municípios.

Figura 3. Mapa do Estado do Amazonas.

Figura 4. Unidades hemoterápicas do Interior do Estado do Amazonas.

Figura 5. Fluxograma metodológico.

Figura 6. Gel de eletroforese em gel de agarose de PCR utilizando primers HC 11/18 de amostras de painel de concentrações conhecidas submetidas a procedimento de concentração plasmática.

Figura 7. Região 5'NCR do vírus da hepatite C do protótipo HCJ1.

Figura 8. Gráfico da correlação entre a razão da Densidade ótica (DO) e “cut-off” (CO) das análises das amostras da triagem sorológica e da nova amostra dos doadores de sangue soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Figura 9. Box Plot da razão DO/CO dos testes ELISA na amostra da doação e na nova amostra de doadores soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Figura 10. Box plot das diferenças entre os grupos das condições de reatividade no RIBA e no Nested PCR e a Razão DO/CO do Elisa da Nova amostra de doadores soropositivos para anti- HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM

Figura 11. Distribuição dos genótipos do HCV detectados em doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Figura 12. Distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite C em doadores de sangue no Estado do Amazonas.

Figura 13. Fluxograma de Resultados de amostras de doadores com Imunoblot Reativo

Figura 14. Fluxograma de Resultados das amostras com Imunoblot Indeterminado

Figura 15. Fluxograma de Resultados de amostras com Imunoblot Não Reativo

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose de ensaio do procedimento de concentração plasmática e amplificação por PCR utilizando os primers HC 11/18.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência da infecção pelo HCV na população de diferentes países.

Tabela 2. Primers da região 5'NCR do genoma do HCV utilizados nos ensaios moleculares.

Tabela 3. Prevalência de reatividade para HCV nos diferentes ensaios de amostras de doadores de sangue da Fundação HEMOAM, Manaus-AM.

Tabela 4. Reatividade para ELISA nas amostras de triagem sorológica e da nova amostra de doadores soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 5. Mediana e correlação da razão DO/CO para os testes ELISAS de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 6. Distribuição da razão DO/CO do Elisa da Nova amostra em relação ao resultado do Imunoblot (RIBA) e Nested PCR de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 7. Reatividade no Imunoblot (RIBA) e Nested PCR em relação à frequência das bandas no Imunoblot de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 8. Distribuição das variáveis demográficas e procedência em relação ao Nested PCR dos doadores de sangue soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 9. Distribuição razão DO/CO da 1ª análise do Elisa da Nova amostra em relação à carga viral de doadores da Fundação HEMOAM

Tabela 10. Distribuição da reatividade no RIBA e o PCR Quantitativo de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 11. Distribuição da reatividade no RIBA e o Nested PCR de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Tabela 12. Análise das variáveis demográficas dos doadores com RIBA reativo e a condição dos clareadores e não clareadores.

Tabela 13. Análise das variáveis demográficas dos doadores com RIBA indeterminado e a condição dos virêmicos e não virêmicos.

Tabela 14. Distribuição da frequência dos diferentes cortes para a carga viral em relação ao resultado da genotipagem.

Tabela 15. Descrição de casos presumidos de “clearance” plasmático do RNA viral de doadores com Imunoblot Reativo.

Tabela 16. Descrição de casos de doadores com Imunoblot Indeterminado e ausência de viremia.

Tabela 17. Descrição de casos de doadores RIBA reativo da Fundação HEMOAM com PCR reativos para RNA do HCV – Manaus, AM.

Tabela 18. Descrição de casos de doadores com RIBA Indeterminados da Fundação HEMOAM com PCR reativos para RNA do HCV.

Tabela 19. Descrição de caso de doador da Fundação HEMOAM com RIBA não Reativo e PCR reativo para RNA do HCV.

RESUMO

Torres, KL. Caracterização sorológica e molecular da infecção pelo Vírus da Hepatite C (HCV) em doadores de sangue do Estado do Amazonas. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 180 p.

Na prática hemoterápica em todo mundo, a triagem e o diagnóstico da infecção pelo HCV continua sendo um desafio. Desta forma, considerando as variáveis genéticas do vírus da Hepatite C e as variáveis populacionais de cada região, o conhecimento mais profundo da realidade da epidemiologia molecular do vírus da Hepatite C na população de doadores de sangue em regiões específicas se torna cada vez mais imprescindível. Desta forma, este estudo visou realizar a caracterização sorológica e molecular da infecção pelo Vírus da Hepatite C (HCV) em doadores de sangue do Estado do Amazonas a fim de subsidiar conhecimentos para interpretação dos diferentes perfis laboratoriais e clínicos, além de contribuir para o conhecimento das rotas de transmissão e da epidemiologia da infecção do Amazonas. Foram estudados 154 doadores de sangue do Estado do Amazonas com sorologia repetidamente reativa para anti-HCV. Foram realizados testes sorológicos por ELISA e Imunoblot, testes de detecção de RNA viral plasmático por Nested PCR, determinação da carga viral e genotipagem do vírus por sequenciamento. O estudo foi realizado no período de setembro de 2005 a abril de 2007 quando o índice de descarte por anti-HCV reativo foi de 0,37%. Foi observado que 50% dos casos de Imunoblot indeterminado apresentaram positividade no Nested PCR indicando a presença de RNA plasmático. A carga viral baixa foi um fator limitante para a determinação do genótipo viral pelo método de sequenciamento de algumas amostras. A frequência de casos presumidos de "clearance" viral plasmático na amostra estudada foi de 18,8%. O genótipo mais prevalente do HCV nos doadores do Estado do Amazonas foi o genótipo 1 (87,5%) seguido do genótipo 3 (12,5%). Considerando as nuances da história natural da Hepatite C e os diversos momentos clínicos que os doadores possam se encontrar devem ser adotadas mudanças de condutas do acompanhamento dos doadores sororeativos para anti-HCV no banco de sangue do Amazonas e no fluxograma de diagnóstico da infecção.

Descritores: 1.Vírus da hepatite C/diagnóstico 2.Hepatite C 3.Doadores de sangue 4.Sorologia 5.Reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY

Torres, KL Characterization of Hepatitis C Virus infection in Amazon blood donors ,Brazil. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 180 p.

The screening and diagnostic of HCV infection continue to be a challenge on the hemotherapeutic practice because the unique characteristics of each population and the molecular variability of the virus. The aim of this study was to characterize the serologic and molecular profile of 154 anti-HCV+ Amazon blood donors from the Amazon Hematology and Hemotherapy Foundation. Screening for anti HCV antibody was performed using ELISA and recombinant Immunoblot assay. Seropositive samples were assessed further with Nested PCR, viral load and genotyping techniques. In the study period, 2005-2007 the anti-HCV discard rate was 0,37%. We observed that 50% of the indeterminate Immunoblot cases showed HCV RNA presence in plasma by Nested PCR. The most prevalent genotype between subjects of this study was genotype 1 (87,5%), followed by genotype 3 (12,5%). The presumed plasma clearance frequency was 18,8%. The low viral load was a determinant critical factor to the genotype determination in some samples. Considering the different stages of the HCV natural infection different conducts may be adopted with inclusion of molecular testes as the first option for confirmation to the follow up of the positive anti-HCV blood donors in the Amazon blood bank and in the algorithm of the infection diagnostic, saving resources and providing a better counseling for the reactive donors.

1. Hepatitis C virus/diagnostic; 2. Hepatitis C; 3. Blood donors; 4. Serology;
5. Polimerase chain reaction

INTRODUÇÃO

O Vírus da Hepatite C (HCV)

O vírus da Hepatite C (HCV) foi primeiramente identificado pela clonagem de cDNA e sequenciamento do seu RNA genômico. O HCV tem como material genético uma fita simples de RNA, com polaridade positiva, de aproximadamente 9.600 nucleotídeos (Choo, Q.L *et al*, 1989; Choo,Q.L. *et al*, 1991). O vírus da hepatite C é um vírus esférico de aproximadamente 50 nm de diâmetro e a partícula viral é composta por um envoltório derivado da membrana celular do hospedeiro contendo as glicoproteínas virais E1 e E2 inseridas. O nucleocapsídeo é formado pela proteína C (core) e envolve o RNA viral. Esta organização genômica é semelhante aos pestivirus e flavivirus e o HCV foi classificado junto a estes como um gênero a parte da família *Flaviviridae* chamado Hepacivirus (Shukla *et al.*, 1995; Robertson *et al*, 1998; Lerat, H e Hollinger, F.B., 2004; Thomson, B.J. e Finch, R.G., 2005).

Flanqueando as regiões codificadoras encontram-se as regiões regulatórias 5' e 3', sendo ambas muito conservadas a nível da seqüência de RNA entre os diversos isolados de HCV (Choo,Q.L., *et al*, 1991; Simmonds,P. 2004; ARUMUGASWAMI, V., *et al*, 2008) (Figura 1).

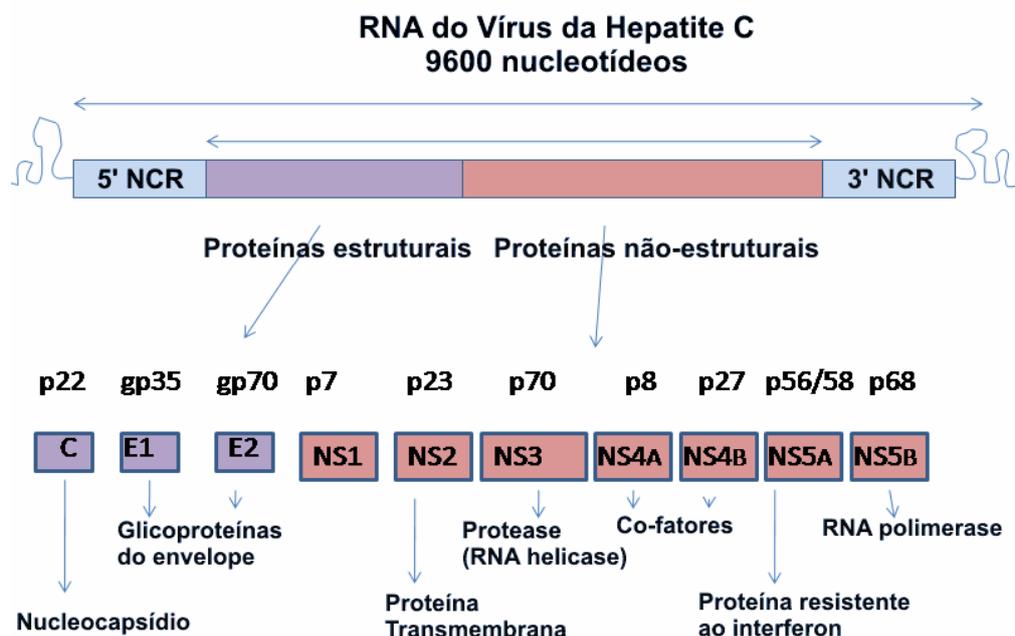


Figura 1. Esquema do genoma do vírus da Hepatite C. Adaptado de ARUMUGASWAMI, V., *et al*, 2008.

A região codificante compõe-se de uma longa seqüência aberta de leitura (Open Reading Frame- ORF) que é traduzida em uma poliproteína precursora com aproximadamente 3008-3037 aminoácidos (Bhopale,G.M. e Nanda, R.K., 2004).

As proteínas estruturais do vírus derivam do segmento N-terminal da poliproteína, formando a proteína do capsídeo e as proteínas E1 e E2 que se destinam ao envoltório viral. As proteínas não-estruturais (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B ocupam o restante do genoma. As proteínas NS2 e NS3 são responsáveis pela clivagem de todas as proteínas não estruturais. Além disso, a NS3 tem uma atividade helicase que cumpre um

papel importante na replicação do HCV (Bhopale, G.M. e Nanda, R.K., 2004; Thomson, B.J. e Finch, R.G., 2005).

A região 5' não codificante (5'NCR) é composta por 341 nucleotídeos e é cerca de 100 nucleotídeos maior que a dos outros flavivírus, aproximando-se dos pestivirus neste aspecto (HAN *et al*, 1991). A região 5'NCR é a mais conservada entre os diferentes isolados do HCV, em comparação as outras regiões codificantes (Simmonds, P., 1995; Simmonds, P., 2004; Smith, D.B., *et al*, 1995). Esta conservação deriva da necessidade de manter-se uma estrutura secundária fundamental para a ligação ao ribossomo no início da tradução, tendo um importante papel regulador da replicação viral. A comparação da seqüência da região 5'NCR do HCV de diferentes indivíduos infectados revela que a variação é limitada a pontos específicos da região e estas diferenças estão associadas com os diferentes genótipos do HCV (Simmonds, P. *et al*, 1994; Simmonds, P., 2004).

O RNA do Vírus da Hepatite C apresenta alto grau de heterogeneidade devido a mutações por erros de leitura da polimerase durante a fase de replicação, além da alta taxa de replicação *in vivo* (Lavillette, D. *et al*, 2005a). As variabilidades do HCV provêm de sua velocidade de alterações na seqüência codificada, grande tamanho populacional e da pressão da seleção natural que sofre (Simmonds, P., 2004).

A proporção de modificações durante a infecção varia de acordo com as diferentes regiões do genoma do HCV, verificando-se os mais altos graus de mutação nos genes E1 e E2. Um alto grau de mutação é observado na região hipervariável 1 (HVR1), um domínio pequeno localizado na região

amino terminal da proteína E2. A comparação das seqüências entre a região do envelope do HCV (E1), até o nível de aminoácidos ou por análise filogenética dos nucleotídeos, demonstrou a evidência de seis principais genótipos e diversos subtipos análogos aos observados pela análise da região 5'NCR (Bukh, J. *et al*, 1995; Simmonds, P., 2004). Quando são feitas análises comparativas das seqüências das variantes da região 5'NCR, observa-se que cada um dos seis genótipos e a maioria dos subtipos descritos pela análise da região E1 e 5'NCR são equivalentes (Simmonds, P., 1995). O fato da região 5'NCR ser a mais conservada tornou-a o alvo de escolha para a seleção de primers (seqüências iniciadoras) para detecção do HCV por métodos moleculares.

A região hipervariável 1 apresenta diferenças no vírus durante a infecção favorecendo o aparecimento de quasiespécies (Bukh, J. *et al*, 1995). As quasiespécies surgem por processos de evolução neutra (quando a maioria das mudanças não tem efeitos significantes no fenótipo) e adaptativa do HCV que ocorrem durante a infecção crônica nos indivíduos. As divergências das seqüências são geradas continuamente durante a replicação, uma vez que a RNA polimerase viral não tem atividade de correção (Simmonds, P., 2004).

Usando critérios de comparação das seqüências de vários tipos e subtipos do vírus é possível calcular o grau de divergência entre tipos, subtipos e variantes (ou quasiespécies) em várias regiões do genoma. Foi observado grau de similaridade entre diferentes genótipos de 66 a 69%, de 77 a 80% entre os subtipos e de 91 a 98% entre isolados (Simmonds, P., 1995).

As variantes genéticas do HCV têm sido classificadas filogeneticamente em seis distintos genótipos e cada uma contendo múltiplos subtipos distribuídos geograficamente com diferenças marcantes no mundo (Smith, D.B., *et al*, 1995; Robertson, *et al.*,1998) e entre diferentes populações. Os tipos têm sido numerados de 1 a 6 e os subtipos identificados pelas letras a, b e c, denominados de acordo com a ordem de descrição (Simmonds, P., 1995).

O conhecimento do genótipo viral envolvido em uma infecção assume papel importante na clínica uma vez que diferentes genótipos determinam diferentes formas de evolução da doença. É descrita uma forte associação entre o genótipo 1 e uma pobre resposta ao tratamento quando se compara com os genótipos 2 e 3, em casos de pacientes com cirrose hepática por Hepatite C (Annicchiarico, B.E. *et al*, 20008). Além disso, O genótipo 1 também está mais associado com lesões hepáticas mais graves (Harris, H.E. *et al*, 2006). Por outro lado, pelo fato do genótipo 1 provocar uma resposta imune celular mais intensa, é o mais relacionado à chance de eliminação espontânea da viremia quando comparado com os genótipos 2 e 3 (Harris, H.E. *et al*, 2006).

Epidemiologia

O vírus da Hepatite C (HCV) se distribui universalmente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula a existência de em torno de 123 a 170 milhões de pessoas infectadas pelo HCV no mundo, estimando

que 2% da população mundial possam estar infectadas pelo vírus (Candotti, D. *et al*, 2003; Perz, J.F. *et al*, 2004) e aproximadamente 80% destes desenvolvam infecção crônica (Lavillette, D. *et al*, 2005a).

Considerando que a infecção primária é predominantemente assintomática, que os anticorpos podem tornar-se indetectáveis em indivíduos que eliminam o vírus espontaneamente (Takaki, *et al*, 2000; Kleinman, S. *et al*, 2006) e o fato de existir grande desconhecimento por parte da população sobre a doença e seus riscos de infecção, a proporção de indivíduos infectados pode estar sendo subestimada (Candotti, *et al*, 2003; Strauss, E. 2007).

A prevalência da infecção pelo HCV varia de acordo com a localidade e a população estudada. A tabela 1 mostra a descrição da prevalência da infecção pelo HCV na população em diferentes países.

Tabela 1. Prevalência da infecção pelo HCV na população de diferentes países.

Região	Prevalência (%)	Referência
Bélgica	1	Matheï, C. <i>et al</i> , 2005
Polônia	1,4	Chalabcz, S. <i>et al</i> , 2005
Venezuela	0,9	Cuadra-Sánchez, C. <i>et al</i> , 2005
Alemanha	0,6	
Canadá	0,8	
França	1,1	
Austrália	1,1	Shepard, C.W. <i>et al</i> , 2005
Estados Unidos	1,8	
Japão	1,5 a 2,3	
Itália	2,2	

Na população de indivíduos usuários de drogas no Oeste Europeu a prevalência de HCV varia de 33 a 98% (Matheï, C. *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos, no Estado da Califórnia, um estudo demonstrou que 46,8% dos usuários de drogas apresentavam anticorpos anti-HCV (Tseng, F. *et al.*, 2007). Quando foram segregados os usuários de drogas mais jovens dos mais antigos nesta prática, observaram-se prevalências de anti-HCV nestas populações de 40% e 92% respectivamente (Page-Shafer, K. *et al.*, 2008).

No Brasil, estudos feitos na cidade de São Paulo demonstraram que a prevalência estimada é de 1,42% (0,7 a 2,12% IC) com ocorrência mais freqüente em adultos com 30 anos ou mais, com a prevalência atingindo seu pico de 3,80% no grupo etário de 50 a 59 anos (Focaccia *et al.*, 1998; Bassit *et al.*, 1998). Na população brasileira em geral, os dados demonstram que a prevalência possa atingir 1 a 2% (Gervais, A., 2001; Alvariz, F.G., 2004; Ferreira, C.T. *et al.*, 2004; Diament, D., 2008).

O vírus da Hepatite C (HCV) e o vírus da Imunodeficiência adquirida (HIV) compartilham alguns dos mecanismos de transmissão. A freqüência de co-infecção varia de 4% a 90%. Nos Estados Unidos é estimado que cerca de 30% da população infectada com HIV é também co-infectada com HCV (Zykberberg, H. e Pol, S., 1996). No Brasil, a prevalência de co-infecção varia de 17,5 a 95% (Mendes-Correa e Barone, A.A., 2005).

Os genótipos do HCV apresentam distribuição universal com prevalências regionais. Os genótipos 1, 2 e 3 predominam no Brasil, China, Estados Unidos, Europa, Japão, Taiwan e Tailândia. O genótipo 1a é o mais encontrado no nordeste Europeu e América do Norte, enquanto o subtipo 1b é o mais comum no Japão, sudeste e oeste Europeu. Recentes

levantamentos epidemiológicos na Itália enfatizam a importância da infecção assintomática do genótipo 2 (principalmente o subtipo 2a) na população em geral, particularmente em áreas onde o subtipo 1b se apresenta como hiperendêmico (Puoti, C. *et al*, 2002).

No Sudeste da França, na população de doadores de sangue, foi demonstrada a presença dos genótipos 1b, 1a, 3a, 2, 4a e 5 (Cantaloube, J.F. *et al*, 2005).

Na Inglaterra, em um estudo de busca ativa de pacientes que receberam sangue e hemoderivados antes da introdução da triagem de anti-HCV nos doadores de sangue, foi observada a frequência de 52% de infecção pelo genótipo 1, 29% do genótipo 3, 16% do genótipo 2 e baixos percentuais dos genótipos 4, 5 e 6 (Harris, H. E. *et al*, 2007).

Os genótipos 5 e 6 são mais freqüentes na África do Sul e sudeste asiático, respectivamente, e o genótipo 4 predomina na África Central e Egito (Barret *et al*, 2001). No entanto, a distribuição do genótipo 5 tem sido observada de forma pulverizada com baixas prevalências em distintas áreas no mundo sendo descrito no sudeste brasileiro (Levi, J.E., *et al*, 2002) e também na Holanda, Irlanda, Alemanha, Austrália, Canadá, Espanha, Bélgica e França (Verbeeck, J. *et al*, 2008).

No Brasil, o genótipo 1b ocorre com maior frequência na população de doadores de sangue, sendo também encontrados em outros grupos os subtipos 1a, 2a, 2b e 3a (Gonçales, 1997; Gonçales, 1999; Gonçales *et al*, 2000 a; Gonçales *et al*, 2000 b; Gruner *et al*, 2000). Recentemente, foram detectados o genótipo 4 e genótipo 5 no Brasil (Hahn *et al*, 2001; Jaiswal *et al*, 2001; Levi, *et al*, 2002; Campiotto. S. *et al*, 2005). Em um estudo

brasileiro envolvendo pacientes com HCV crônica em centros do sul, sudeste e nordeste do Brasil, foi relatada a distribuição de genótipos do HCV sendo 64% do genótipo 1, 3% do genótipo 2 e 33% do genótipo 3 (Focaccia, R. *et al*, 2004). O estudo de Campiotto, S. *et al* (2005) demonstrou a distribuição no Brasil de 64,9% de genótipo 1, 4,6% de genótipo 2, 30,2% de genótipo 3, 0,2% do genótipo 4 e 0,1% do genótipo 5.

Existem poucos relatos da distribuição dos genótipos do Vírus da Hepatite C na população da Amazônia brasileira. Paraná *et al*. (2007) descreveram a predominância do genótipo 1 (66,7%) seguido do genótipo 3 (25%) e genótipo 2 (8,3%) na população de trabalhadores da área da saúde no Estado do Acre. O estudo de Campiotto, S. *et al* (2005) avaliou uma casuística de 85 indivíduos da região Norte do país (Acre, Amazonas) com hepatite C crônica e foi descrita a presença de 64,3% do genótipo 1, 7,1% do genótipo 2 e 28,6% do genótipo 3.

Echevarría, J.M. & Leon, P. (2003) descreveram que o padrão de transmissão da infecção do vírus da Hepatite C demonstra que a infecção prevalece na população urbana da bacia Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela) sendo incomum entre a população de ameríndios. Estes achados sugerem que a infecção chegou à região Amazônica através da colonização pela população branca.

Formas de transmissão

Atualmente, sabe-se que o HCV é transmissível por diversos meios. Contudo, a grande maioria das infecções ocorre por via parenteral, fundamentalmente por exposição a transfusões de sangue e hemoderivados, uso de drogas intravenosas, realização de tatuagens, exposições percutâneas e nosocomiais (Oliveira, M.L.A., *et al.*, 1999; Guimarães, T. *et al.*, 2001; Tawk *et al.*, 2005; Hwang, L. *et al.*, 2006; Paraná, R. *et al.*, 2007).

É demonstrada a presença de anticorpos anti-HCV em 60 a 80% dos hemofílicos, em 50 a 70% dos usuários de drogas endovenosas, em 7,4 a 51,2% de pacientes em diálise e em 21% dos pacientes talassêmicos politransfundidos (Jaiswal, *et al.*, 2001; Naghettini, *et al.*, 1997; Hahn, *et al.*, 2001) o que demonstra o grande potencial do sangue de transmitir a hepatite C antes da inclusão dos testes de triagem sorológica de última geração (Zuckerman, 1989; Yoshida, *et al.*, 1992).

O uso de drogas endovenosas é um fator de risco importante para transmissão da Hepatite C (Bacchetti, P., *et al.*, 2007). Em países como os Estados Unidos da América e Austrália, 68% e 80% das infecções pelo HCV, respectivamente, estão associados a essa forma de transmissão (Hahn, *et al.*, 2001; Shepard, *et al.*, 2005). Também foi demonstrada uma prevalência de 96,6% em uma população de usuários de drogas injetáveis co-infectados com o HIV em Taiwan (Liu, J. *et al.*, 2008).

O procedimento de hemodiálise utilizado no tratamento de pacientes renais crônicos também oferece risco potencial de transmissão da Hepatite

C. Foram descritas epidemias de infecção aguda pelo HCV em centros de hemodiálise o que forçou a recomendação de isolamento das unidades de hemodiálise de pacientes infectados pelo HCV (Yang, C.S, *et al*, 2003; Espinosa, M., *et al*, 2004). A prevalência de anticorpos anti-HCV entre os pacientes hemodialisados tem sido descrita em alguns países sendo de 10,8% na Espanha (Espinosa, M., *et al*, 2004), 12% no Iran (Taziki, O e Espahbodi, F., 2008). No Brasil, o número de casos novos da infecção entre pacientes que passam por procedimento de hemodiálise de forma prolongada tem aumentado demonstrando que ainda é um desafio para os serviços de hemodiálise (Engel, M. *et al*, 2007).

A transmissão entre os profissionais da saúde é observada e há registro no Brasil de prevalência de anticorpos anti-HCV em 4,8% dos profissionais de saúde pesquisados de uma população do Norte do país (Paraná, R. *et al*, 2007). Nestes casos, a transmissão se dá muitas vezes por acidentes com objetos perfurocortantes indicando risco ocupacional.

A transmissão sexual do vírus da hepatite C é relatada, porém com menor eficiência do que outras infecções transmitidas por vírus tais como vírus da Hepatite B (HBV) e vírus da Imunodeficiência adquirida (HIV) (Tedder, *et al.*, 1991; Ghosn, J. *et al*, 2005). No entanto, o aconselhamento a ser dado a indivíduos com infecção confirmada pelo HCV deve abordar o risco evidente de transmissão sexual (Cavalheiro, N.P., 2007).

A transmissão vertical pode ocorrer tanto de forma intra-uterina como por via perinatal. Alguns autores têm relatado que o risco de infecção é maior no caso de uma criança nascida por parto vaginal que em cesarianas (Norkewicz, M.R. *et al*, 2007; Jain, S. *et al*, 2007). Contudo, nem todos os

estudos demonstram esta ligação entre o parto vaginal e a transmissão perinatal do HCV. Níveis virêmicos elevados, especialmente acima de um milhão de cópias por mililitro, aumentam o risco de transmissão vertical. O mesmo foi observado com mães co-infectadas com HIV e HCV, onde 18% das crianças desenvolveram a infecção pelo HCV, enquanto que somente 4,5% das crianças nascidas de mães infectadas apenas pelo HCV desenvolvem a doença (Gonçales, J.R. *et al.*, 2000).

Uma parcela dos pacientes adquire o vírus de maneira não identificada, chamada de forma “esporádica”. Situações cotidianas e habituais já foram relatadas, como a partilha de lâmina de barbear, descrita na Índia (Thakral, B. *et al.*, 2006), submissão ao procedimento de endoscopia (CDC, 2008), além de transmissão intrafamiliar do vírus (Plancoulaine, S.; M., *et al.*, 2008). Outra forma de transmissão corresponde à prática de transplante de órgãos e tecidos (Pereira, *et al.*, 1991; Morales, 1999).

Transfusão de sangue

A transfusão de sangue é uma alternativa terapêutica muito importante e muito utilizada na medicina. A indicação do uso de transfusão de hemocomponentes tem sido cada vez mais cuidadosamente realizada de forma mais restritiva considerando o risco de reações transfusionais.

As reações transfusionais podem decorrer da utilização do sangue de um doador alogênico, e entre elas, as mais importantes são as reações

imunológicas e as doenças transmissíveis pelo sangue. Os vírus transmitidos pelo sangue representam a maior parcela deste grupo, entre eles principalmente os vírus das hepatites B e C (HBV e HCV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da leucemia de células T humana (HTLV- 1 e 2). Todos estes agentes são regularmente testados nos Bancos de Sangue do Brasil e desde 1993 a portaria Nº 1.376 de 19 de Novembro de 1993, do Ministério da Saúde, tornou obrigatória a realização destes testes na rede hemoterápica brasileira (Brasil, 1993).

Com o uso de testes sorológicos de última geração e a introdução dos testes moleculares (NAT) na triagem de doadores de sangue a prevalência de casos de transmissão transfusional de Hepatite C decaiu bastante (Tawk, H.M. *et al*, 2005; Wang, B. *et al*, 2005; Page-Shafer, K *et al*, 2008). No entanto, a segurança transfusional depende da combinação de diversos fatores como o nível de educação dos doadores, os critérios de seleção dos mesmos e da sensibilidade dos testes laboratoriais utilizados. Como resultado de diversos investimentos nestes aspectos o risco de transmissão da infecção de HCV por transfusão de sangue é muito baixo sendo em doadores de repetição nos Estados Unidos de 1:1,8 milhões de doações (Busch, M.P. *et al*, 2005) onde já foram implementados testes de detecção do RNA viral na triagem dos doadores de sangue.

Sabe-se ainda que o vírus pode estar presente em baixos títulos em uma parcela das pessoas infectadas (Bradley, D.W. e Maynard, J.E. 1996; Page-Shafer, K. *et al*, 2008), o que dificulta o diagnóstico e a triagem sorológica de doadores de sangue. O período que decorre entre a exposição até a primeira evidência de soroconversão com infecção aguda, determina o

período chamado de pré-soroconversão ou de janela imunológica. Para a infecção pelo HCV o período de janela imunológica é difícil de ser estudado uma vez que a diferenciação entre infecção aguda e infecção crônica é difícil de ser estabelecida, sendo este fato limitante para a análise. Este fato deve-se a possibilidade de sororreversão dos anticorpos após longos períodos de evolução crônica da infecção e este momento da história da infecção tem características laboratoriais semelhantes (Heller, T. e Rehmann, B., 2005).

Um estudo recente testou uma estratégia de análise da incidência da infecção pelo HCV em diferentes populações dos Estados Unidos e acompanhou indivíduos que apresentavam anti-HCV negativo, mas apresentavam presença de RNA viral plasmático a fim de determinar a média do período de janela imunológica e observaram que média do período de pré-soroconversão foi de 50,9 dias (95% IC, 46,1 a 55,8 dias) (Page-Shafer, K. *et al*, 2008).

Nos hemocentros públicos do Brasil, ainda não são utilizados testes moleculares (NAT) na triagem dos doadores, mas existe uma discussão sobre a possibilidade e custo-benefício da implementação desta tecnologia na hemoterapia pública brasileira. Em alguns hemocentros privados já foi implantada a tecnologia de triagem molecular para HCV e HIV em doadores de sangue. Estudos demonstram experiências de aplicação de métodos NAT "in house" na triagem de doadores e indicam que o método é capaz de detectar os seis genótipos virais além de possuir sensibilidade de 500 UI/mL (Wendel, S. *et al*, 2007).

No Estado do Amazonas, dados de triagem sorológica da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), revelam que

0,34% dos doadores de Manaus apresentam soropositividade para anti-HCV no teste de triagem.

História natural e Características clínicas do vírus da Hepatite C

Caracteristicamente, o paciente com hepatite C apresenta uma doença aguda clinicamente silenciosa, raramente sintomática, estimando-se que apenas cerca de 5 a 10% apresente icterícia e procure um médico. (Busch, M.P. *et al*, 2006). A hepatite C aguda é um diagnóstico raro, pois a maioria dos pacientes não possui sintomas, ou talvez não os relacionem com a doença.

A maioria dos infectados só descobre a infecção no momento em que doa sangue ou quando realiza avaliação geral (“check up”) quando a doença já está em um estágio mais avançado, o que pode demorar mais de 20 anos (Esteban, J.I. *et al*, 1990). O diagnóstico tardio da infecção compromete o prognóstico do tratamento e tem sido um grande problema de saúde pública em muitos países (Strauss, E., 2007).

Existem estudos que demonstram a cura espontânea da infecção (“clearance” viral) representado por cerca de 10 a 45% dos casos principalmente no primeiro ano de infecção (Thomas, D.L. *et al*, 2000; Freeman, A.J. *et al*, 2001; Bernardin F. *et al*, 2008). O estado de “clearance” viral plasmático caracteriza-se pela ausência de RNA viral detectável no plasma com a presença de anticorpos anti-HCV (Thomas, D.L. *et al*, 2000).

Há evidências que a chance de “clearance” viral plasmático pode aumentar em 50% quando associada a infecção aguda sintomática quando comparada com infecção aguda assintomática, refletindo possivelmente uma resposta imune robusta capaz de erradicar os vírus dos hepatócitos (Orland, J.R. *et al*, 2001).

Após a fase aguda, a evolução para cronicidade ocorre em quase 85% dos casos, progredindo de forma também silenciosa, por um período de 15 a 25 anos. Após esse período, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem doença hepática mais grave, geralmente apresentando sintomas de insuficiência hepatocelular ou hipertensão portal. Uma minoria, 5 a 10% dos pacientes com evolução crônica, desenvolve cirrose hepática em período inferior a 10 anos. Esse número chega a 30% quando o período de evolução é superior a 25 anos (Hatzakis, A. *et al*, 1996, Heller, T. e Rehrmann, B, 2005).

Estudos longitudinais retrospectivos e prospectivos avaliaram o curso da infecção pelo HCV em indivíduos com tempo de infecção conhecido e que foram monitorados prospectivamente. O estudo de uma coorte de mulheres alemãs que se infectaram com uso de anti-D contaminado com o genótipo 1b (Power, J.P. *et al*, 1994) e o estudo de Seeff, L.B. *et al* (2002) que descreveram o acompanhamento prospectivo de pacientes expostos a transfusões de sangue contaminado com o genótipo 1a nos anos 70, demonstraram que o genótipo 1 evolui com grande frequência para persistência viral e está associado à doença hepática grave.

Em pacientes com hepatite C crônica, a infecção pelo genótipo 1b está mais associado com doença hepática grave e curso mais agressivo do que pelos outros genótipos (Zein, N.N, 2000).

O carcinoma hepatocelular é uma complicação da infecção pelo vírus da hepatite C, com incidência de 3 a 5% ao ano, em indivíduos cirróticos. O carcinoma hepatocelular é a mais freqüente causa de morte em paciente com cirrose induzida por hepatite C (Benvegnù, L. *et al*, 2007). Em estudos prospectivos já foi demonstrado que o genótipo 1 se comportou como variável de risco independente para o desenvolvimento de carcinoma hepato celular em pacientes com cirrose instalada (Bruno, S. *et al*, 1997; Bruno, S. *et al*, 2007).

A infecção aguda pelo HCV é normalmente assintomática e, por isso, raramente reconhecida. O período de incubação varia de duas a 26 semanas, com a média entre seis e 12 semanas. A evolução clínica costuma ser mais leve que a hepatite por HBV. Porém, alguns casos individuais podem ser graves e indiferenciados das infecções agudas pelos vírus da Hepatite A (HAV) e vírus da Hepatite B (HBV).

Na infecção aguda, a icterícia ocorre em menos que 20% dos casos e parece estar correlacionada com os níveis de RNA entre 10^5 a 10^7 cópias/mL no soro (Orland, J.R.*et al.*, 2001).

A infecção crônica costuma apresentar-se de forma oligossintomática, com manifestações clínicas inespecíficas como fadiga muscular, artralgia, perda de peso, letargia, mialgias, febre baixa, náuseas, vômitos, dor ou desconforto no quadrante superior do abdômen.

Têm-se observado ainda uma associação entre diversas doenças auto-imunes e a infecção pelo HCV, porém o mecanismo etiopatogênico ainda não foi elucidado. Assim, a hepatite auto-imune, Síndrome de Sjögren, Síndrome Sicca, Liquen planus, porfiria cutânea tardia, tireoidite de Hashimoto, crioglobulinemia mista, glomerulonefrites e miosites podem estar relacionadas à infecção viral (Petit, J.M. *et al.*, 2001; Paraná, *et al.*, 1999; Lopes, E.P.A *et al.*, 1999).

Um dos aspectos clínicos que dificulta o diagnóstico da hepatite C crônica é representado por elevações episódicas nas transaminases séricas, com períodos interpostos de normalidade. Desta forma, nem sempre as transaminases servem como indicador da infecção uma vez que níveis normais não garantem a ausência de lesão hepática (Rossini, A. *et al.*, 1995, Strauss, E., 2007). Por outro lado, os níveis elevados de transaminases também se associam a outras situações como esteato hepatite, alcoolismo, hipotireoidismo e diabetes mellitus (Gonçales, JR. *et al.*, 1999; Heller, T. e Rehmann, B., 2005).

A persistência do vírus e as manifestações clínicas distintas estão correlacionadas com as características imunológicas do hospedeiro e com a evolução genética do vírus, isto é, com o tipo de variante viral responsável pela infecção (Orland, J.R. *et al.*, 2001; Barret, S. *et al.*, 2001). Os mecanismos determinantes para o “clearance” viral após a soroconversão envolvem uma combinação de variáveis ligadas ao hospedeiro e ao vírus incluindo o modo de contaminação, a complexidade da dose e das quasiespécies envolvidas, o genótipo e o subtipo responsável pela infecção, a etnia do hospedeiro, o tipo de HLA do indivíduo, o sexo, a idade no

momento da infecção e outras variáveis ligadas ao hospedeiro (Busch, M. *et al*, 2006).

Estudos revelam o papel dos diferentes genótipos do HCV na persistência da infecção após a exposição aguda. É demonstrado um padrão de evolução para a cronicidade de 92% em pacientes expostos ao genótipo 1b, comparado com 33% a 50% em pacientes expostos a outros genótipos (Choo, Q.L. e Pinho, J.R.R., 2003). O genótipo 1 tem sido associado com o desenvolvimento de uma doença hepática mais severa e uma resposta à terapia antiviral mais limitada. Além disso, no genótipo 1, mais particularmente na região do envelope viral, são encontradas altas taxas de variabilidade genética, criando um grande desafio para a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina (Lavillette, D. *et al*, 2005a).

Há também evidências de que a infecção causada pelo genótipo 3 costuma evoluir com intensa esteatose, o que poderia acelerar o desenvolvimento de cirrose em pacientes que apresentam múltiplos fatores predisponentes ou adjuvantes para essa complicação (Choo, Q.L. e Pinho, J.R.R., 2003); Alencar, R.S.M., *et al*, 2008).

Resposta Imune ao Vírus da Hepatite C

A resposta imune ao HCV é multiespecífica tanto em termos de resposta humoral quanto celular. A resposta imune celular através de células T cumpre papel central na patogênese da infecção pelo vírus C. A resposta

por célula T às proteínas do HCV na fase aguda da hepatite C é um determinante crítico para a evolução final da doença.

Estudos sugerem que a resposta Th0/Th1 por linfócitos T CD4+ contra a fração NS3 do vírus e possivelmente a outras proteínas não estruturais do HCV (NS4 e NS5) contribuem para o sucesso do "clearance" viral, isto é pela eliminação do vírus. No entanto, a resposta de células mononucleares contra o Core do vírus é mais comum em pacientes que evoluem para a forma crônica da hepatite C (Diepolder, H.M. *et al.*, 1995; Heller, T. e Rehermann, B., 2005).

Existe um consenso crescente que o desenvolvimento de uma resposta imune periférica relativamente forte por células TCD4+ e CD8+ contra o vírus da hepatite C está relacionado com a resolução da infecção (Thimme, R. *et al.*, 2002).

Além disso, alguns estudos sugerem a relevante associação de determinados haplótipos do HLA com susceptibilidade ou com o "clearance" espontâneo do vírus (Cramp, M.E. *et al.*, 1998; Simanis, R. *et al.*, 2008). O estudo de Nowakowska, B. e Kacprzak-Bergmann, I. (2004) demonstrou uma forte associação dos alelos DQB1*0301, DRB1*1101 e DRB1*1104 com os casos de sucesso de "clearance" viral.

O papel do envolvimento de linfócitos T CD8+ é também de grande importância no entendimento da patogênese do HCV. Foi demonstrado que uma resposta positiva e multiespecífica por células T CD8+ durante os seis primeiros meses após a infecção está associada com a erradicação da infecção e este tipo de resposta é importante para o controle da doença.

Sabe-se também, que a presença de T CD4+ é um pré-requisito para a uma resposta de T CD8+ eficiente (Gruner, N.H. *et al*, 2000).

A infecção pelo HCV gera anticorpos contra as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. As regiões hipervariáveis da proteína E2 são os mais importantes sítios de resposta humoral anti-envelope e representam um papel importante como epítopo neutralizante. A resposta humoral contra as proteínas do envelope é gerada lentamente e atinge títulos baixos durante a infecção primária (Lavillette,D; *et al*, 2005b). No entanto, os anticorpos neutralizantes surgem tarde demais para prevenir a infecção crônica (Bhopale,G.M. e Nanda, P.K., 2004; Netski,D.M., *et al*, 2005).

Vários estudos sugerem que uma forte resposta específica por linfócito T citotóxico contra proteínas estruturais e não estruturais mostra ser importante para o “clearance” viral e para uma possível proteção. Portanto, uma vacina ideal contra o HCV deveria induzir uma forte resposta humoral e induzir uma forte resposta T helper e T citotóxica (Bhopale, G.M. e Nanda, P.K., 2004).

O HCV caracteriza-se por apresentar múltiplas mutações, burlando o sistema imunológico e dificultando a elaboração de vacinas e protocolos terapêuticos eficientes para o controle da infecção. Desta forma, o entendimento dos processos imunes envolvidos na resposta contra o HCV é parte importante na análise do diagnóstico clínico e laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C. Mais conhecimentos sobre os aspectos relacionados ao vírus e ao sistema imunológico do hospedeiro que determinam o “clearance” ou a persistência do vírus na fase aguda da infecção, trarão melhorias e boas perspectivas para a terapia antiviral e para

o desenvolvimento de vacinas. A resposta a tratamentos antivirais depende não somente da capacidade intrínseca do vírus de evadir dos seus efeitos, mas também da habilidade própria do paciente em gerar uma resposta imune sistêmica apropriada (Torres-Puente.M, *et al*, 2008).

Diagnóstico laboratorial

Logo após a identificação do HCV, todos os esforços foram dirigidos para a busca de métodos de diagnóstico utilizando-se de polipeptídeos virais derivados de recombinações e expressos em leveduras para realização de ensaios imunoenzimáticos (Kuo, G. *et al.*, 1989, Lopes, E.P.A., *et al*, 2000).

Os testes de primeira geração que surgiram no mercado apresentavam sensibilidade de 70 a 80% quando aplicados em populações de baixa prevalência da infecção, apresentando uma janela imunológica de 4 a 6 meses. Os testes de segunda e terceira geração apresentam maior sensibilidade (cerca de 99,8%) e a janela imunológica teve uma redução de 10 semanas quando comparada com os testes de primeira geração (Lopes, E.P.A, *et al*, 2000; Barreto, A.M.E.C. *et al*, 2008).

No Brasil, em 1989 o Ministério da Saúde, por meio da portaria 721, informava ser facultativa a pesquisa de ALT e dos marcadores da hepatite B em doadores de sangue (com exceção da HbsAg), não havendo, contudo, qualquer menção ao vírus C. Em Julho de 1993, a secretaria de saúde do Rio de Janeiro tornou obrigatória a pesquisa do anti-HCV, não informando contudo, o método a ser utilizado. Em Novembro de 1993, o Ministério da

Saúde, através da portaria 1376, tornou obrigatória a pesquisa de anti-HCV por teste imunoenzimático (ELISA) e a análise do ALT nos bancos de sangue de todo país. Em Dezembro de 2002, a RDC 343 manteve obrigatória a pesquisa de anti-HCV, eliminou a triagem utilizando o a dosagem de ALT e introduziu a obrigatoriedade da busca ativa de casos suspeitos de soroconversão entre doadores de sangue (Brasil, 2002). A mais recente portaria que rege a hemoterapia brasileira (RDC 153 de Junho de 2004) mantém estas diretrizes (Brasil, 2004).

Hoje, o diagnóstico laboratorial de rotina é feito pela técnica de ELISA segunda ou terceira geração, confirmados através de imunoblot e/ou RT-PCR, ou ainda por técnica de PCR em Tempo Real. A carga viral é um teste complementar, devendo ser utilizado para pacientes candidatos à terapêutica antiviral. A viremia desenvolve-se após poucos dias de infecção e, enquanto os anticorpos específicos anti-HCV ainda não são detectáveis, os pacientes só terão o teste positivo para RNA viral como evidência da infecção (Heller, T. e Rehermann, B, 2005). O RNA-HCV torna-se detectável no soro de 7 a 21 dias após a exposição. Os anticorpos anti-HCV aparecem dentro de 20 a 150 dias (em média 50 dias). A elevação das transaminases ocorre de forma oscilante, em geral, após duas a quatro semanas da infecção (Orland, J.R. *et al.*, 2001; Heller, T e Rehermann, B., 2005) e pode até mesmo não ocorrer.

Durante a fase inicial da infecção, tipicamente o paciente apresenta testes ELISA com reatividade muito baixa e ainda apresentando resultado negativo nos testes tipo RIBA. Depois, estes últimos apresentam padrão indeterminado antes de tornarem-se reativos (Heller, T. e Rehermann, B.,

2005). Foram descritos casos de pacientes que apresentam quadro de anticorpo negativo durante a toda a fase aguda da infecção e podem evoluir sem sequer apresentar qualquer marcador sorológico da infecção (Kryezka, W. *et al*, 2003; Morand, P *et al*, 2001).

No estudo de Amorim R.M.S. *et al* (2004), realizado no Brasil com uma população de doadores de sangue do distrito Federal, mostrou-se que 17,1% dos indivíduos com Imunoblot negativo para HCV apresentavam HCV RNA positivo, indicando a necessidade de realizar, neste grupo de doadores exames confirmatórios utilizando a pesquisa de HCV RNA.

Atualmente, o diagnóstico depende, fundamentalmente, da demonstração dos anticorpos contra o HCV. As técnicas passaram por vários estágios de desenvolvimento. Os testes de primeira geração (EIA I e RIBA I) detectam anticorpos contra a porção C100-3 e foram abandonados, pois podiam demorar até 24 semanas para positivar na doença aguda, além de apresentar um grande número de falso-positivos. Os testes ELISA de segunda geração detectam anticorpos contra os antígenos c200 (mistura de c33 e c100-3) e c22-3, com sensibilidade e especificidade superior a 90%. Os testes de imunoblot recombinante (RIBA) II detectam os mesmos antígenos individualizados numa tira de nitrocelulose. Os testes de terceira geração adicionam antígenos da porção NS5 do genoma viral, aumentando significativamente a sensibilidade e especificidade em relação aos métodos de segunda geração.

Os títulos de HCV RNA no soro podem variar entre 1 milhão de unidades internacionais por mililitro a poucas centenas de unidades. Alguns pacientes infectados podem até apresentar o teste para detecção de RNA

HCV negativo em alguns momentos da infecção, pois são descritas flutuações do RNA viral no soro (Heller, T. e Rehermann, B., 2005). Por isso, um simples negativo no teste de detecção do RNA viral não é por si só uma evidência de “clearance” viral. Para tal, se faz necessário o acompanhamento do paciente até um ano após o primeiro resultado negativo. Estas flutuações nos níveis virais também contribuem para diferenciar infecção aguda de infecção crônica, pois na infecção crônica os níveis do HCV são tipicamente muito estáveis e não apresentam variações maiores do que um log durante o tempo de acompanhamento do indivíduo. No entanto, na infecção aguda podem ocorrer níveis muito baixos de RNA viral, mesmo quando são detectados anticorpos específicos anti-HCV (Heller, T. e Rehermann, B., 2005). Mais comumente tem sido reportado que os níveis de anticorpos continuam decaindo após a eliminação completa do vírus e que em 7 a 40% dos casos podem tornar-se indetectáveis (Seef, L.B. *et al*, 2001; Takaki, A. *et al*, 2000).

Técnicas de detecção e quantificação de RNA viral e de genotipagem do vírus da Hepatite C têm sido padronizadas utilizando-se a tecnologia de PCR em Tempo Real. Alguns protocolos têm sido descritos proporcionando o monitoramento da carga viral combinada com a informação do genótipo envolvido, apontando assim a tecnologia como sendo uma ferramenta viável para o diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HCV (Menegazzi, P. *et al*, 2008).

O método mais direto e considerado como padrão para determinar o tipo viral é o sequenciamento do genoma do HCV. A genotipagem analisa as seqüências de diferentes regiões do genoma na diferenciação dos tipos e

subtipos do HCV podendo ser realizada por técnicas utilizando primers tipo específicos, hibridação com probes tipo específicas ou digestão enzimática de produtos da PCR. A análise das regiões subgenômicas como a 5'NCR pode ser usada para deduzir o genótipo viral. A distribuição dos sítios de polimorfismo na região 5'NCR é usada para desenvolver oligonucleotídios para serem utilizados como primers para detecção viral e quantificação (Smith, D.B. *et al*, 1995). Vários protocolos têm sido desenvolvidos para estas análises como alternativas para utilização de kits comerciais que são muito caros.

A presença de anticorpos genótipo específicos pode ser utilizada como marcador indireto de genótipos do HCV. A técnica de identificação é chamada de sorotipagem ou genotipagem sorológica. Esta técnica possui vantagens que a torna viável para estudos epidemiológicos, tais como baixo risco de contaminação e simplicidade do ensaio. Por outro lado, a técnica apresenta desvantagens na sensibilidade e especificidade limitando o seu uso (Zein, N.N., 2000).

O mesmo genótipo encontrado no soro é geralmente encontrado no tecido hepático, com exceção nas raríssimas infecções mistas. Alto padrão de infecção mista de genótipos do HCV tem sido relatado entre hemofílicos politransfundidos que podem ter tido múltiplas infecções pelo HCV (Santos e Foccacia, 2003).

As diferenças entre os genótipos do vírus da hepatite C têm sido consideradas pelos pesquisadores como importante marcador epidemiológico e de distribuição geográfica que podem ser usados para traçar o curso da infecção em uma dada população.

O conhecimento do tipo viral infectante pode ser útil também na prática clínica para melhor direcionamento no atendimento de pacientes infectados pelo HCV.

JUSTIFICATIVA

A hepatite C é uma doença transmitida pelo sangue e seus derivados, e o vírus da Hepatite C foi considerado o principal agente etiológico das hepatites pós transfusionais do mundo (Alter, M.J. *et al.*, 1989; Esteban, J.I. *et al.*, 1990). Hoje, com os procedimentos de triagem sorológica de doadores de sangue, a transmissão do HCV através de suprimento de hemoderivados não é tão significativa, mas continua sendo motivo de constante alerta e preocupação dos centros de Hemoterapia em todo mundo.

A doença crônica, com poucas manifestações clínicas, ocorre em 80% dos indivíduos infectados (Lavillette, D. *et al.*, 2005a). Consequentemente, a hepatite C é frequentemente diagnosticada quando o indivíduo se submete a testes de triagem sorológica em bancos de sangue (Lauer, G.M. e Walker, B.D. 2001).

No estado do Amazonas, dados de triagem sorológica da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), revelam que 0,56% dos doadores apresentam soropositividade para o anti-HCV (Torres, K.L. *et al.*, 2003; Usui, C.M., 2007).

Recentemente, alguns autores relataram que no Estado do Amazonas são encontrados os genótipos 1 e 3 em indivíduos com hepatite C crônica (Campioto, S. *et al.*, 2005). No entanto, não se conhece os genótipos virais do HCV na população de doadores de sangue do Estado.

O diagnóstico laboratorial da hepatite C é realizado pela pesquisa de anticorpos contra antígenos específicos do HCV através de ensaio imunoenzimático (ELISA), mas um percentual representativo de doadores de

sangue (39,2%) apresenta um padrão de anticorpos específicos contra frações virais que não a caracterizam como infecção confirmada, mas sim como padrão indeterminado no Imunoblot (Torres, K.L. *et al.*, 2003).

Apesar do fluxograma de diagnóstico da infecção pelo vírus da Hepatite C do Ministério da Saúde recomendar o uso de testes moleculares em seqüência aos testes de triagem (ELISA), muitos centros em todo Brasil ainda utilizam o Imunoblot como teste complementar, como é o caso da Fundação HEMOAM. Desta forma, os resultados indeterminados neste ensaio provocam uma herança de indivíduos sem definição diagnóstica. Muitos destes indivíduos com padrão de sorologia de reatividade fraca e com Imunoblot indeterminado, apesar dos hemocomponentes terem sido descartados, passam a ser liberados para novas doações neste serviço.

Esta conduta dos médicos hemoterapeutas no acompanhamento e aconselhamento dos doadores com sorologia reativa para Hepatite C passou a ser um motivo de inquietação do nosso grupo de pesquisa em virtude do alto custo para a investigação diagnóstica todas as vezes que o doador retorna ao serviço para doar sangue e também pelo aumento do risco transfusional que esta conduta pode provocar.

A pesquisa do RNA viral através de reação da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), é uma técnica com alto grau de sensibilidade e especificidade e com este estudo será possível conhecer a população estudada e dar uma orientação mais adequada ao doador através da confirmação diagnóstica e principalmente avaliar a conduta hoje adotada na Fundação HEMOAM.

A confirmação diagnóstica da presença do vírus, o esclarecimento do genótipo envolvido e da carga viral são de extrema importância na condução de estudos para o entendimento da resposta imune ao vírus e do padrão sorológico, o que levará a confirmação do resultado frente a testes de triagem e diagnóstico específico da hepatite C.

Desta forma, este estudo visa realizar a caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) em doadores de sangue do Estado do Amazonas a fim de subsidiar conhecimentos para interpretação dos diferentes perfis laboratoriais e clínicos, além de contribuir para o conhecimento das rotas de transmissão e da epidemiologia da infecção do Amazonas.

OBJETIVOS

Gerais:

Caracterizar o perfil sorológico e molecular da infecção pelo vírus da Hepatite C em doadores de sangue do Estado do Amazonas.

Específicos:

1. Relacionar o perfil sorológico do doador nos testes de triagem (ELISA) com o perfil de anticorpos específicos contra frações do HCV no teste Imunoblot;
2. Descrever a distribuição geográfica dos diferentes genótipos do vírus da Hepatite C encontrados na população de doadores de sangue do Estado do Amazonas;
3. Descrever a frequência de casos de “clearance plasmático” viral na população estudada;
4. Relacionar o genótipo viral encontrado com o perfil sorológico, de acordo com os níveis de anticorpos quantificados através do teste ELISA (densidade ótica/Cut off) e Imunoblot;
5. Relacionar a carga viral encontrada com o perfil sorológico do doador, de acordo com os níveis de anticorpos quantificados através do teste ELISA (densidade ótica/Cut off) e Imunoblot.

MÉTODOS

Modelo do estudo

Tratou-se de um estudo descritivo observacional, transversal, com delineamento tipo detecção de casos, para a caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) em doadores de sangue do Estado do Amazonas.

Características da área de estudo

O Estado do Amazonas localizado na região norte do Brasil em uma superfície de 1.577.820 km² tendo uma população registrada no ano de 2007 de 3.221.939 habitantes, dos quais 2.495.879 (77,46%) residem na Capital do Estado - Manaus. O estado possui 62 municípios divididos em 13 mesorregiões, elaboradas a partir das bacias hidrográficas dos principais afluentes do Rio Amazonas (Figura 2) (IBGE, 2007).

Figura 2. Divisão territorial com indicação das mesorregiões, microrregiões geográficas e municípios.

01- Norte Amazonense

01- Rio Negro

Barcelos

Novo Airão

Santo Antonio do Rio Negro

São Gabriel da Cachoeira

02- Japurá

Japurá

Maraã

02 – Sudoeste Amazonense

03 – Alto Solimões

Amatura

Atalaia do Norte

Benjamim Constant

Fonte Boa

Jutai

Santo Antônio do Içá

São Paulo de Olivença

Tabatinga

Tonantins

04- Juruá

Carauari

Eirunepé

Envira

Guajara

Ipinuma

Itamarati

Juruá

03 – Centro Amazonense

05- Tefé

Alvarães

Tefé

Uarini

06 – Coari

Anamã

Anori

Beruri

Caapiranga

Coari

Codajás

07 – Manaus

Autazes

Careiro
Careiro da Várzea
Iranduba
Manacapuru
Manaquiri
Manaus

08 – Rio Preto da Eva

Presidente Figueiredo
Rio Preto da Eva

09 – Itacoatiara

Itacoatiara
Itapiranga
Nova Olinda do Norte
Silves
Urucurituba

10 – Parintins

Barreirinha
Boa Vista do Ramos
Maués
Nhamundá
Parintins
São Sebastião do Uatumã
Urucará

04 – Sul Amazonense

11- Boca do Acre

Boca do Acre
Pauini

12- Purus

Canutama
Lábrea
Tapauá

13- Madeira

Apuí
Borba
Humaitá
Manicoré
Novo Aripuanã

Fonte: IBGE (2007)

Figura 3. Mapa do Estado do Amazonas.



www.guianet.com.br/am/mapaam.gif

A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM é responsável pela cobertura de 100% do sangue transfundido em toda a rede pública do Estado do Amazonas tendo unidades de coleta e transfusão (UCTs) descentralizadas em 49 municípios do Estado. Estas UCTs funcionam nas Unidades Mistas de Saúde que possuem demanda de serviços de hemoterapia e são responsáveis pelos procedimentos de captação de doadores, triagem clínica epidemiológica, coleta de sangue e testes imunohematológicos (Figura 4).

Figura 4. Unidades hemoterápicas do Interior do Estado do Amazonas

Alvarães	Eirunepé	Novo Airão
Amaturá	Envira	Novo Aripuanã
Anorí	Fonte Boa	Parintins
Apuí	Humaitá	Pauini
Atalaia do Norte	Ipixuna	Presidente Figueiredo
Autazes	Itacoatiara	Sta. Izabel do Rio Negro
Barcelos	Itamarati	Santo Antônio do Içá
Barreirinha	Itapiranga	São Gabriel da Cachoeira
Benjamin Constant	Juruá	São Paulo de Olivença
Boa Vista do Ramos	Jutaí	São Sebastião do Uatumã
Boca do Acre	Lábrea	Tabatinga
Borba	Manacapuru	Tapauá
Canutama	Manicoré	Tefé
Carauarí	Maraã	Urucará
Castanho	Maués	Urucutituba
Coari	Nhamundá	
Codajás	Nova Olinda do Norte	

Os doadores que comparecem nas Unidades de Coleta e Transfusão são cadastrados e neste momento são registradas as suas características pessoais como nome completo, filiação, endereço residencial, local de trabalho e data de nascimento. Após esta identificação, o doador é encaminhado para aferir o seu hematócrito, pulso, peso corporal, estatura e pressão arterial. Em seguida, é submetido a uma triagem clínica, através de uma entrevista que busca avaliar suas condições físicas, estado de saúde e risco potencial de infecções transmissíveis pelo sangue. Os testes de triagem sorológica são realizados no hemocentro coordenador em Manaus (HEMOAM) que, além dos procedimentos anteriormente descritos, realiza como ensaios de rotina sorológica dois testes de detecção de anticorpos contra o HIV-1 e HIV-2, um teste para detecção de anticorpos contra HCV, HTLV I/II, Doença de Chagas e Sífilis. Além de detecção de marcadores para HBV: HBsAg e anti-HBc e em todos os doadores do interior do Estado reativos para anti-HBc é também realizado o teste anti-HBs.

A triagem dos candidatos à doação relacionada à malária consiste em uma triagem clínico-epidemiológica voltada para histórias de risco para exposição à infecção. Neste momento, o doador é classificado como isento de risco (e apto à doação), de baixo ou médio risco (é orientado a doar e para coleta de amostra específica para teste parasitológico de malária enquanto que a unidade coletada aguarda o resultado do teste para ser disponibilizada para estoque), ou de alto risco (inapto à doação).

As amostras seguem um fluxo de envio para o HEMOAM em Manaus e os resultados da triagem são enviados as Unidades do interior. Em

Manaus, todos os processos do ciclo do sangue, desde o cadastro, triagem e coleta dos doadores, fracionamento, triagem sorológica, testes imunohematológicos, rotulagem, estoque, controle de qualidade, compatibilidade e distribuição do sangue são realizados. De rotina, em Manaus, e em todas as unidades do Interior, os doadores com sorologia positiva são atendidos por médicos hemoterapeutas que prestam orientações, solicitam coleta de nova amostra para repetição dos exames de triagem, propõem o tratamento ou o encaminhamento do paciente para centros de referências.

Em relação à presença de marcadores para Hepatite C no banco de sangue do Amazonas a conduta que tem sido hoje utilizada é de sempre descartar as bolsas com sorologia ELISA anti-HCV repetidamente reativa com qualquer padrão de positividade inclusive com densidade ótica da zona cinza¹. Quanto à conduta adotada pelos médicos hemoterapeutas para orientação ao doador que apresenta teste ELISA com baixa intensidade de reação (razão DO/Cut off baixa) e com Imunoblot negativo ou indeterminado, esta tem sido de reaproveitar o doador e novamente liberá-lo no sistema para novas doações. Apenas quando o Imunoblot é reativo é que o doador é considerado inapto definitivo.

O estudo foi conduzido pelo laboratório de sorologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, em parceria com o

¹ No serviço de sorologia da Fundação HEMOAM é considerada em zona cinza a amostra que apresentar leitura de densidade ótica de até 10% abaixo do ponto de corte (cut-off). Esta é uma medida de segurança para assegurar a sensibilidade do ensaio.

Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - USP.

População de estudo e casuística

Na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM são cadastrados anualmente cerca de 49.472 doações de sangue referentes a todo o Estado do Amazonas. Destas, 42.098 (85,1%) são provenientes de Manaus e 7.374 (14,9%) dos Municípios do Interior do Estado (dados não publicados obtidos do núcleo de estatística do HEMOAM/2007).

Critérios de seleção

Para este estudo foram selecionados 306 doadores de sangue seqüenciais cadastrados em todas as unidades de coleta e transfusão de sangue do Estado do Amazonas no período de Setembro de 2005 a Abril de 2007 com o seguinte perfil:

- Com sorologia reativa para anti-HCV nos testes de triagem sorológica;
- De ambos os sexos;
- Entre 18 e 65 anos (pois é um critério para a doação de sangue);
- Com ou sem marcadores sorológicos para Hepatite B: anti-HBc e HbsAg; HIV: anti-HIV-I e II; HTLV: anti-HTLV I e II; Doença de Chagas: teste ELISA e Sífilis: VDRL;

Critérios de exclusão

Foram excluídos da análise por testes complementares (Imunoblot e diagnóstico molecular) os doadores que após a repetição do teste anti-HCV (ELISA) com nova amostra, apresentaram resultado negativo para o parâmetro. No entanto, os mesmos fizeram parte das análises da reprodutibilidade dos testes de triagem entre a primeira e segunda amostra.

Desenvolvimento do estudo

Os indivíduos enquadrados nos critérios de seleção foram chamados, como de rotina para o atendimento feito por um profissional de saúde capacitado, visando orientações ao doador, coleta de nova amostra para a repetição do teste, como citado anteriormente. Em Manaus, neste momento, um membro da equipe da pesquisa convidou o doador a participar voluntariamente do estudo sendo feito registro através do Termo de Consentimento livre e esclarecido (anexo A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM e pela Comissão do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – USP (CAPPesq – HC FMUSP).

Da mesma forma, no interior do Estado um profissional de saúde, ao realizar o procedimento de rotina para doador de sangue com sorologia reativa, convidou o indivíduo a participar deste estudo. Para tal, este profissional foi anteriormente orientado através de instruções e procedimentos operacionais padrão, voltados para as atividades deste projeto (Anexo B). Foi utilizada uma abordagem epidemiológica com os indivíduos envolvidos, através de um questionário específico do estudo

(anexo C), em local individualizado. Através deste instrumento, foram compilados dados demográficos dos pacientes (sexo, idade, procedência, ocorrência de doações anteriores) e dados de possível história de risco para a infecção pelo HCV. Visando diminuir a ansiedade do indivíduo e proporcionar o bem estar do mesmo, também foi entregue ao doador um informativo com esclarecimentos a respeito da Hepatite C com o objetivo de fornecer informações para atender as dúvidas mais comuns dos mesmos (Anexo D).

Conforme o fluxo da rotina dos serviços de hemoterapia, o doador foi encaminhado para a coleta de nova amostra. Neste momento, foram coletados 10 mL de sangue total em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro, que foi destinado ao laboratório de sorologia do HEMOAM (para realização dos testes ELISA e Imunoblot), dois tubos (de 5 ml) tipo PPT® (Plasma Preparation Tube – Becton Dickinson) para ensaios de biologia molecular. As amostras para os ensaios moleculares foram armazenadas à -70°C e posteriormente transportadas conforme as normas internacionais de transporte de material biológico (Internacional Air Transport Association - IATA) para o laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - IMT-SP/USP onde os ensaios moleculares foram realizados.

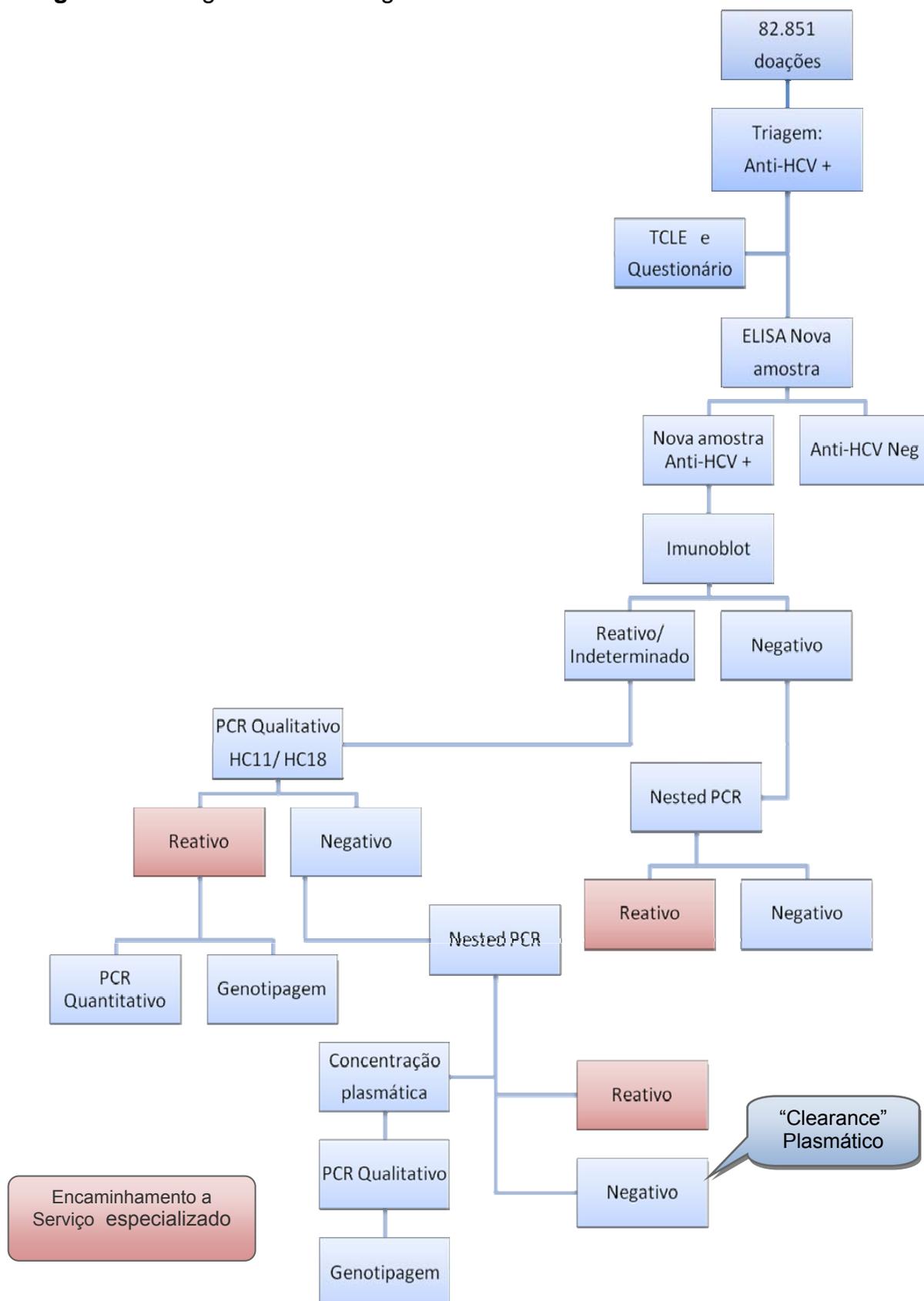
Após realização dos testes de triagem (ELISA) e confirmatório (ImunoBlot- RIBA) conforme descrito acima, os doadores de Manaus com sorologia confirmadamente reativa foram encaminhados para tratamento e acompanhamento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas em Manaus. Os doadores oriundos do Interior do Estado do Amazonas foram orientados a procurar a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas,

através da Secretaria do Estado do Amazonas, conforme estabelecido pela pactuação entre Municípios e Estado do Amazonas. Os resultados dos testes foram encaminhados ao paciente através da Unidade hemoterápica envolvida. O fluxograma metodológico está demonstrado na figura 5.

Amostras controles

Para validação dos testes moleculares foram utilizadas como controles negativos amostras de indivíduos sadios (doadores de sangue da Fundação HEMOAM) além do uso de água no lugar do template e como controles positivos, amostras sabidamente reativas com presença de RNA viral plasmático, oriundas de doadores da Fundação HEMOAM, além de amostras de bolsas de sangue de doadores do Banco de sangue do Hospital Sírio Libanês em São Paulo, gentilmente cedidas pelo Dr. José Eduardo Levi.

Figura 5. Fluxograma metodológico.



Testes laboratoriais

Teste de triagem

Para a triagem sorológica dos doadores de sangue e para análise sorológica da nova amostra dos doadores sororeativos para anti-HCV foi realizado o teste ELISA (Ensaio Imunoenzimático) anti-HCV de terceira geração e as amostras reativas foram repetidas. Desta forma foram coletados dados da Densidade ótica (DO) e do ponto de corte (Cutoff – CO) do ELISA da amostra da doação e da sua repetição, assim como do ELISA da nova amostra.

Para análise do grau de reatividade nestes testes a razão entre a Densidade ótica (DO) e o ponto de corte (cut-off: CO) de cada ensaio foi calculada. Os valores da razão DO/CO do teste de triagem e da nova amostra foram utilizados para a análise comparada com a combinação de testes confirmatórios e testes de diagnóstico molecular utilizados neste estudo. Para tal, as razões DO/CO foram segregadas em faixas de 1|--2; 2|--3; 3|--4, 4|--5 e 5|--6.

O conjunto diagnóstico utilizado neste estudo foi o kit Murex/Abbott anti-HCV versão 4.0 (Murex Biotech AS Ltd Abbott Diagnostics division).

Neste ensaio a amostra diluída foi incubada em microplacas impregnadas com antígenos purificados com contêm seqüências das regiões do core, NS3, NS4 e NS5 do vírus da Hepatite C. Durante o curso da primeira incubação os anticorpos anti-HCV presentes na amostra se ligam

aos antígenos imobilizados na placa. Após lavagem para remoção de material não ligado, os anticorpos específicos ligados foram incubados com conjugado monoclonal de anti-IgG Humana marcado com enzima peroxidase. Durante o curso da segunda incubação o conjugado se liga com os anticorpos ligados na primeira fase de incubação. Após a remoção do excesso de conjugado através de outra fase de lavagem, a enzima ligada é detectada pela adição de solução contendo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. Uma coloração rosa se desenvolve nos poços que possuem amostras contendo anticorpos anti-HCV. A reação é interrompida com adição de ácido sulfúrico.

A performance do kit Murex anti-HCV (versão 4.0) foi determinada testando-se em amostras randomizadas de doadores de sangue, de pacientes sabidamente com anticorpos anti-HCV, pacientes com doença relacionada à presença do HCV e pacientes com doença não relacionada ao HCV, além de painel de soroconversão.

A especificidade do ensaio na população de doadores de sangue foi calculada pelo fabricante e indica ser de 99,77% a 99,93% com distribuição binomial.

A reação é considerada positiva quando a absorbância (Densidade óptica – DO) da amostra é superior ao valor do “cut-off” e por medida de segurança transfusional é considerada indeterminada quando a absorbância obtida é até 10% abaixo do valor do cut –off (em faixa de zona cinza).

Os ensaios foram realizados no laboratório de sorologia da Fundação HEMOAM em Manaus.

Imunoblot – RIBA

Uma vez que as amostras tenham sido selecionadas através da triagem como citado anteriormente, foi realizado o teste Imunoblot. Este método baseia-se na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos do vírus da hepatite C.

Para este ensaio foi utilizado o kit CHIRON® RIBA HCV 3.0 SAI que é um Imunoblot qualitativo *in vitro* que utiliza antígenos codificados do HCV recombinantes e peptídeos sintéticos codificados do HCV imobilizados como bandas individuais sobre tiras do teste. Os antígenos recombinantes (c33c e NS5) e os peptídeos sintéticos (c100c e 5-1-1p) são derivados das regiões não estruturais do vírus, enquanto que o terceiro peptídeo recombinante (c22p) corresponde à proteína do nucleocapsídeo. Uma vez que os antígenos recombinantes c33c e NS5 do HCV são produzidos como proteínas de fusão individuais com superóxido dismutase humana (hSOD), o recombinante hSOD foi incluído também como uma banda de controle na tira. A banda de controle hSOD permite a detecção de anticorpos contra o hSOD que não são específicos para as porções codificadas do HCV dos antígenos recombinantes do HCV. O antígeno c33c do HCV é produzido em bactérias geneticamente modificadas (*E. coli*), enquanto que o antígeno NS5 do HCV e o hSOD são produzidos em leveduras geneticamente modificadas (*S.cerevisiae*). Os antígenos purificados são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas separadas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroblotting.

O ensaio é realizado em três fases, sendo que na primeira o controle de análise ou a amostra são diluídos e incubados com a tira. Os anticorpos específicos do HCV se estiverem presentes, irão ligar-se às bandas de antígenos recombinantes e/ou de peptídeos sintéticos correspondentes na tira. A remoção dos componentes do soro que não se ligarem é realizada por aspiração e lavagem.

Na segunda fase, a tira é incubada na presença de um conjugado de anti IgG humana produzida em cabra, marcado com peroxidase. O conjugado se liga à porção de IgG humana dos complexos antígeno-anticorpo. A remoção do conjugado que não se ligou é obtida por decantação e etapas subseqüentes de lavagem. Na terceira fase, é acrescentado um sistema colorimétrico de detecção de enzimas composto de peróxido de hidrogênio e 4-cloro-1-naftol. Se a ligação conjugada estiver presente, a reação enzimática produz uma reação de coloração azul escuro insolúvel em cada antígeno, peptídeo ou banda de controle específicos do HCV. A reação colorimétrica envolve oxidação bivalente inicial da enzima peroxidase pelo peróxido de hidrogênio. Após o desenvolvimento da cor da tira, a reação é interrompida pela remoção dos reagentes e das etapas de lavagem final. Os padrões visuais das bandas que são desenvolvidas em cada tira individual são o resultado de anticorpos específicos que se ligam a cada um dos antígenos recombinantes individuais e/ou peptídeos sintéticos na banda. A reatividade da banda a cada antígeno é determinada comparando-se visualmente a intensidade de cada banda individual com a banda de controle interno de IgG humano alto e baixo manchadas em cada tira.

O ensaio foi realizado conforme as recomendações do fabricante e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram duas ou mais bandas específicas contra os antígenos virais, indeterminadas as que apresentaram uma única banda e negativas quando nenhuma banda foi encontrada. Estes testes foram realizados no laboratório de Sorologia da Fundação HEMOAM em Manaus.

Teste de amplificação de ácidos nucleicos

Extração de RNA do plasma

A extração do RNA das amostras foi realizada a partir de 140µL de plasma utilizando-se o Kit QIAamp[®] Viral RNA (Qiagen, Uniscience do Brasil-SP). As amostras foram inicialmente lisadas em tampão de denaturação para inativação de RNases e para assegurar o isolamento de RNA intacto. As condições de tamponamento foram ajustadas para promover uma ótima ligação do RNA à coluna. O RNA ficou ligado à coluna e os contaminantes foram eficientemente lavados e retirados em duas etapas utilizando-se dois diferentes tampões de lavagem. O RNA foi eluído em um tampão especial livre de RNase que favorece a estocagem e também o uso direto do RNA. O RNA extraído ficou então, livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes e inibidores. Foram seguidas as instruções do fabricante. Em seguida ao término da extração do RNA, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA).

Concentração da amostra plasmática

Para algumas amostras que apresentaram reatividade no Nested PCR, mas que não apresentaram amplicon com sinal bom na reação de PCR utilizando-se o par de primers HC 11 e HC 18 (que gera um produto amplificado apropriado para o sequenciamento e genotipagem do vírus da Hepatite C), foi necessário realizar procedimento de concentração plasmática para posteriormente realizar o procedimento de extração de RNA.

A concentração foi realizada submetendo-se cerca de 700 μ L de plasma a centrifugação a 30.000 X g por 1 hora a 4°C.

O pellet obtido foi ressuspenso em 140 μ L de plasma residual no fundo do tubo. Este material concentrado foi submetido à extração de RNA como descrito anteriormente.

Foi realizado um ensaio deste procedimento utilizando-se 3 amostras controles de painel gentilmente cedido por Levi, J.E. (Laboratório de Virologia do IMT-SP) sendo a amostra I com concentração conhecida de 250 Unidades Internacionais de RNA viral/mL e as amostras II e III com concentração de 1000 Unidades Internacionais/mL. Foi realizada eletroforese em gel de agarose e a performance está demonstrada na figura 6. Podendo-se observar que a amostra I com 250 Unidades Internacionais/mL não apresentava sinal quando submetida a extração de

RNA por procedimento normal e passou a apresentar sinal após a concentração plasmática seguida de extração de RNA.

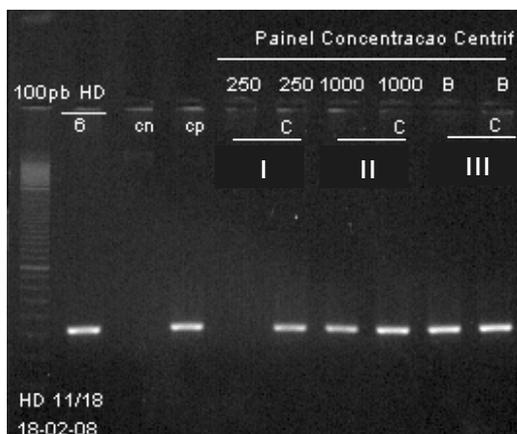


Figura 6. Gel de eletroforese em gel de agarose de PCR utilizando primers HC 11/ HC18 de amostras de painel de concentrações conhecidas submetidas a procedimento de concentração plasmática. Amostra I: apresenta 250 UI/mL; Amostra II: 1000 UI/mL e Amostra III: 1000 UI/mL. A simbologia “C” indica amostra após concentração plasmática.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a reação de Transcrição Reversa (RT), utilizando-se a enzima Transcriptase Reversa obtida do Moloney Murine Leukemia Vírus (M-MLV) (Invitrogen[®]) do extrato contendo o RNA viral e na presença de *Random Hexamers N6 (Random primers)* para sintetizar fitas de DNA. A reação foi realizada montando-se um mix (Mix I) de volume final de 69,2ul contendo 8,0ul de Tampão de PCR 10x concentrado (Invitrogen[®] - Minus MgCl₂), 6,4ul de dNTP's (2,5mM) (Invitrogen[®]), 8,0ul de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen[®]), 2,0ul de Inibidor

Recombinante de Ribonuclease (40 U/ul) (RNaseOUT™ – Invitrogen®), 0,8ul de DTT (dithiothreitol) (0,1M) (Invitrogen®) e 44,0µL de RNA. Esta mistura foi submetida a condições de 65°C por 5 minutos para provocar desnaturação das estruturas secundárias da fita de RNA. Em seguida foi preparado outro mix (Mix II) contendo 4,0ul de Random Primers (50 uM) (Invitrogen®), 1,0µL de M-MLV (200 U/ul) e 6,0ul de H₂O DEPC (UltraPure™ DEPC-treated Water apropriada para uso com RNA e preparada por incubação com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) e depois autoclavada para remover o DEPC (Invitrogen®)). À reação inicial (Mix I) foram adicionados 11,0ul do Mix II. Em seguida a reação foi submetida a 22°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos.

Após a síntese de cDNA os mesmos podem ter sido utilizados imediatamente para ensaios de PCR ou Nested PCR como descrito a seguir ou congelados a -20°C para uso posterior.

Teste Qualitativo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - Nested PCR

Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), segundo os princípios descritos por Mullis, K.B. *et al*, 1986 e Mullis, K.B. *et al*, 1987, utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Os primers foram desenhados a partir da região conservada 5'NCR do genoma do HCV (Smith, D.B. *et al*, 1995). A Figura 7 demonstra a região

5´NCR do vírus da hepatite C do protótipo HCJ1 e localização dos primers mais utilizados na literatura e a tabela 2 mostra os primers utilizados neste estudo.

REGIÃO NÃO-CODIFICANTE 5'(5'NCR)

LOCUS **HPCHCJ1** 9502 bp ss-RNA VRL 28-APR-1994
 DEFINITION Hepatitis C virus genomic RNA for polyprotein precursor, complete genome.
 ACCESSION D10749 NID g221586
 KEYWORDS polyprotein.
 SOURCE hepatitis C virus (individual_isolate HC-J1) cDNA to genomic RNA.
 ORGANISM Hepatitis C virus
 Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Flaviviridae; Hepatitis C-like viruses.
 REFERENCE 1 (sites)
 AUTHORS Okamoto,H., Okada,S., Sugiyama,Y., Yotsumoto,S., Tanaka,T.,
 Yoshizawa,H., Tsuda,F., Miyakawa,Y. and Mayumi,M.
 TITLE The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome
 JOURNAL Jpn. J. Exp. Med. 60, 167-177 (1990)
 MEDLINE 91013116

HC11 P32

-341 gccagccccctgatggggcgacactccac cat^{aga} gaatcac tcccctgtgaggaactactg
P33 KY80 SM3

-281 tcttttcacgcagaaagcgtct agccatggcgttatatgagtgcgtgcagcctccaggac

-221 ccccctcccgggagagccatagtgtctgcggaaccggtgagtacaccggaattgccag
P48

-161 gacgaccgggtcctttcttgatc^a aaccgcctcaatgcctggagatttggcgcgccccc
P36 KY78

-101 gcaagactgctagccgagtagtggggtcgcgaaaggccttgtgg tactgcctgatagg
HC18 Core

-41 gtgcttgcgagtgccccgggaggctctagaccgtgcacc ATGagcacc

ptc3= 5'AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG 3'
 NCR4 =5'ACTGCCTGATAGGGTGCTGGAGAGTG 3'

HC11(sense)/HC18(antisense) = 331 pb
P32(sense)/P36(antisense)= 220 pb
P33(sense)/P48 (antisense)= 145 pb
 KY80(sense)/KY78(antisense)= 244 pb (Amplicor)
 HC11/KY78= 300pb P32/KY78= 269pb P33/KY78= 249pb
 HC11/P36= 255pb P32/P48= 165pb P33/P36= 200pb
 HC11/P48= 191pb P33/HC18= 264pb SM2/HC18= 264pb
 SM2/P36= 186pb SM2/P48= 129pb SM2/KY78= 233pb

LEGENDA

tgtgg = Primer fita 5'

gcacc = Primer fita 3'

ggctctg = REGIÃO NCR SMITHS (GENOTIPAGEM)

i^{aga} = nucleotídeos presentes nos primers mas diferindo da sequência de HCV utilizada

OBS

SM2 = Primer 5'de maior conservação (Smiths, J. General Virology, 76, 1749-1761, 1995),
 Primer 2

FIGURA 7. Região 5'NCR do vírus da hepatite C do protótipo HCJ1, informações do GenBank e localização dos primers mais utilizados na literatura.

Tabela 2. Primers da região 5’NCR do genoma do HCV utilizados nos ensaios moleculares.

	Primer	Seqüência 5’ → 3’
HCV 5’NCR primers		
Nested PCR	P32 (sense/externo)	CTGTGAGGAACTACTGT
	P36 (antisense/externo)	AACACTACTCGGCTAGCAGT
	P48 (sense/interno)	GTTGATCCAAGAAAGGACCC
	P33 (antisense/Interno)	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG
PCR qualitativo	HC11 (sense)	GGCGACACTCCACCATAGATCACT
	HC18 (antisense)	GGTGCACGGTCTACGAGACCT

A reação de PCR “nested” utilizando primers da 5’NCR foi usada considerando-se que o limite de sensibilidade desta é de 1-10 cópias de HCV-RNA/mL (OKAMOTO, 1990). Wendel, S. *et al* (2007), padronizaram a reação de Nested PCR utilizando os pares de primers P32 (sense) / P36 (antisense) e P33 (sense) / P48 (antisense) e demonstraram que o limite de detecção foi de 100 UI/mL (“hit rate” de 99%-capacidade de detecção entre amostras sabidamente reativas).

A reação foi realizada montando-se um mix de volume final de 25ul contendo 2ul de Tampão de PCR 10x (Invitrogen® - Minus MgCl₂), 1,6ul de dNTP’s (2,5mM) (Invitrogen®), 1,4ul de MgCl₂ (50mM) (Invitrogen®), 0,5ul do Primer P32 (sense) (10uM), 0,5ul do primer P36 (antisense) (10uM) (invitrogen, Brasil) 0,25ul de Platinum Taq DNA Polimerase (5U/uL) (Invitrogen®), 1,5ul de glicerol (57%) (Invitrogen®), 1uL de Cresol red (2,5ug/uL), 11,25µL de H₂O deionizada e 5µL de cDNA. Esta mistura foi

submetida a condições de 95°C por 5 minutos para provocar desnaturação das fitas seguido de 35 ciclos nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e no fim a 72 °C por 7 minutos. Esta primeira etapa gerou produto amplificado de 220 pb.

Em seguida foi preparado outro mix contendo os mesmos volumes e proporções do mix anterior com a substituição pelo par de primers P33 (como sense) e P48 (como antisense) e o material template por 5µL do produto amplificado da reação anterior. O produto amplificado do nested PCR foi de 145 pb.

As análises foram realizadas no termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburgo, Alemanha.

Identificação dos produtos de PCR

O Produto amplificado foi identificado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose Ultrapure™ – Invitrogen Life Technologies) em TAE 1X (DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris- Acetato e 50mM EDTA) corado com Brometo de Etídio (0,35ul/mL). Para tal foram misturados 5ul do produto final de Nested PCR com 5µL do tampão de Azul de Bromofenol 2X.

Além das amostras foram também submetidos à corrida nos géis marcadores de pelo molecular de 100pb (Invitrogen®) como padrão.

Os géis foram digitalizados com uma câmera integrante de um sistema para captação e análise de imagens (Alpha Innotec/ AlphaEase FC).

Reação em cadeia da Polimerase - PCR qualitativo de produto para identificação dos genótipos do HCV por sequenciamento

As amostras que apresentaram presença de RNA no plasma foram submetidas a uma outra reação em cadeia da Polimerase – PCR que gera um produto amplificado de 331 pb ideal para análise dos genótipos do HCV através da técnica de sequenciamento.

A reação foi realizada montando-se uma mistura de volume final de 50ul contendo 4ul de Tampão de PCR 10x (Invitrogen® - Minus MgCl₂), 3,2μL de dNTP's (2,5mM) (Invitrogen®), 1μL do Primer HC11(sense) (10uM), 1μL do primer HC18 (antisense) (10uM) (Invitrogen, Brasil), 0,25uL de Taq DNA Polimerase (5U/uL) (enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,5 uL de Glicerol a 57%, 1 uL de Cresol (2,5ug/uL), 28,05μL de H₂O deionizada e 10μL de cDNA. Nesta mistura não foi acrescentado MgCl₂ considerando que no cDNA sintetizado já existe uma concentração final de 1mM de MgCl₂. Esta mistura foi submetida a condições de 95°C por 5 minutos para provocar desnaturação das fitas seguido de 40 ciclos nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e no fim a 72 °C por 7 minutos.

As análises foram realizadas no termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient, Hanburg, Germany. Foi corrido um gel de agarose como descrito anteriormente a fim de identificar a presença dos amplicons

correspondentes a fim de planejar as etapas posteriores para o sequenciamento dos produtos.

Na tentativa de obtenção de amplicon de fragmento da região 5'NCR que possa ser utilizado para sequenciamento e genotipagem realizou-se uma reação de nested PCR a partir do amplicon do 1º round do PCR utilizando-se os primers HC 11 e HC 18, com o uso dos primers P32 e P36 no 2º round.

Purificação dos produtos amplificados

A purificação dos produtos amplificados foi feita com a utilização de colunas do Kit Microcon Centrifugal Filter Devices® (Milipore). Para cada produto de PCR foi utilizada uma coluna sobre um tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 300µL de H₂O MiliQ ultrapura no topo da coluna sem tocar a membrana; posteriormente foram adicionados todo volume do produto de PCR (cerca de 50 uL) no centro da coluna sem tocá-la; As colunas foram centrifugadas por 15 minutos a 550 x g, a temperatura ambiente. Em seguida as colunas foram invertidas sobre outro tubo de 1,5 ml limpo e estéril e foram adicionados 35µL de água MiliQ no centro da coluna e a mesma foi novamente centrifugada por 5 minutos a 650 x g.

Semiquantificação dos produtos purificados

Após purificação foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (Ultrapure™ Invitrogen®) contendo 0,5 µL/mL de brometo de etídio em tampão TAE 1X (50X - Invitrogen®) para favorecer uma semiquantificação do produto amplificado para posterior sequenciamento, utilizando como marcador 4µL do marcador Low Mass Ladder (Gibco®).

Para tal, foram aplicados 5µL do tampão de corrida (Loading Buffer 2x- Invitrogen®) e 5µL do produto amplificado e purificado aplicando-se a mistura de 10µL no gel de agarose. Esta etapa de semiquantificação permite uma comparação visual da intensidade das bandas da amostra com o marcador. Desta forma, foi possível a semiquantificação do produto amplificado de modo a permitir o uso de aproximadamente 100 ng do material na reação de sequenciamento.

Reação de sequenciamento e purificação do produto

Baseando-se na semiquantificação descrita anteriormente, cerca de 100ng de produto amplificado foi adicionado a um microtubo com 3,2 pmoles do primer HC11 (sense), 2µL de Mix ABI PRISM Big Dye Terminator ready reaction (Applied Biosystem Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA), 4,4µL de Save Money (Tris-HCl 200 mM (pH 9,0) e 5mM de MgCl₂). A extensão enzimática foi realizada em termociclador Eppendorf durante 25 ciclos de 96°C por 10 segundos para denaturação do DNA molde, 50°C por

10 segundos, para anelamento do primer e 60°C por 4 minutos para extensão.

O produto foi novamente purificado visando a remoção de excesso de dideoxynucleotídeos “terminadores” presentes na reação, através do método de precipitação. Para tal, adicionou-se 80µL de isopropanol (75%) à reação de sequenciamento, incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente (protegido da luz) e foi realizada centrifugação entre 15.000 e 20.000 x g por 20 minutos. Então, foi descartado o sobrenadante por aspiração, seguido de lavagem com 160µL de etanol a 80%, seguido de agitação em vortex por 15 segundos, centrifugação por 5 minutos (20.000 g), e aspiração do sobrenadante. Após secagem do pellet a 45 °C por 10 minutos as amostras foram ressuspensas utilizado-se 4µL de loading buffer (Applied Biosystem Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA).

Sequenciamento

Foi montado o gel de eletroforese utilizando-se o Kit Long Ranger Acrilamide® (CAMBREX Bio Science Rockland Inc. ME- USA) segundo recomendações do fabricante .

A eletroforese do gel de acrilamida foi realizada no seqüenciador ABI PRISM TM 377 Applied Biosystems Incorporation, Foster City, California, EUA.

No momento anterior a aplicação no gel foi feita denaturação da amostra a 95°C por 2 minutos e as amostras foram mantidas em gelo para

em seguida serem aplicados 2 μ L de cada amostra no gel de sequenciamento.

O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o software ABI 377-96 collection v. 2.6.

Análise de seqüências

A genotipagem foi feita através da edição e alinhamento das seqüências das regiões 5'NCR, utilizando o programa Sequence Navigator v.3.4 (Applied Biosystems), em conjunto com as seqüências padrão obtidas do GenBank, verificando os genótipos de cada amostra através do acesso on-line para consulta ao banco de dados do Los Alamos National Laboratory nos Estados Unidos conforme descrito por Kuiken, C *et al*, 2006. As análises das seqüências foram realizadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP.

Determinação da carga viral

A determinação da carga viral foi realizada através da técnica de amplificação de ácidos nucleicos através do kit Amplicor HCV MonitorTM Test (Roche) v.2.0.

Este ensaio baseia-se em cinco processos principais: extração do RNA e preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo usando

iniciadores específicos complementares do HCV; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo; e detecção dos produtos amplificados fixos à sonda por determinação colorimétrica.

Esta metodologia baseada em PCR permite a determinação precisa da carga viral presente no soro/plasma, pela inclusão de um controle, um RNA artificial, contendo as mesmas regiões de ligação dos primers ao HCV-RNA, mas com outra seqüência nucleotídica entre os primers. Os produtos de RT-PCR foram hibridizados com uma sonda interna imobilizada em placa de 96 poços. Os primers foram marcados com molécula de biotina, o que permitiu a posterior detecção e leitura por sistema enzimático como os utilizados nas reações sorológicas rotineiras. A relação entre as leituras óticas derivadas do HCV-RNA e do controle, cujo número de cópias incluído na reação é conhecido, permite estimar a carga viral da amostra. De acordo com o fabricante, o limite inferior deste método é de 600 UI/mL e o superior de 850.000 UI/mL.

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Hepatites do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP.

Controle de contaminação

O controle da contaminação por produtos de PCR (“amplicons”) foi realizado através de estratégias de controle de separação. Separação das três etapas da reação: extração (sala 1), transcrição reversa e preparo da reação PCR (sala 2) e amplificação e detecção (sala 3), em três salas distintas com material dedicado para cada sala. Além disso, foi observado o fluxo de circulação de pessoal respeitando não retornar às salas de extração

(Sala 1) e sala de preparação de reação de PCR (sala 2) após ter entrado na sala de amplificação e detecção (Sala 3).

Também foi utilizada irradiação com luz ultra violeta sobre as bancadas utilizadas nas fases de preparo de reação de PCR e manipulação de amplicons. O uso de hipoclorito de sódio 10% sobre as bancadas, maçanetas termocicladores e outros objetos também foi regularmente praticado.

Análise e tratamento dos dados

Os dados obtidos foram armazenados em um banco de dados do programa Epi-info versão 3.3 (CDC,2000) que também foi usado como ferramenta para as análises estatísticas assim como o software Estatístico Minitab versão 14.0. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas de frequência, sendo que análise das variáveis quantitativas idade, Densidade óptica (DO) e “cut-off” (CO), devido a rejeição da hipótese de normalidade, utilizou-se a mediana como estimativa do valor central dos dados e o 1º e 3º quartil na análise da variação.

A análise das prevalências de reatividade ao anti-HCV, Imunoblot (RIBA) e presença de RNA viral foi calculada de forma ajustada levando-se em consideração a proporção encontrada na amostra estudada e fazendo-se o ajuste de proporcionalidade sobre o total de doadores com sorologia reativa no período do estudo em relação a população de doadores no período.

Na análise da correlação da razão DO/Cut-off para os diferentes resultados do Elisa, utilizou-se o coeficiente de correlação de *Spearman*, devido à rejeição da hipótese de normalidade dos dados.

No cálculo da prevalência observada e ajustada, além do valor pontual, calcularam-se os intervalos de confiança ao nível de 95% (IC95%).

Na comparação das variáveis quantitativas em relação às categóricas, devido à rejeição da hipótese de normalidade, foi utilizado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, quando comparada a mediana de apenas dois grupos e o teste de *Kruskal-Wallis* para comparação de mais de duas medianas. Já na análise de duas variáveis categóricas, utilizou-se o odds ratio (OR) para medir a razão de chance e o teste do qui-quadrado de *Pearson*. Na impossibilidade da aplicação do teste de *Pearson*, utilizou-se o teste com correção de *Yates* (VIEIRA, 2004; BERQUO, 1980).

Apoio financeiro

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM - através do Programa de Desenvolvimento Científico Regional em parceria com o CNPq. Além disso, contou com contrapartida financeira da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM e não financeira através de aporte de alguns insumos do laboratório de Virologia e do Laboratório de Hepatites – LIM47 do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT-SP.

Aspectos Éticos

Este projeto é parte de um projeto mais amplo intitulado “Caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados pelo vírus da Hepatite C”. Desta forma, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Fundação HEMOAM em 15 de Julho de 2005 com número de protocolo CAAE-0003/2005 (Anexo E) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 13 de Setembro de 2006 com número de Protocolo 766/06 (Anexo F).

RESULTADOS

Durante o período de estudo (Setembro de 2005 a abril de 2007), na Fundação HEMOAM houve registro de 82.851 doações de sangue. Destas, 71.391 (86,16 %) foram doações na cidade de Manaus e 11.460 (13,84 %) nos municípios do interior do Estado do Amazonas (Núcleo de Estatística da Fundação HEMOAM – Sistema de Acompanhamento de Doadores – SAD). Quando foi feita análise do registro de doadores no período do estudo (considerando que muitas doações são referentes a doadores de repetição), observou-se o registro de 50.836 doadores no Estado do Amazonas, sendo 44.194 da capital e 6.642 do interior.

Foram registrados 306 doadores com sorologia reativa para anti-HCV no período do estudo o que determinou um índice de descarte sorológico por marcador para Hepatite C de 0,37% (306/82.851). Destes doadores, 261 foram da capital e 45 do interior. Entre os doadores da capital o índice de descarte sorológico foi de 0,36% (261/71.391) e entre os doadores do interior de 0,39% (45/11.460). Na comparação dos grupos observou-se que não há diferença estatística entre eles ($p= 0,654$).

Entre os doadores incluídos no estudo, 57,5% foram doadores de primeira vez e 42,5% foram doadores de repetição.

Todos os doadores com sorologia reativa para anti-HCV foram selecionados para inclusão no estudo. No entanto, mesmo com busca ativa, foi possível abordar e convidar a participar do estudo 154 doadores de sangue, sendo 142 (92,2 %) da capital e 12 (7,8 %) do interior do Estado do

Amazonas com sorologia reativa para anti-HCV na triagem sorológica de doadores. Ao realizar a abordagem ao doador não houve situação de recusa para a participação do estudo.

Foi realizada análise das características demográficas da população de doadores reativos para anti-HCV no período do estudo (306 doadores) e a amostragem efetivamente incluída no estudo (154 doadores) a fim de avaliar se há proporcionalidade. Foi observado que na população total de doadores soropositivos para anti-HCV a frequência do sexo feminino foi de 33,9% e do sexo masculino foi de 66,1% e na população estudada foi de 34,4% e 65,6% respectivamente. A mediana de idade da população total de doadores soropositivos para anti-HCV foi de 32 anos e na população estudada foi de 31 anos.

Após consentimento livre e esclarecido, foram coletadas amostras para realização de novos testes de triagem sorológica, para análises moleculares, conforme previsto no protocolo do estudo.

Foi realizada a análise da sororreatividade para anti-HCV na nova amostra dos doadores incluídos no estudo conforme a classificação se o doador era de primeira vez ou doador de repetição. Observou-se que 81,8% dos doadores de primeira vez foram reativos na nova amostra, enquanto que apenas 53,8% dos doadores de repetição foram reativos no ELISA da nova amostra e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$ - Qui-quadrado de Pearson).

A frequência de reatividade nos diferentes ensaios para detecção da infecção em doadores de sangue no período do estudo foi calculada de forma ajustada considerando-se o total de reatividade por anti-HCV entre os

doadores no período, o total de doações, e o total de indivíduos efetivamente incluídos e analisados neste estudo. Desta forma, estabeleceu-se a proporcionalidade estimada (Tabela 3).

Tabela 3. Prevalência de reatividade para HCV nos diferentes ensaios de amostras de doadores de sangue da Fundação HEMOAM, Manaus-AM.

Condição de reatividade	Frequência de reatividade		
	f_i	(%)	IC 95(%)
Sororeatividade no ELISA na triagem sorológica	306/82.851	(0,37)	0,33 – 0,41
Sororeatividade ajustada* no ELISA da nova amostra	215/82.851	(0,26)	0,23 – 0,30
Reatividade ajustada* de amostras ELISA +/RIBA+	95/82.851	(0,11)	0,09 – 0,14
Reatividade ajustada* de amostras ELISA+/PCR+	121/82.851	(0,15)	0,12 – 0,18

* Foi calculada considerando-se o total de reatividade por anti-HCV entre as doações no período, o total de doações, e o total de indivíduos efetivamente incluídos e analisados neste estudo. Desta forma, estabeleceu-se a proporcionalidade estimada.

A distribuição da frequência da reatividade das amostras estudadas no teste ELISA da triagem sorológica dos doadores e da nova amostra pode ser observada na tabela 4.

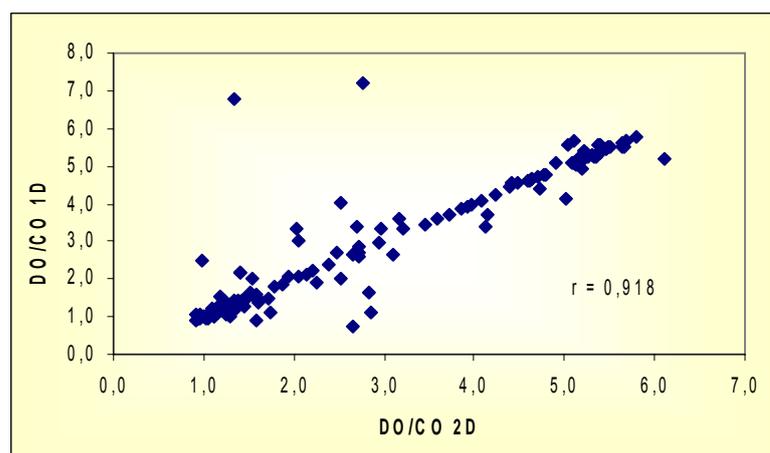
Tabela 4. Avaliação comparativa da reatividade para ELISA nas amostras de triagem sorológica e da nova amostra de doadores soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Teste (n = 154)	(+)	(-)	Ind.
	f _i (%)	f _i (%)	f _i (%)
ELISA Doação (1 ^a análise)	138 (89,6)	-	16 (10,4)
ELISA Doação (Repetição)	140 (90,9)	-	14 (9,1)
ELISA Nova amostra (1 ^a análise)	107 (69,5)	38 (24,7)	9 (5,8)
ELISA Nova amostra (Repetição)	108 (70,1)	38 (24,7)	8 (5,2)

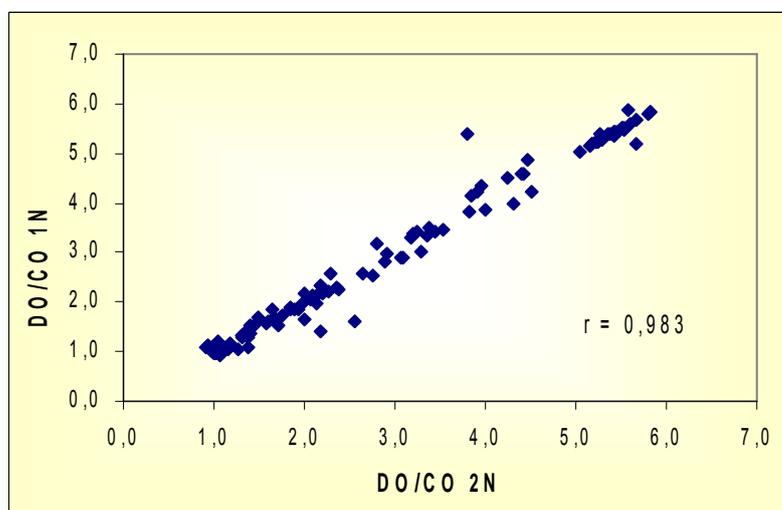
A correlação entre a razão da densidade ótica e o “cut-off” (DO/CO) da 1^a análise da amostra da triagem sorológica (DO/CO1D) e da repetição (DO/CO2D) foi calculada e o coeficiente de correlação de Spearman (r) calculado foi de 0,918. A correlação entre a razão da densidade ótica e o “cut-off” (DO/CO) da 1^a análise da nova amostra (DO/CO1N) e da repetição (DO/CO2N) foi calculada e o coeficiente de correlação de Spearman (r) calculado foi de 0,983. A distribuição destas correlações podem ser observadas na figura 8.

Figura 8. Correlação entre a Razão da Densidade Ótica (DO) e “cut-off” (CO) das análises das amostras da triagem sorológica (D=doação) (a) e dos ensaios com nova amostra (N=Nova amostra) (b) dos doadores de sangue soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM- Manaus, AM.

(a)



(b)



Observou-se forte correlação entre a 1ª análise e a repetição dos ensaios ELISA tanto realizados nas amostras da doação (triagem sorológica) quanto nas novas amostras. A mediana observada, o Intervalo de Confiança, o valores dos 1º e 3º quartis, o valor do Coeficiente de Correlação de Spearman e o valor de p podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Mediana e correlação da razão DO/CO para os testes ELISAS de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

	Mediana*	IC95%	Q1/Q3	r**	p
ELISA Doação (1ª análise)	2,20	1,63 – 3,20	1,21/4,75	0,918	<0,001
ELISA Doação (repetição)	2,23	1,58 – 2,74	1,24/4,72		
ELISA Nova amostra (1ª análise)	2,44	1,98 – 3,36	1,40/5,18	0,983	<0,001
ELISA Nova amostra (repetição)	2,47	2,08 – 3,25	1,40/5,13		

* A mediana foi utilizada devido a não-normalidade dos dados ao nível de 5%.

** Teste não-paramétrico de *Spearman*

O coeficiente de correlação de Pearson (r) da razão da Densidade óptica (DO) e o “cut-off” (CO) entre as análises com a amostra da doação foi de 0,924 e entre as análises com a nova amostra foi de 0,991. Estes dados demonstram forte correlação entre a 1ª análise e a repetição dos referidos ensaios.

A figura 9 mostra os BoxPlots indicando a distribuição assimétrica positiva da razão DO/CO da 1ª análise e da repetição das amostras da doação e da nova amostra dos doadores soropositivos para anti-HCV.

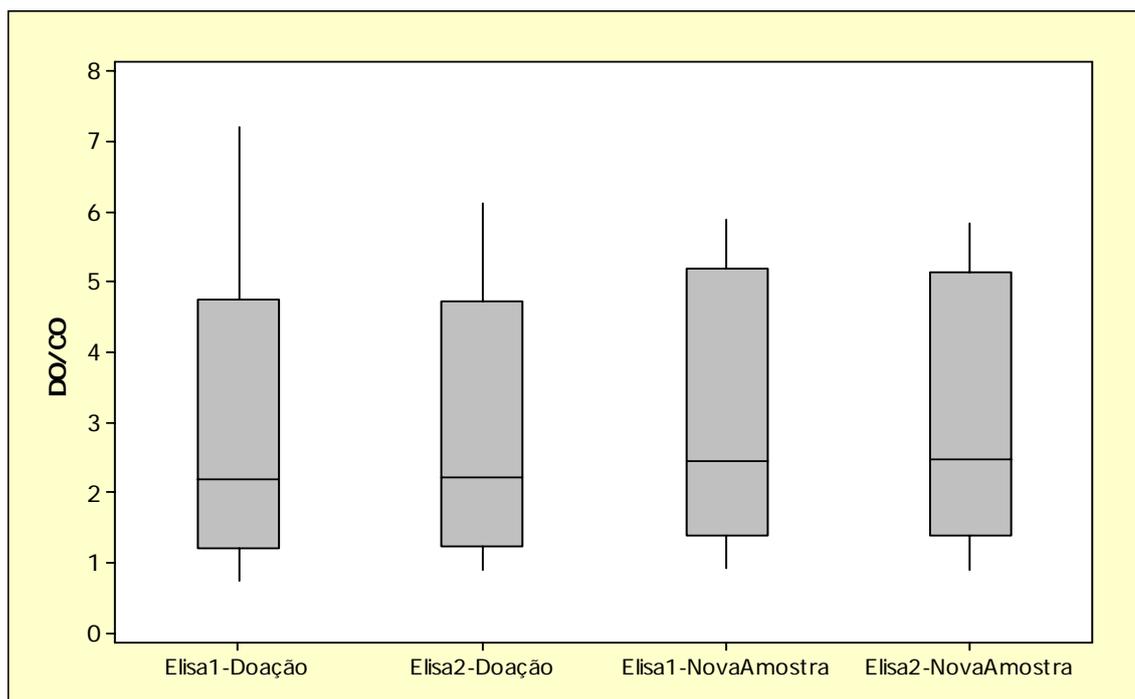


Figura 9. Box plot da razão DO/CO dos testes ELISA na amostra da doação e na nova amostra de doadores soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Como de rotina executada pela Fundação HEMOAM, as amostras repetidamente reativas (razão DO/CO acima de um) ou indeterminadas (razão DO/CO abaixo de um) no teste ELISA foram submetidas ao teste Imunoblot. Portanto, foi realizado imunoblot das 107 amostras reativas e 9 indeterminadas no teste ELISA.

Foi realizada análise das amostras com razão DO/CO acima de um (113 amostras) e a distribuição da frequência da razão da Densidade óptica e do “cut-off” da 1ª análise da nova amostra (DO/CO1N) em relação ao resultado do Imunoblot (RIBA) e ao Nested PCR pode ser observada na tabela 6.

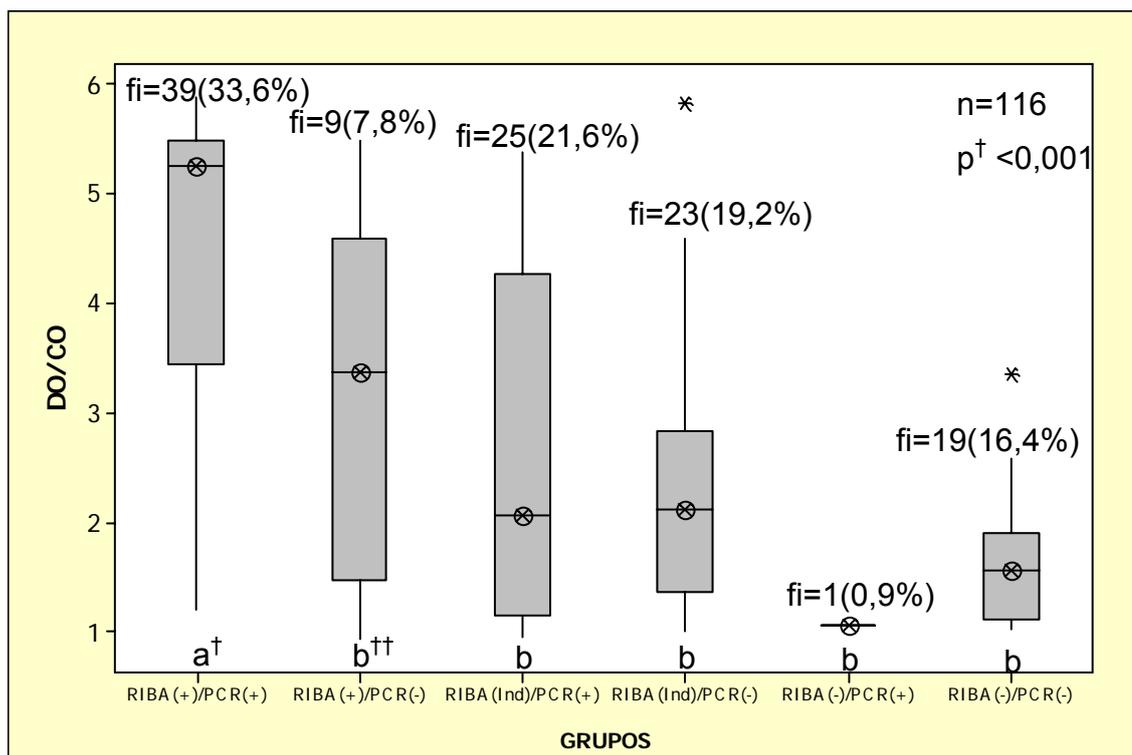
Tabela 6. Distribuição da razão DO/CO do ELISA da Nova amostra em relação ao resultado do Imunoblot (RIBA) e Nested PCR de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

ELISA Nova amostra [†]	PCR		RIBA			PCR(+) RIBA	
	DO/CO* (n)	Pos.(%)	Neg.(%)	Pos.(%)	Neg.(%)	Ind.(%)	Pos.(%)
1 --- 2 (45)	15(33,3)	30(66,7)	7(14,6)	17(37,8)	21(46,7)	4(8,9)	10(22,2)
2 --- 3 (17)	7(41,2)	10(58,8)	4(23,5)	2(11,8)	11(64,7)	4(23,5)	3(17,6)
3 --- 4 (12)	7(58,3)	5(41,7)	7(58,3)	1(8,3)	4(33,3)	4(33,3)	3(25,0)
4 --- 5 (8)	6(75,0)	2(25,0)	1(12,5)	-	7(87,5)	1(12,5)	5(62,5)
5 --- 6 (31)	28(90,3)	3(9,7)	28(90,3)	-	3(9,7)	26(83,9)	2(6,4)
Total (113)	63(55,8)	50(44,2)	47(41,6)	20(17,7)	46(40,7)	39(34,5)	23(20,4)

[†] 1ª análise

* Razão entre Densidade ótica e "cut-off"

Foi realizada a análise das diferenças entre os grupos das condições de reatividade no RIBA e no Nested PCR e a Razão DO/CO do ELISA da Nova amostra, sendo mostradas através de gráfico de box plot (Figura 10).



†† Letras distintas (a/b) indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

† Teste de Kruskal-Wallis

Obs. O teste para comparação dois a dois foi o de Mann-Whitney.

Figura 10. Box plot das diferenças entre os grupos de acordo com as condições de reatividade no RIBA e no Nested PCR e a Razão DO/CO do ELISA da Nova amostra de doadores soropositivos para anti- HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM. Os valores encontrados nos grupos de RIBA Indeterminado e PCR positivo e RIBA negativo e PCR negativo que estão fora dos “boxes” não são considerados “out-lines”, são pontos de valores que estão fora do intervalo interquartil, mas dentro dos valores da normalidade

Observou-se diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% entre as medianas da razão DO/CO no ELISA do primeiro grupo (RIBA(+)/PCR(+)) e os demais grupos ($p < 0,001$).

A análise do padrão de reatividade de anticorpos contra peptídeos específicos do HCV foi feita pela observação da presença de bandas no teste RIBA entre os diferentes grupos de positividade do Imunoblot e no Nested PCR e está demonstrada na tabela 7. Noventa casos foram incluídos nesta análise por apresentarem dados completos relacionados às bandas do RIBA.

Tabela 7. Reatividade no Imunoblot (RIBA) e Nested PCR em relação à frequência das bandas no Imunoblot de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Grupos (n = 90)	RIBA				Total
	Reatividade contra peptídeos do HCV				
	NS5 (%)	c100 (%)	c33 (%)	c22p (%)	
RIBA(+) / PCR (+)	26 (68,4)	34 (89,5)	37 (97,4)	35 (92,1)	38
RIBA(+) / PCR (-)	3 (37,5)	6 (75,0)	8 (100,0)	5 (62,5)	8
RIBA(Ind) / PCR(+)	4 (16,7)	5 (20,8)	12 (50,0)	5 (20,8)	24
RIBA(Ind) / PCR(-)	7 (35,0)	4 (20,0)	13 (65,0)	6 (30,0)	20
Total	40 (44,4)	49 (54,4)	70 (77,8)	51 (56,7)	90

Entre as amostra reativas no ELISA da nova amostra, observou-se que 55,8% apresentaram presença de RNA viral pela reatividade no Nested PCR (Tabela 6). As análises descritivas das variáveis demográficas e a procedência dos doadores foram realizadas segundo a reatividade no Nested PCR. Na análise foi levada em consideração e hipótese de que a maior idade é fator de risco para a infecção conforme descrito na literatura

(Ciorlia, L.A.S e Zanetta, D.M.T, 2007). As freqüências estão demonstradas através de “base line” na tabela 8.

Tabela 8. Distribuição das variáveis demográficas e procedência em relação ao Nested PCR dos doadores de sangue soropositivos para anti-HCV da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Variáveis	Nested PCR		Total	OR	p*
	Positivo (n=65) f _i (%)	Negativo (n = 51) f _i (%)			
Gênero					
Masculino	24 (55,8)	19 (44,2)	43	0,99	0,875
Feminino	41 (56,2)	32 (43,8)	73		
Idade					
65 --- 55	6 (85,7)	1 (14,3)	7	5,08	0,215
55 --- 45	16 (88,9)	2 (11,1)	18	8,19	<0,001
45 --- 35	15 (57,7)	11 (42,3)	26	3,49	0,003
35 --- 25	16 (42,1)	22 (57,9)	38	1,84	0,244
25 --- 18	12 (44,4)	15 (55,6)	27		
Mediana	39	31			
25%/75%	27/47	23/37			
Procedência					
Capital	60 (55,6)	48 (44,4)	108	0,75	0,989
Interior	5 (62,5)	3 (37,5)	8		
Doador					
Primeira vez	50 (66,6)	25 (33,4)	75	3,40	0,004
Repetição	15 (36,6)	26 (63,4)	41		

* Teste do qui-quadrado com correção de Yates.

Todas as amostras que apresentaram ELISA da nova amostra reativo e que apresentaram Imunoblot reativo ou indeterminado (97 amostras) foram submetidas ao teste PCR quantitativo para detecção de carga viral. No entanto, o RNA viral foi detectável em 33 amostras nas quais foi possível mensurar a carga viral.

A distribuição dos cortes da razão da Densidade ótica e do “cut-off” (DO/CO) da 1ª análise da nova amostra de amostras com RIBA reativo ou indeterminado foi analisada em relação à positividade no PCR quantitativo e está demonstrada na tabela 9.

Tabela 9. Distribuição razão DO/CO da 1ª análise do ELISA da Nova amostra em relação à detecção ou não da carga viral de doadores da Fundação HEMOAM -Manaus, AM.

ELISA Nova amostra DO/CO	PCR Quantitativo		Total
	Detectável (n=33) f _i (%)	Não detectável (n = 57) f _i (%)	
1 --- 2	1 (3,0)	27 (47,3)	28
2 --- 3	2 (6,1)	13 (22,8)	15
3 --- 4	4 (12,1)	7 (12,3)	11
4 --- 5	2 (6,1)	3 (5,3)	5
5 --- 6	24 (72,7)	7 (12,3)	31
Mediana*	5,29	1,91	
25%/75%	4,86/5,49	1,34/3,43	

* p < 0,001 (Teste de Mann-Whitney)

Obs: nível de detecção do PCR qualitativo: 600 UI/mL.

A análise da frequência de RNA plasmático detectável através do Nested PCR foi avaliada frente aos resultados do teste de quantificação da carga viral e pode ser observada na tabela 10.

Tabela 10. Distribuição da reatividade no Nested PCR e no PCR Quantitativo de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

Nested PCR	PCR Quantitativo		Total
	Detectável (n=33)	Indetectável (n = 63)	
	f _i (%)	f _i (%)	
Reativo	33 (51,6)	31(48,4)	64
Não reativo	-	33(100,0)	33
Total	33 (34,0)	64 (66,0)	97

A carga viral das amostras com RNA viral detectável pelo ensaio quantitativo foi calculada e está demonstrada na descrição de casos nas tabelas 17 e 18.

Para análise da frequência dos casos presumidos de “clearance” do RNA viral plasmático dos doadores de sangue com sorologia reativa para anti-HCV (ELISA repetidamente reativo) e Imunoblot reativo foi feita análise utilizando-se o Nested PCR. A distribuição da reatividade do RIBA e o Nested PCR pode ser observada na tabela 11.

Tabela 11. Distribuição da reatividade no RIBA e no Nested PCR de doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.

RIBA	Nested PCR		Total
	Reativo (n=65) f _i (%)	Não reativo (n = 51) f _i (%)	
	Reativo	39 (81,3)	
Não reativo	1 (5,0)	19 (95,0)	20
Indeterminado	25 (52,1)	23 (47,9)	48
Total	65 (56,0)	51 (44,0)	116*

* Inclui 3 amostras com razão DO/CO menor que 1 = ELISA indeterminado

Observou-se 9 (18,8%) doadores com Imunoblot reativo entre os que apresentaram Nested PCR não reativo. Portanto, podem ser casos presumidos de ocorrência de “clearance” plasmático do vírus da Hepatite C o que corresponde a 18,8% (9/48) dos indivíduos com RIBA. Estes doadores foram analisados individualmente e os casos estão descritos na tabela 15.

Foram observados 23 doadores com Imunoblot indeterminado e Nested PCR não reativos, portanto considerados não virêmicos. A descrição destes casos está mostrada através da tabela 16.

A análise comparativa das variáveis demográficas dos doadores clareadores (RIBA reativo e PCR Nested Negativo) e não clareadores e entre os com Imunoblot indeterminado virêmicos e não virêmicos foi realizada e não foi observada diferença entre os grupos (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12. Análise das variáveis demográficas dos doadores com RIBA reativo e a condição de clareadores e não clareadores.

Variáveis	Presença do RNA Viral		Total	p*
	Clareadores (n=9)	Não Clareadores (n = 39)		
	f _i (%)	f _i (%)		
Gênero				
Masculino	6 (21,4)	22 (78,6)	28	0,851
Feminino	3 (15,0)	17 (85,0)	20	
Idade				
Mediana [†]	35	41		0,081 [†]
25%75%	28/39	37/50		

* Teste do qui-quadrado com correção de Yates.

† Teste de Mann-Whitney

Tabela 13. Análise das variáveis demográficas dos doadores com RIBA indeterminado e a condição de virêmicos e não virêmicos.

Variáveis	Presença do RNA Viral		Total	p*
	Não virêmicos (n=25) f _i (%)	Virêmicos (n = 23) f _i (%)		
Gênero				
Masculino	19 (76)	12 (52,2)	31	0,154
Feminino	6 (24)	11 (47,8)	17	
Idade				
Mediana [†]	31	27		0,605 [†]
25%75%	24/34	22/39		

* Teste do qui-quadrado com correção de Yates.

† Teste de Mann-Whitney

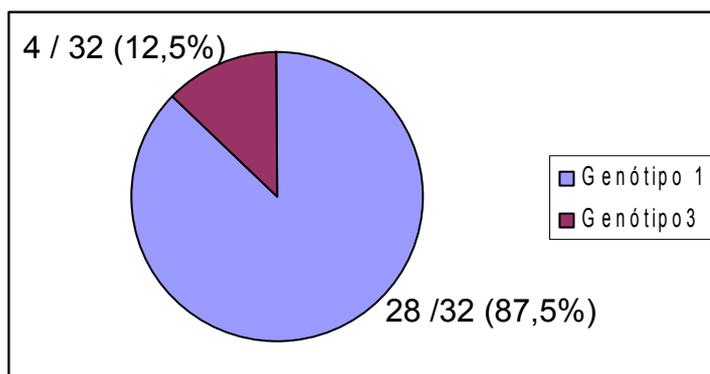
Na tabela 12 observa-se a ocorrência de 39 casos de indivíduos com RIBA reativo e PCR reativo e 25 casos de indivíduos com RIBA Indeterminado e PCR reativo. Estes casos foram avaliados conforme a procedência, razão DO/CO da nova amostra, reatividade no RIBA, descrição de bandas do RIBA, carga viral, reatividade no PCR qualitativo usando os primers HC11/HC18 e genótipo encontrado. Os dados estão descritos nas tabelas 17 e 18.

A presença de RNA do vírus da Hepatite C foi testada em todas as amostras com imunoblot reativo e indeterminado, utilizando o par de primers HC11 e HC18 que permite a obtenção de amplicon de 331 pares de bases,

seqüência esta, que após sequenciamento, permite a genotipagem do vírus. Foi observado um caso de indivíduo com RIBA não reativo com PCR reativo. A descrição do caso está descrita na tabela 19.

A distribuição da freqüência dos genótipos observada na amostra avaliada foi de 12,5% do genótipo 3 e 87,5% do genótipo 1. A distribuição da freqüência dos genótipos do HCV detectados na amostra estudada está demonstrada na figura 11. E a distribuição geográfica dos genótipos encontrados na figura 12.

Figura 11. Distribuição dos genótipos do HCV detectados em doadores de sangue da Fundação HEMOAM – Manaus, AM.



Entre os indivíduos com Nested PCR (65) reativo foi possível a genotipagem de 32 casos (49,2%). Trinta e três (33) casos (50,8%) não apresentaram reatividade no PCR qualitativo utilizando o par de primers HC 11/18. Portanto, não foi possível realizar a genotipagem, apesar da tentativa de realizar um Nested PCR utilizando no 1º round os primers HC 11 e HC 18 e no 2º round os primers P32 e P36.

O perfil de reatividade do teste ELISA (Razão DO/CO) entre os casos infectados pelo genótipo 1 e genótipo 3 não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,824$ - Teste de Mann-Whitney). Entre os 32 doadores com genótipo determinado 29 (90,6%) apresentam RIBA reativo e 3 (9,4%) RIBA indeterminado.

A análise da distribuição dos genótipos encontrados em relação ao perfil da carga viral foi realizada e está demonstrada na tabela 14. Não foi

observada diferença estatística na análise de genótipos e cargas virais ($p=0,159$).

Tabela 14. Distribuição da frequência dos diferentes cortes para a carga viral em relação ao resultado da genotipagem.

Carga viral (UI/mL)	Genótipo				Total
	1 (n = 27)		3 (n = 4)		
	f_i	%	f_i	%	
Indetectável	3	10,7	-	-	3
600 -- 10.000	2	7,1	-	-	2
>10.000 --- 850.000	16	57,1	1	25,0	17
>850.000	7	25,0	3	75,0	10
Total	28	87,5	4	12,5	32

$p = 0,159$ (Teste Exato de Fisher).



www.guianet.com.br/am/mapaam.gif

Figura 12. Distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite C em doadores de sangue no Estado do Amazonas. G1= Genótipo 1; G3= Genótipo 3

Tabela 15. Descrição de casos presumidos de “clearance” plasmático do RNA viral de doadores com RIBA Reativo *.

Código	Gênero [†]	Idade	Doação	ELISA Nova amostra [†]	DO/CO Nova amostra	Bandas do RIBA				
						C100	C33c	C22	NS5	HSOD
9	M	39	Repetição	R	5,485	4 +	4 +	4 +	4 +	-
22	M	42	1ª Vez	R	1,531	3 +	2 +	3 +	1 +	-
25	M	28	Repetição	R	1,409	-	3 +	-	3 +	+/-
38	M	28	1ª Vez	R	3,993	+/-	1 +	3 +	-	-
51	F	37	1ª Vez	R	5,183	2+	3 +	4 +	-	-
128	M	35	Repetição	R	1,531	-	1 +	1+	-	-
146	F	24	1ª Vez	R	3,432	1 +	4 +	-	-	-
149	M	58	Repetição	R	3,362	3 +	4 +	4 +	-	+/-

* Os dados das bandas do RIBA de um doador não foram obtidos.

[†] M= Masculino; F= Feminino; R= Reativo

Tabela 16. Descrição de casos de doadores com RIBA Indeterminado e ausência de viremia*.

Código	Gênero [†]	Idade	Doação	ELISA Nova amostra [†]	DO/CO Nova amostra	Bandas do RIBA				
						C100	C33c	C22	NS5	HSOD
1	F	22	1ª Vez	R	2,184	-	2+	-	-	-
3	M	42	1ª Vez	R	3,863	-	1+	-	-	-
6	M	32	1ª Vez	R	5,831	-	4+	-	-	-
8	M	19	1ª Vez	R	1,962	-	-	-	+/-	-
11	F	31	1ª Vez	R	2,897	+/-	+/-	+/-	+/-	-
13	M	33	Repetição	R	1,355	+/-	-	-	-	-
15	M	34	1ª Vez	R	4,597	+/-	1+	-	+/-	-
18	M	24	Repetição	R	1,073	-	-	+/-	-	-
29	M	38	1ª Vez	R	2,171	-	-	3+	-	-
32	F	22	1ª Vez	R	2,558	-	+/-	-	+/-	+/-
34	M	28	1ª Vez	R	2,243	-	-	+/-	-	-
36	F	33	1ª Vez	R	1,098	-	-	-	+/-	-
40	M	39	Repetição	R	1,842	+/-	+/-	4	-	-
50	F	33	Repetição	R	1,623	-	-	-	+/-	-
55	F	53	1ª Vez	R	4,136	-	+/-	3+	-	+/-
57	F	31	Repetição	R	2,827	-	3+	-	+/-	-
68	M	22	Repetição	R	2,115	-	1+	-	-	-
91	F	26	Repetição	R	1,36	-	2+	-	-	-
94	M	31	Repetição	Indeterm	1,006	-	1+	-	-	-
139	F	23	1ª Vez	R	1,339	-	1+	-	-	-

* Três casos não foram descritos por falta de dados das bandas do RIBA; [†] M= Masculino; F= Feminino; R= Reativo

Tabela 17. Descrição de casos de doadores RIBA reativo da Fundação HEMOAM com Nested PCR reativo. Manaus, AM.
(*N.A = Nova amostra)

Cód	Gênero/ Idade	Proced	Doação	DO/CO N.A*	PCR quali HC11/ HC18	Carga Viral		Genótipo	Bandas do RIBA				
						UI/mL	Cóp/mL		C100	C33c	C22	NS5	HSOD
7	M/52	Manaus	Repetição	5,831	R	216.631	584.907	1	4+	4+	4+	-	-
14	M/32	Manaus	1ª Vez	5,405	R	288.314	778.447	1	4+	4+	4+	4+	+/-
16	M/62	Manaus	1ª Vez	5,525	R	133.368	354.692	1	4+	4+	4+	4+	-
24	F/29	Manaus	1ª Vez	5,891	R	576.981	1.557.848	1	+/-	3+	3+	3+	-
39	F/48	Manaus	1ª Vez	5,378	R	282.857	763.714	3	4+	+/-	4+	-	-
45	F/38	Manaus	1ª Vez	5,355	R	>850.000	>2.295.000	3	4+	+/-	4+	+/-	-
47	F/40	Manaus	1ª Vez	5,51	R	>850.000	>2.295.000	3	4+	4+	4+	+/-	-
48	F/33	Manaus	1ª Vez	5,511	NR	Indetect	Indetect	-	1+	2	4+	+/-	-
49	F/45	Manaus	Repetição	1,337	NR	Indetect	Indetect	-	1+	3+	1+	-	-
58	F/62	Manaus	Repetição	1,203	NR	Indetect	Indetect	-	-	3+	-	1+	-
62	M/62	Manaus	1ª Vez	5,256	R	>850.000	>2.295.000	3	3+	2+	4+	-	-
64	F/43	Manaus	1ª Vez	5,236	R	302.393	816.462	1	1+	4+	4+	-	-
67	M/52	Manaus	1ª Vez	2,883	NR	Indetect	Indetect	-	1+	-	3+	-	-
78	M/28	Manaus	1ª Vez	5,284	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	4+	-
80	M/40	Manaus	1ª Vez	5,229	NR	Indetect	Indetect	-	3+	1	4+	3+	-
81	M/45	Manaus	Repetição	5,229	NR	Indetect	Indetect	-	-	2+	3+	-	-
83	F/39	Manaus	1ª Vez	5,188	R	308.683	1.027.844	1	4+	4+	4+	4+	-
88	M/27	Manaus	1ª Vez	5,155	R	809.411	2.185.409	1	4+	4+	4+	4+	-
93	M/42	Manaus	1ª Vez	5,291	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	4+	-
95	F/41	Manaus	1ª Vez	5,044	R	838.765	2.264.664	1	4+	4+	4+	2+	-
96	M/47	Manaus	1ª Vez	2,291	NR	Indetect	Indetect	-	2+	3+	3+	1+	-

Tabela 17. Descrição de casos de doadores com RIBA reativos da Fundação HEMOAM com Nested PCR reativo - Manaus,- AM. (Continuação)

Cód	Gênero/ Idade †	Proced	Doação	DO/CO Nova amostra	PCR quali HC11/ HC18 †	Carga Viral		Genótipo	Bandas do RIBA				
						UI/mL	Cóp/mL		C100	C33c	C22	NS5	HSOD
103	M/37	Manaus	1a Vez	5,594	R	597.231	1.612.525	1	4+	4+	4+	2+	-
104	M/39	Manaus	1a Vez	2,159	NR	Indetect	Indetect	-	1+	1+	4+	2+	-
106	F/37	Manaus	1a Vez	5,789	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	4+	-
108	F/38	Manaus	1a Vez	5,666	R	172.378	465.420	1	4+	4+	4+	4+	-
109	M/22	Manaus	Repetição	1,708	R	Indetect	Indetect	1	1+	1+	3+	1+	-
111	F/44	Manaus	1a Vez	1,382	NR	Indetect	Indetect	-	-	4+	-	1+	-
112	F/40	Manaus	1a Vez	5,674	R	280.592	757.597	1	4+	4+	4+	-	-
115	M/61	Manaus	1a Vez	5,413	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	4	-
117	M/51	Manaus	1a Vez	5,398	NR	Indetect	Indetect	-	1+	1+	4+	1+	-
131	F/25	Manaus	1a Vez	5,451	R	314.459	849.039	1	4+	4+	4+	-	-
133	F/23	Manaus	1a Vez	4,212	R	Indetect	Indetect	1	2+	4+	-	-	-
134	M/49	Manaus	1a Vez	5,413	R	603.750	1.630.125	1	4+	4+	4+	4+	-
135	M/50	Manaus	1a Vez	5,487	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	4+	-
145	M40	Apuí	Repetição	3,497	R	323.373	873.108	1	4+	4+	4+	-	-
150	F/57	Coari	Repetição	2,99	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	-	-
151	M/50	Itacoatiara	1a Vez	3,472	R	384.021	1.036.857	1	4+	4+	4+	4+	-
152	M/49	Itacoatiara	Repetição	3,437	R	120.661	325.784	1	4+	4+	4+	4+	-
156	M/56	Maués	-	3,286	R	>850.000	>2.295.000	1	4+	4+	4+	-	-

† M= Masculino; F= Feminino; R= Reativo; NR= Não Reativo

Tabela 18. Descrição de casos de doadores com RIBA Indeterminados da Fundação HEMOAM com Nested PCR reativo.

Cód	Gênero/ Idade [†]	Proced	Doação	DO/CO Nova amostra	PCR quali HC11/HC18 [†]	Carga Viral		Genótipo	Bandas do RIBA				
						UI/mL	Cóp/mL		C100	C33c	C22	NS5	HSOD
4	F/28	Manaus	1a Vez	4,582	NR	3.235	8.736	-	-	-	+/-	-	-
21	M/45	Manaus	Repetição	5,378	NR	793	2.142	-	-	4+	-	-	+/-
31	M/20	Manaus	1a Vez	2,066	NR	Indetect	Indetect	-	-	+/-	-	-	-
35	F/39	Manaus	1a Vez	1,639	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	4+	-	-
52	M/24	Manaus	Repetição	1,666	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	+/-	-	-
61	M/20	Manaus	1a Vez	4,487	NR	Indetect	Indetect	-	+/-	+/-	3+	-	-
70	M/25	Manaus	1a Vez	1,13	NR	Indetect	Indetect	-	-	1+	-	-	-
79	F/48	Manaus	Repetição	1,069	NR	Indetect	Indetect	-	-	4+	-	-	-
84	M/45	Manaus	Repetição	0,952	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	-	1+	-
86	M/21	Manaus	1a Vez	1,043	NR	Indetect	Indetect	-	3+	-	-	-	-
97	M/19	Manaus	1a Vez	2,204	R	46.680	126.036	1	3+	-	-	-	-
114	M/50	Manaus	Repetição	1,309	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	-	1+	-
118	M/34	Manaus	1a Vez	1,735	NR	Indetect	Indetect	-	1+	-	-	-	-
119	M/26	Manaus	1a Vez	1,11	R	627	1.692	1	-	2+	-	-	-
122	M/33	Manaus	1a Vez	3,016	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	+/-	+/-	-
126	M/18	Manaus	1a Vez	4,331	NR	Indetect	Indetect	-	-	+/-	-	-	-
130	M/57	Manaus	Repetição	1,525	R	Indetect	Indetect	1	-	2+	-	-	-
132	M/34	Manaus	Repetição	2,342	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	-	+/-	-
138	M/22	Manaus	1a Vez	0,96	NR	Indetect	Indetect	-	+/-	-	-	-	-
141	F/27	Manaus	1a Vez	5,183	NR	1.301	2.512	-	-	1+	-	-	-
142	F/28	Manaus	1a Vez	4,861	NR	2.606	7.036	-	-	2+	-	-	-
143	M/23	Manaus	1a Vez	3,815	NR	Indetect	Indetect	-	+/-	-	-	-	+/-
144	F/46	Manaus	1a Vez	3,184	NR	Indetect	Indetect	-	-	+/-	-	-	+/-

§ Genotipagem a ser concluída. [†] **M= Masculino; F= Feminino; R= Reativo; NR= Não Reativo**

* Três casos não foram descritos por falta de dados do RIBA

Tabela 19. Descrição de caso de doador da Fundação HEMOAM com RIBA Não Reativo com Nested PCR reativo para RNA do HCV.

Cód	Gênero /Idade [†]	Proced	Doação	DO/CO Nova amostra	PCR quali HC11/HC18 [†]	Carga Viral		Genótipo	Bandas do RIBA				
						UI/mL	Cóp/mL		C100	C33c	C22	NS5	HSOD
87	M/28	Manaus	1ª Vez	1,052	NR	Indetect	Indetect	-	-	-	-	-	-

[†] M= Masculino;NR= Não Reativo

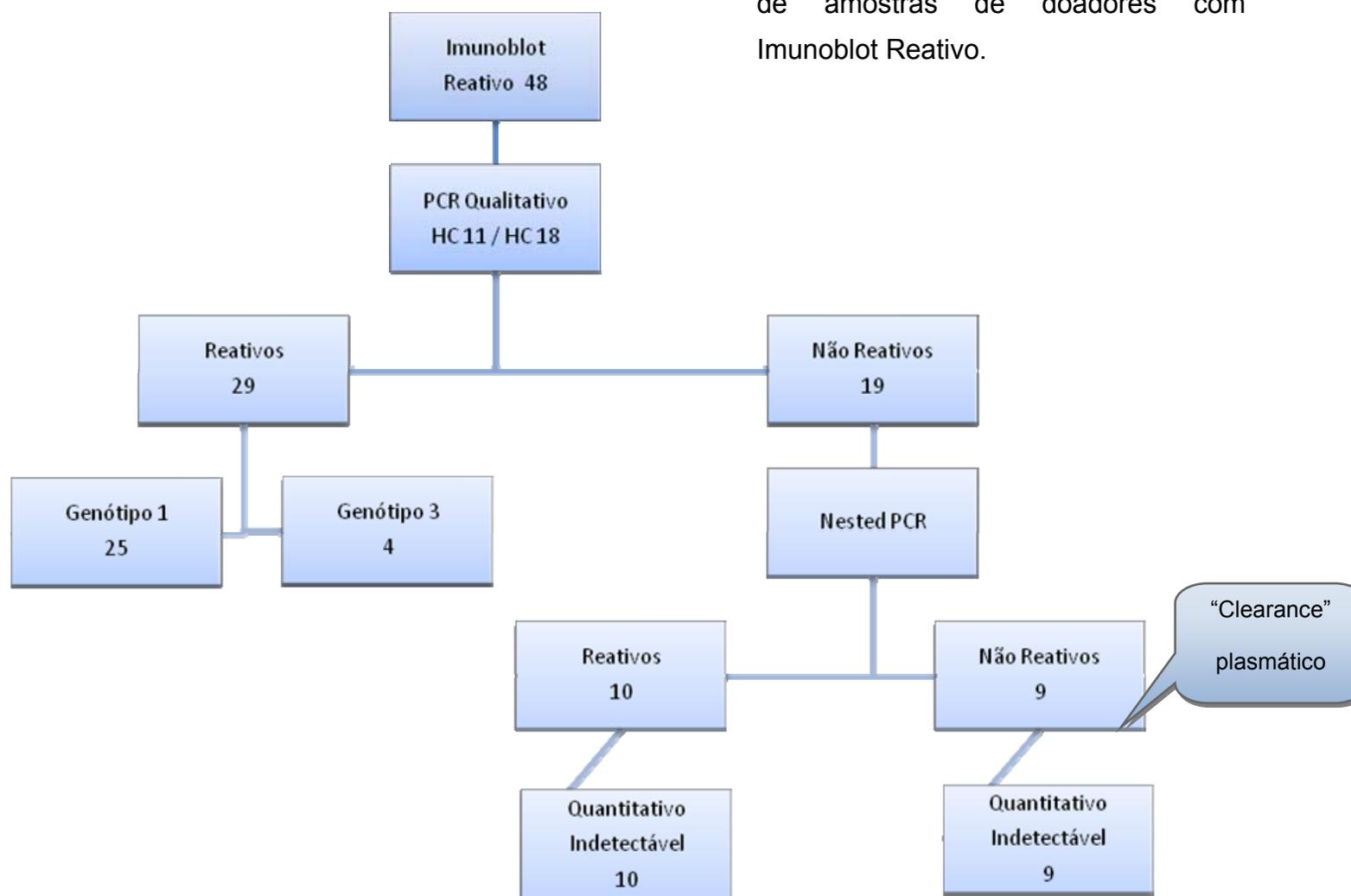
Este doador foi procurado para comparecer ao banco de sangue para nova abordagem e coleta de nova amostra para confirmação diagnóstica e acompanhamento. No entanto, após busca ativa não possível localizar o doador.

Das 48 amostras reativas no Imunoblot, 29 apresentaram amplicon após realização do PCR utilizando os primers HC 11 e HC 18 e 18 amostras foram não reativas nesta reação. As 29 amostras foram seqüenciadas e a distribuição dos genótipos pode ser observada na tabela 17 (uma amostra ainda será seqüenciada). Nas 19 amostras não reativas foi realizada a reação de Nested PCR utilizando-se os pares de primers P32 e P36 no primeiro round (produto amplificado de 220 pb) e os primers P33 e P48 no 2º round gerando um produto amplificado de 145 pb. Neste nested PCR 10 amostras foram reativas e 9 não reativas. As amostras com perfil de Imunoblot reativo sem presença de RNA plasmático foram consideradas casos presumidos de “clearance” viral plasmático.

Quando avaliado o resultado do PCR quantitativo nestas amostras não reativas no PCR utilizando-se o par de primers HC 11 e HC 18, observou-se que todas as 19 amostras tem resultado indetectável.

A figura 13 demonstra o resumo dos resultados moleculares obtidos a partir das amostras com RIBA reativo.

Figura 13. Fluxograma de resultados de amostras de doadores com Imunoblot Reativo.



Das 49 amostras com Imunoblot indeterminado, 3 apresentaram amplicon após realização do PCR utilizando os primers HC 11 e HC 18 e foram caracterizadas como infectadas pelo genótipo 1. Nas 46 amostras não reativas neste PCR foi realizada a reação de Nested PCR utilizando-se os pares de primers P32 e P36 no primeiro round (produto amplificado de 220 pb) e os primers P33 e P48 no 2º round. Neste Nested PCR 22 amostras foram reativas e 24 não reativas.

Quando avaliado o resultado do PCR quantitativo nas amostras reativas no Nested PCR utilizando-se o par de primers HC 11 e HC 18, observou-se que 18 tiveram resultado indetectável e 4 amostras, RNA detectável. Os casos estão descritos na tabela 18.

Todas as amostras não reativas no Nested PCR foram não detectáveis no PCR quantitativo.

A figura 14 demonstra o resumo dos resultados moleculares obtidos a partir das amostras com Imunoblot indeterminados.

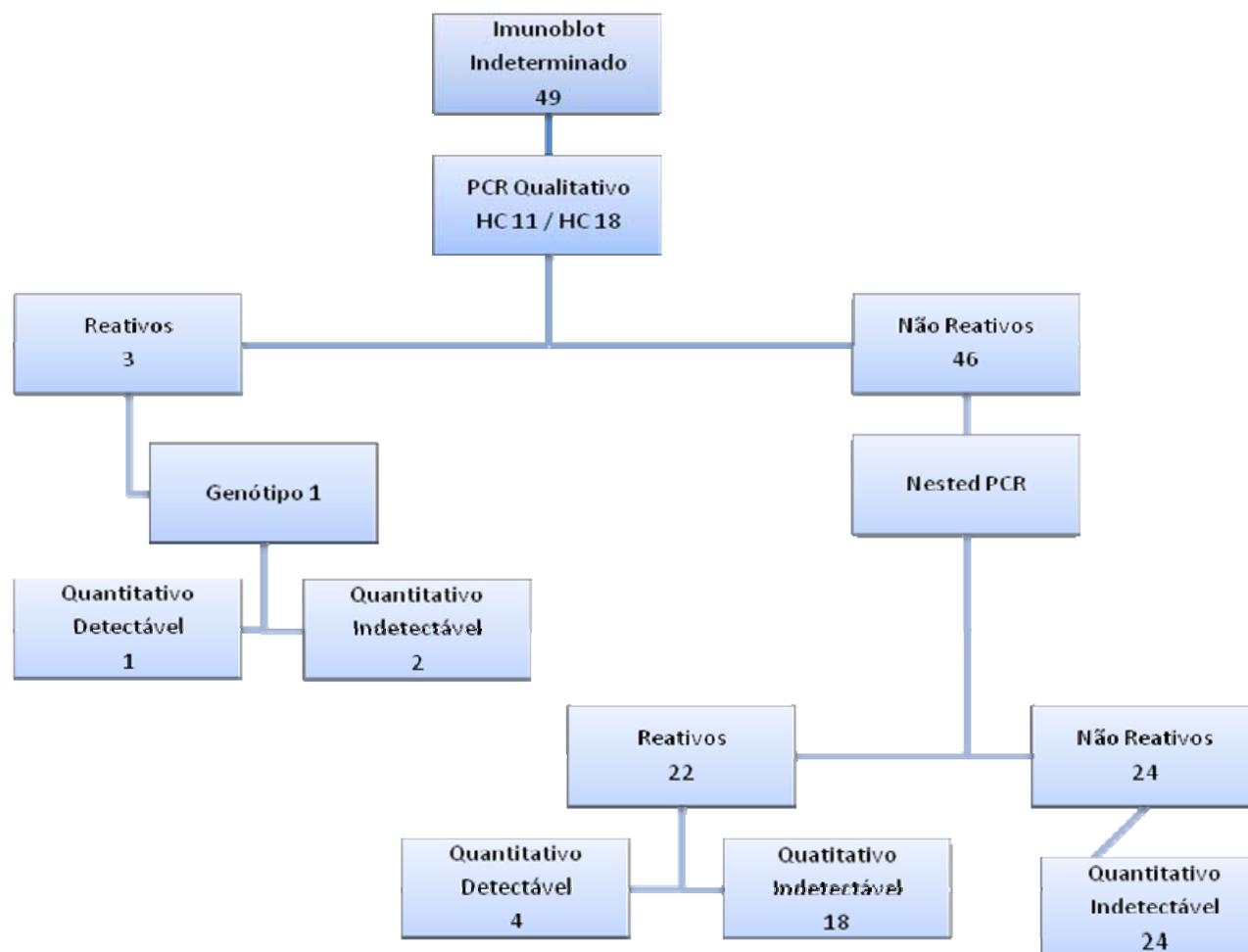


Figura 14. Fluxograma de resultados das amostras com Imunoblot indeterminado.

Nas 20 amostras com Imunoblot não reativos foi realizada a reação de Nested PCR utilizando-se os pares de primers P32 e P36 no primeiro round (produto amplificado de 220 pb) e os primers P33 e P48 no 2º round. Neste nested PCR 19 amostras foram não reativas e 1 reativa (amostra 87). Um outro PCR foi realizado utilizando-se os primers HC 11 e HC 18 a fim de obtenção de amplicon adequado para sequenciamento e genotipagem, no entanto, a reação foi não reativa. Além disso, esta amostra apresentou PCR quantitativo indetectável.

A figura 15 demonstra o resumo dos resultados moleculares obtidos a partir das amostras com Imunoblot não reativo.

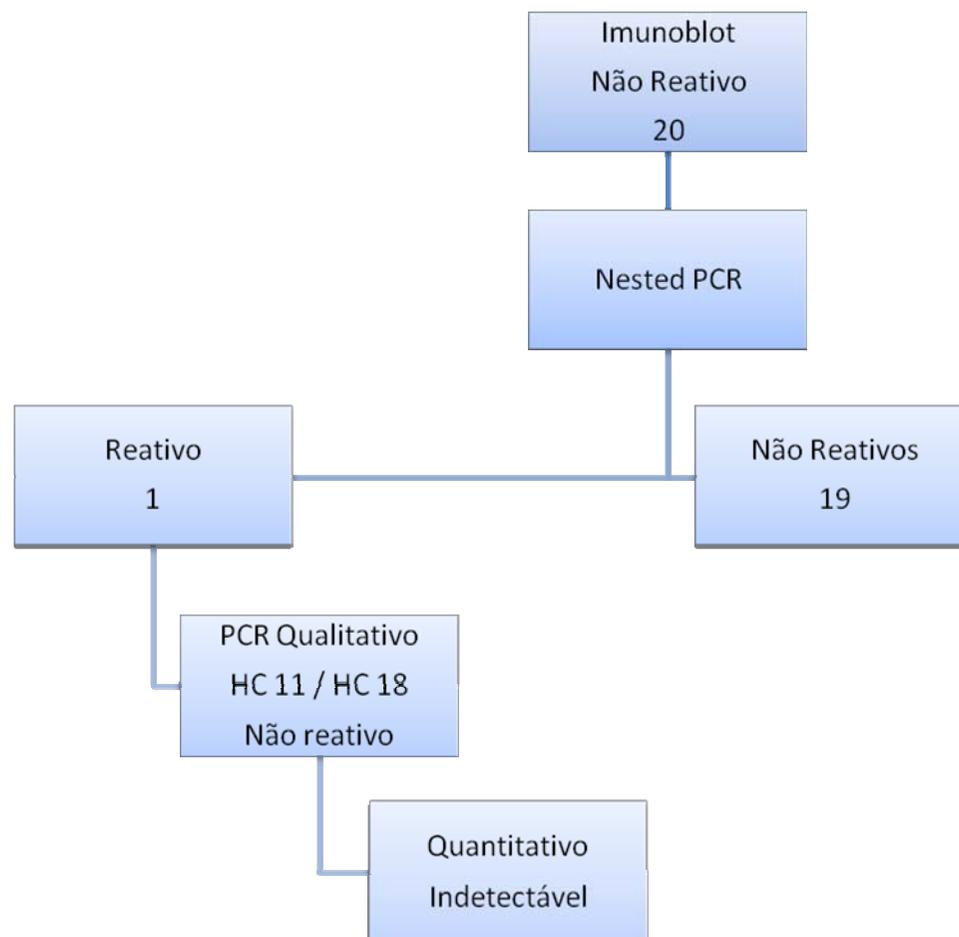


Figura 15. Fluxograma de resultados de amostras com Imunoblot não reativo.

Foi observada inicialmente a ocorrência de 35 amostras que apresentaram reatividade no Nested PCR, mas que não apresentaram amplicon com sinal bom na reação de PCR utilizando-se o par de primers HC 11 e HC 18 que gera um produto amplificado apropriado para o sequenciamento e genotipagem do vírus da Hepatite C. Nestas amostras, foi realizado o procedimento de concentração plasmática antecedendo a extração do RNA. Foi possível obter amplicon com viabilidade de submeter à sequenciamento de 2 amostras (amostra 103 e 119) conforme demonstrado na figura 16.

As demais amostras foram submetidas a várias repetições da reação de PCR utilizando o par de primers HC11/ HC 18, mas não foi possível obter um sinal bom. Assim sendo, não foi possível realizar o sequenciamento e a genotipagem viral das mesmas conforme demonstrado nas tabelas 17, 18 e 19.

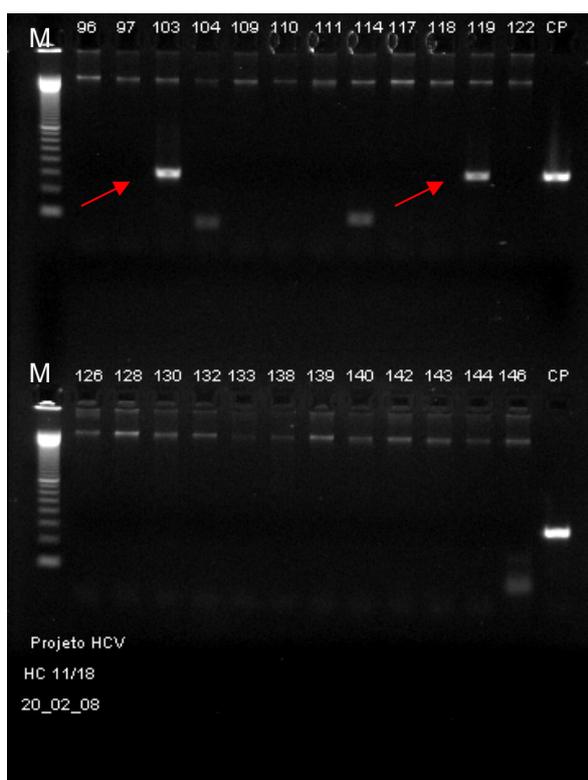


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose de ensaio do procedimento de concentração plasmática e amplificação por PCR utilizando os primers HC 11/18; CP: Controle Positivo; M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

DISCUSSÃO

Na prática hemoterápica em todo mundo, a triagem e o diagnóstico da infecção pelo HCV continua sendo um desafio, principalmente para os hemocentros públicos que não puderam ainda adotar os testes de detecção de ácidos nucleicos (NAT) como rotina. Desta forma, considerando as variáveis genéticas do vírus da Hepatite C e as variáveis populacionais de cada região, o conhecimento mais profundo da realidade da epidemiologia molecular do vírus da Hepatite C na população de doadores de sangue em regiões específicas se torna cada vez mais imprescindível.

No período do estudo o descarte sorológico por anti-HCV reativo na triagem de doadores de sangue do Estado do Amazonas foi de 0,37%. A análise específica da soroprevalência de anti-HCV na triagem de doadores de sangue dos municípios demonstra uma variação que vai de 0,0 a 1,31%.

No Brasil, a frequência de descarte sorológico pelo marcador de Hepatite C mostra seguir proporcionalidades variadas. Na Fundação Pró-Sangue em São Paulo (SP), um estudo recente indicou que o descarte sorológico por anti-HCV reativo ou indeterminado naquele serviço é de 0,91% (Barreto, A.M.E.C., *et al*, 2008). Em Campinas (SP), observa-se uma prevalência de positividade para anti-HCV entre 1,9 a 2,1% dos doadores (Gonçales, N. S. L., *et al*, 2000). Em um serviço privado da cidade de São Paulo (SP) foi descrita a prevalência de anti-HCV repetidamente reativo em 0,5% dos doadores (Wendel, S. *et al*, 2007). No Rio de Janeiro, a

prevalência de anti-HCV na triagem de doadores é descrita ser de 1,09% (Andrade, A.F.B., *et al*, 2006) e em Londrina, um estudo demonstrou a prevalência de reatividade anti-HCV na triagem de 0,9% (Paltanin, L.F. e Reiche, E.M.V, 2002).

Em países como a Índia observa-se soroprevalência de Anti-HCV em doadores de 0,44% (Thakral, B., *et al*, 2006). Na população de doadores de sangue de Gana (África Oriental) a prevalência de anti-HCV é de 3,0% (Candotti, D. *et al.*, 2003). Na Polônia a prevalência de anti-HCV em doadores de primeira vez é de 0,6% (Chalabicz, S. *et al*, 2005). Na Nigéria foi observada uma prevalência de 2,9% de anti-HCV reativo entre os doadores. No entanto, neste país existe a prática de doações comerciais (doações pagas) o que eleva o risco do indivíduo ser portador da infecção (Koate, B.B.D. *et al*, 2005).

Neste estudo, as frequências ajustadas de reatividade anti-HCV com a nova amostra, de reatividade concomitante no ELISA e no RIBA e reatividade concomitante no ELISA e no Nested PCR foram de 0,26%, 0,11% e 0,15% respectivamente. A prevalência de anti-HCV reativo no ELISA da triagem sorológica é diferente da encontrada no ELISA da nova amostra (IC de ambas não se sobrepõem). Quando avaliada a reatividade ajustada do Nested PCR observou-se maior prevalência do que no RIBA. É importante salientar que a prevalência de Nested PCR reativo envolve casos de RIBA indeterminados.

A prevalência ajustada descrita de Nested PCR reativo (0,15%) é semelhante à demonstrada por um estudo envolvendo uma população de

doadores de sangue de São Paulo onde a freqüência de HCV- RNA reativo é de 0,23% (Wendel, S. *et al*, 2007).

Nos Estados Unidos um estudo demonstrou uma prevalência de 0,34% de doadores de sangue com teste de triagem (ELISA) e Imunoblot (RIBA) reativo e destes, 78,5% apresentaram presença do RNA viral (NAT reativo) (Busch, M. *et al*, 2006).

A relação de reatividade entre os ELISAs realizados com a amostra da doação (1ª análise e repetição) e os realizados com a nova amostra (1ª análise e repetição) demonstrou uma concordância de 74,6% a 76,4% quando considerados os quatro ensaios entre si. No entanto, quando foi avaliada a concordância entre a 1ª análise e a repetição utilizando a amostra da doação, observou-se concordância de 96,4% e entre a 1ª análise e repetição da nova amostra observou-se concordância de 98,1%.

A correlação linear observada entre o primeiro ensaio e a repetição reflete a forte reprodutibilidade intra-ensaio do conjunto diagnóstico utilizado nos testes sorológicos na rotina da Fundação HEMOAM (Murex/Abbott). A maioria dos bancos de sangue em todo mundo utilizam a repetição dos ensaios com amostras inicialmente reativas no teste de triagem. No entanto, alguns grupos defendem a conduta de que não há necessidade de repetição do ensaio com amostras reativas quando o conjunto diagnóstico utilizado apresenta forte correlação entre a primeira análise e a repetição (Contreas, A.M., *et al*, 2007).

A forte correlação entre os testes anti-HCV em duplicata reflete a qualidade do conjunto diagnóstico e do equipamento utilizado.

Os algoritmos que incluem a repetição do ensaio com amostras reativas são utilizados para a verificação de erros técnicos quando os ensaios são realizados em plataformas manuais. Baseando-se nisso, O CDC (Center for Disease Control) nos Estados Unidos estabeleceu que apenas um teste reativo é necessário para definir um resultado reativo nos testes de triagem para HCV quando determinados conjuntos diagnósticos são utilizados (Contreas, A.M., *et al*, 2007).

É descrito que a performance dos testes sorológicos de triagem para detecção de anti-HCV em populações imunocompetentes com prevalência esperada de anti-HCV inferior a 10% (como doadores de sangue, profissionais da saúde) apresenta uma proporção de resultados falso-positivos nos ensaios do tipo ELISA de terceira geração de aproximadamente 35% (Alter, M. J. *et al*, 2003). Em São Paulo, observou-se uma prevalência de anti-HCV reativo na triagem sorológica de doadores de sangue de 0,91% e ao reavaliar os doadores sororeativos utilizando nova amostra observou-se que 25,3% apresentaram sorologia negativa o que representa uma concordância de 74,7% entre os dois ensaios utilizando o mesmo conjunto diagnóstico (Barreto, A.M.E.C., *et al*, 2008).

Sabe-se que algumas condições podem levar a ocorrência de falso positividade nos testes sorológicos, tais como altas taxas de gamaglobulinas, doenças hepáticas, doenças auto-imunes, outras infecções virais ou parasitárias (Zachary, P. *et al*, 2005).

A intensidade da reação no teste ELISA indicada pela análise da razão entre Densidade ótica (DO) e “cut-off” (CO) da amostra da doação

demonstrou que há crescimento da positividade no teste Nested PCR entre as amostras que apresentam razão DO/CO mais altas. No entanto, foram observados casos interessantes de doadores que apresentaram fraca reatividade no teste ELISA (razão DO/CO 1|--- 2), mas que tiveram amostra reativa no Nested PCR, apresentando ou não reatividade no teste RIBA.

Entre os doadores com sorologia reativa no teste ELISA, observou-se que 41,6% (47/113) apresentaram teste complementar (RIBA) reativo, 17,7% (20/113) negativo e 40,7% (46/113) indeterminado. Entre os indeterminados, 50% (23/46) apresentaram positividade no Nested PCR indicando a presença de RNA plasmático. Este dado é semelhante ao encontrado no estudo de Gonçalves, N.S.L., *et al* (2000) onde foi descrito que entre os indivíduos que apresentavam RIBA indeterminado, 75% apresentaram RT-Nested PCR positivo e também ao estudo de Amorim, R.M.S. *et al* (2004) que demonstrou que 70% dos indivíduos com Imunoblot indeterminado apresentavam viremia. Em contraste, em um estudo feito com doadores de sangue de São Paulo, foi observado que entre indivíduos com Imunoblot Indeterminado, 2,72% apresentaram RNA viral plasmático (Wendel, S. *et al*, 2007). Proporção semelhante a esta foi observada no estudo de Kleinmann, S. *et al* (2006) no qual foi descrito que 2,5% dos indivíduos com Imunoblot indeterminado apresentaram RNA viral detectável no soro.

Resultados indeterminados no RIBA são freqüentes. Kleinman, S.H. *et al* (2006) demonstraram entre doadores de sangue americanos com teste ELISA repetidamente reativo uma freqüência de 49,3% casos reativos, 17,1% indeterminados e 33,5% não reativos no teste RIBA. No México, um estudo demonstrou entre doadores com teste de triagem para HCV a

freqüência de 42% de amostras reativas, 40% de amostras indeterminadas e 18% de amostras negativas no Imunoblot. (Contreas, A.M., *et al*, 2007).

Em um serviço de hemoterapia de São Paulo, entre os doadores com teste de triagem (ELISA) repetidamente reativo, foi descrito um percentual de 33,29% de doadores com Imunoblot reativos, 28,45% com Imunoblot não reativo e 18,26% com Imunoblot Indeterminado (Wendel, S., *et al*, 2007).

Resultados indeterminados podem ser gerados erroneamente devido à interpretação equivocada da presença de bandas no ensaio um vez que o teste é de leitura e interpretação subjetiva. Como o teste utiliza antígenos recombinantes c33c e NS5 do HCV em fusão com a enzima recombinante Superóxido dismutase Humanas hSOD), o ensaio incluiu também uma banda correspondente à enzima recombinante hSOD que permite a detecção de anticorpos apenas contra hSOD como controle. Desta forma, pode ocorrer erro de interpretação por consideração da presença de banda na fração hSOD, com demais bandas dos antígenos específicos como sendo um resultado indeterminado quando na verdade deveria ser considerado reativo. Alguns estudos já demonstraram que nestes casos, após realização de ensaios moleculares há a demonstração que os indivíduos apresentam viremia (Tobler, LH *et al*, 2001; Kleinman, S. *et al*, 2006).

Um resultado indeterminado no teste RIBA pode indicar também uma situação de falso-positivo no teste de triagem, ou ainda representar uma condição de infecção recente em processo de soroconversão e ocasionalmente situações de infecção crônica pelo HCV quando o indivíduo apresenta RNA plasmático detectável (Alter, M. *et al*, 2003). Na fase de soroconversão, pode haver a ocorrência de RIBA indeterminado com ELISA

reativo devido a maior sensibilidade dos testes ELISA quando comparados com o teste Imunoblot que pode ainda não apresentar bandas com padrão de reativo.

A condição de indeterminado no teste RIBA pode também ser encontrada em situações de sororreversão em pacientes que espontaneamente eliminam o vírus, tendo a detecção dos anticorpos contra frações antigênicas do vírus se tornado negativas, mas ainda são suficientes para serem detectados pelo ELISA (Candotti, D. *et al*, 2003; Heller, T. e Rehmann, 2005; Kleinman S. *et al*, 2006; Barreto, A.M.E.C, *et al*, 2008).

A população de doadores incluída neste estudo tem mediana de idade de 39 anos entre os que apresentam viremia e de 31 anos entre os não virêmicos. Portanto, em virtude do tempo de evolução longo necessário para o estado de possível sororreversão é considerada a possibilidade dos indivíduos com Imunoblot indeterminado com ausência de viremia estarem nesta condição.

Para conhecer melhor a condição de indeterminado do teste RIBA, é de grande valia a realização de estudos de acompanhamento envolvendo estes indivíduos a fim de verificar se haverá a permanência do estado de indeterminado, se ocorrerá o “clearance” viral com negatificação de anticorpos ou se ocorrerá a soroconversão completa.

No presente estudo, observou-se que as amostras com razão DO/CO maior ou igual a 5 apresentam 90,3% de reatividade no RIBA e que 9,7% apresentaram RIBA indeterminado. Nestes casos, o ELISA foi capaz de prever com acurácia resultados verdadeiramente positivos. Quando se

observou na ótica da presença de RNA viral plasmático verificou-se que 75% das amostras com razão DO/CO entre 4 e 5 apresentaram RNA viral plasmático e que esta proporção subiu para 90,3% entre as amostras com razão DO/CO maior que 5.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as medianas da razão DO/CO no ELISA do grupo de amostras que apresentaram tanto o teste RIBA quanto o PCR positivos quando comparados com demais condições de reatividade entre os dois ensaios ($p < 0,001$).

A razão DO/CO tem sido considerada como uma eficiente ferramenta de predizer a viremia. O ponto de corte da razão DO/CO tem variação conforme o conjunto diagnóstico utilizado e a população estudada. Portanto, deve ser estabelecido com cautela. Alguns autores sugerem um corte de razão DO/CO de 10 para separar indivíduos virêmicos e não virêmicos (Bossi, V e Galli, C, 2004). Nos Estados Unidos, publicações do CDC (Center for Disease Control) e do NIH (National Institutes of Health) mostram que um corte da razão DO/CO em maior do que 3,8 têm um valor preditivo alto de verdadeiros anti-HCV reativos para kits manufaturados pela Ortho-Clinical Diagnosis (Ortho HCV version 3.0 ELISA, Raritan, NJ, USA) e pela Abbott (Abbott EIA 2.0, Chicago, IL, USA) e razões maiores do que 8,0 para kits manufaturados pela VITROS anti-HCV (Ortho-Clinical Diagnostics) com sensibilidades maiores que 95% (NIH, 2002; Alter, M. *et al.*, 2003; Oethinger, M., *et al.*, 2005).

Segundo Barreto, A.M.E.C, *et al* (2008), a análise de amostras utilizando como ponto de corte a razão DO/CO maior do que 6 demonstrou

99,2% de concordância do ELISA com o Imunoblot utilizado, demonstrando a acurácia do ELISA em predizer os resultados reativos.

A análise do padrão de reatividade de anticorpos contra peptídeos específicos do HCV foi feita pela observação da presença de bandas no teste RIBA. Observou-se a presença da banda c33 em 50% e a c22p em 20,8% dos casos de amostras com RIBA indeterminado e Nested PCR reativo. Entre os casos de RIBA indeterminado e Nested PCR negativo observou-se a presença de 65,0% da presença da banda c33 e 30,0% da banda C22p. O peptídeo c33 é derivado da região não-estrutural do HCV (região NS3) e o peptídeo c22p corresponde à proteína do nucleocapsídeo viral (Core).

Tem sido reportado que a reatividade exclusiva contra o antígeno NS3 (c33) do vírus pode representar uma reatividade não específica, uma infecção resolvida com anticorpos contra as outras proteínas virais não mais detectáveis, ou mesmo uma infecção por HCV muito antiga. Isso pode ser explicado pela teoria de que a resposta por anticorpos anti-HCV gradualmente declina e eventualmente desaparece após a eliminação viral. Além disso, é descrito que as presenças de anticorpos contra as frações NS3 e Core são as que mais se prolongam em caso de sororeversão. (Candotti, D. *et al*, 2003). A presença de anticorpos contra estas mesmas frações está associada a casos de indivíduos com Imunoblot indeterminado que estão em situação de soroconversão e que se acompanhados, demonstraria em futuros Imunoblots o padrão de reatividade (Kleinman, S. *et al*, 2006).

No estudo de Hyland, C. *et al* (2003) na Austrália foram descritos casos de soroconversão nos quais as primeiras bandas a serem detectadas no teste Imunoblot (RIBA) foram c22p e c33c quando a análise pelo teste de triagem por quimioluminescência ainda era não reativo. O mesmo estudo verificou que o padrão de reação a diferentes antígenos do vírus pode determinar o padrão de sensibilidade dos diferentes testes utilizados na rotina da triagem sorológica, pois observou que quando a primeira detecção de anti-HCV foi pela tecnologia de quimioluminescência o primeiro anticorpo a ser detectado foi contra o peptídeo c33c e quando o ensaio por ELISA detectou primeiro, os anticorpos foram contra o peptídeo c22p.

No estudo de Gonçalves, N.L. *et al* (2000) foi descrito uma frequência de 75% de casos de amostras com Imunoblot indeterminado e Nested PCR reativo, especialmente quando está presente a banda correspondente ao antígeno c22.

Desta forma, a análise e interpretação da presença das bandas do Imunoblot (RIBA) podem contribuir para o acompanhamento e aconselhamento de indivíduos com positividade para estes marcadores da infecção pelo HCV.

Entre as amostra reativas no ELISA da nova amostra, observou-se que 55,8% apresentaram presença de RNA viral pela reatividade no Nested PCR. A análise descritiva destas amostras demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os gêneros. Em relação às faixas de idade dos doadores, observou-se haver relação de força de associação entre a faixa de idade de 55 ---| 45 anos e a presença de RNA viral

(OR=8,19; $p < 0,001$). Da mesma forma, observou-se relação entre a faixa de idade de 45 ---| 35 anos e a presença de RNA viral (OR= 3,49; $p = 0,003$).

Estudos têm demonstrado que o aumento da idade é um fator de risco para a infecção pelo HCV. Na população de profissionais da saúde foi observado que a cada cinco anos de idade o risco da infecção aumenta em 50% (Ciorlia, L.A.S e Zanetta, D.M.T, 2007).

A relação entre a procedência (capital ou interior) foi avaliada e não foi observada associação com a presença do RNA viral. A amostragem estudada de doadores do interior foi pequena representando 30% (12/40) do total de doadores com sorologia de triagem reativa para anti-HCV no interior do Estado do Amazonas no período do estudo. Desta forma, é limitada qualquer análise relacionada à procedência.

O perfil do doador quanto a ser doador de primeira vez ou de repetição pode influenciar no risco de ter a infecção por HCV uma vez que a internalização de valores morais é mais freqüente em doadores de repetição que se preocupam em manter um perfil de comportamento que diminui o risco de contato com doenças sexualmente transmissíveis e uso de drogas, por exemplo (Godin, G., *et al*, 2007).

A análise da determinação da carga viral foi testada em todas as amostras com ELISA repetidamente reativo e com RIBA reativo ou indeterminado (97). No entanto, o RNA viral foi detectável em 33 (34,0%) amostras nas quais foi possível mensurar a carga viral.

A mediana da razão DO/CO entre as amostras com carga viral mensurável foi de 5,29 e entre as amostras com carga viral não mensurável foi de 1,91. A diferença entre estas medianas foi estatisticamente significativa

($p < 0,001$). Observou-se também, que em 48,4% das amostras com presença de RNA plasmático detectada pelo ensaio de Nested PCR não foi possível a mensuração da carga viral. O teste utilizado para determinação da carga viral possui limite de detecção de 600 UI/ mL e este pode ter sido um fator limitante para proporcionar a determinação da carga viral nas amostras com baixa viremia e reação no teste ELISA fraca e/ou Nested PCR reativo.

Observou-se 9 (18,8%) doadores com Imunoblot reativo entre os que apresentaram Nested PCR não reativo. Portanto, são casos presumidos de ocorrência de “clearance” viral plasmático do vírus da Hepatite C.

A prevalência de “clearance” viral plasmático descrita na literatura varia de 10 a 50% (Thomas, D.L. *et al*, 2000; Bernardin, F. *et al*, 2008; Simanis, R. *et al*, 2008). Em São Paulo, em um estudo envolvendo doadores de sangue, foi demonstrada uma frequência de 17,16% de indivíduos com possível exposição prévia ao HCV (Imunoblot reativo) sem viremia (HCV-RNA negativo) (Wendel, S. *et al*, 2007). É sabido que 15 a 25% dos indivíduos anti-HCV reativos e imunoblot reativos são HCV-RNA negativos no soro ou plasma, possivelmente por conseguirem realizar o “clearance” viral (Diepolder, H.M. *et al.*, 1995).

Entre os doadores com Imunoblot indeterminado observou-se 32 casos (47,9%) que não foi detectado o RNA viral plasmático através do Nested PCR. A possibilidade de ocorrência de “clearance” associado a casos com Imunoblot indeterminado é considerada em virtude da existência

de casos de sororreversão quando pacientes espontaneamente eliminam o vírus, tendo a detecção dos anticorpos contra frações antigênicas do vírus se tornando negativas, mas não mais suficientes para serem detectados pelo ELISA e Imunoblot (Candotti, D. *et al*, 2003; Barreto, A.M.E.C, *et al*, 2008).

Hoje já se admite a possibilidade de que o “clearance” do HCV-RNA não está necessariamente relacionado com o aparecimento de resposta imune adquirida, o que desafia os atuais conhecimentos sobre a imunopatogênese da infecção pelo vírus da hepatite C. O estudo de Meyer, F. *et al* (2007) que realizou um acompanhamento em uma coorte de indivíduos de comportamento de alto risco para infecção pelo HCV, demonstrou a ocorrência de casos de “clearance” do HCV- RNA sem os indivíduos terem desenvolvido anticorpos anti-HCV.

Segundo Heller, T e Rehmann, B (2005), para que o “clearance” viral possa ser considerado é necessário que se faça um acompanhamento e que seja constatada a ausência de viremia em mais de uma ocasião do acompanhamento de pelo menos um ano, uma vez que podem ocorrer flutuações da viremia na fase aguda da infecção. Além disso, no acompanhamento ao tratamento, é imprescindível reconhecer que após a negatificação do RNA plasmático podem ocorrer momentos intercalados de positividade do RNA sem subsequente “clearance” (Mosley, J.W. *et al*, 2008).

O fenômeno de “clearance” viral pode ser determinado por diversos fatores como mecanismo de infecção, genótipo viral, quasiespécies envolvidas, carga viral, resposta imune do indivíduo, alótipos do HLA, etnia, sexo, e idade do hospedeiro (Cramp, M. E. *et al*, 1998; Busch, M.P. *et al*, 2006; Simanis, R. *et al*, 2008).

A ocorrência de evidências de “clearance” plasmático na infecção pelo HCV não pode descartar por completo a possibilidade do indivíduo ainda estar infectado pelo vírus. Há evidências da replicação do vírus em compartimentos extra-hepáticos que podem contribuir potencialmente para a viremia, entre estes compartimentos são citadas as células sanguíneas mononucleares (Bernardin, F. *et al*, 2008; Blackkard, J.T. *et al*, 2007; Cavalheiro, N.P., *et al*, 2007), medula óssea, sistema nervoso central (Pham, T.N.Q. *et al*, 2004), pâncreas, tireóide, baço, glândulas adrenais, linfonodos, fluido cervico-vaginal (Blackard, J.T. *et al*, 2006). Há evidências da continuidade da replicação viral nas células mononucleares em indivíduos que apresentaram o “clearance” viral plasmático servindo como um reservatório do vírus (Feld, J.J. *et al*, 2005; Radkowski, M. *et al*, 2005). Esta persistência foi demonstrada mesmo em indivíduos com “clearance” plasmático entre 12 a 60 meses (Pham, T.N.Q. *et al*, 2004). Desta forma, a análise dos casos presumidos de “clearance” plasmático deve ser feita com cautela e impõe um acompanhamento dos casos em questão, apesar de que o “clearance” do RNA no plasma está fortemente associado com o “clearance” concomitante do RNA nas células mononucleares (Bernardin, F. *et al*, 2008). Nesta discussão, a sensibilidade do teste de detecção do RNA

viral plasmático utilizado tem um grande peso por considerarmos que pode ocorrer um falso resultado negativo (indicando um falso resultado de “clearance” plasmático).

O entendimento sobre o fenômeno do “clearance” viral precisa ser cada vez mais estudado, principalmente na ótica de dar subsídios ao corpo de profissionais que lidam com a assistência ao paciente. Considerando tantas nuances diagnósticas e a complexa evolução natural da infecção pelo HCV, estudos de seguimento dos indivíduos anti-HCV reativos, dos indivíduos com RIBA indeterminado e dos presumidamente clareadores são necessários para enriquecer o aconselhamento aos indivíduos. O aconselhamento recomendado a ser dado ao indivíduo nesta condição no banco de sangue tem sido da necessidade de acompanhamento médico e orientação de que o resultado de seus exames indica uma possível resolução da infecção (Kleinman, S. *et al*, 2006).

O estudo da resposta imune entre dos indivíduos clareadores e não clareadores pode contribuir sobremaneira para o entendimento dos fatores que podem levar ao sucesso da eliminação viral. Desta forma, nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo das variáveis relacionadas à resposta imune de indivíduos com evidência de “clearance” viral plasmático e de indivíduos com viremia. Entre as variáveis estudadas estão: tipagem HLA Classe I e Classe II, celularidade (através de alguns marcadores de superfície e dosagens de citocinas Th1 e Th2).

No curso da infecção pelo HCV, diferentes condições dos marcadores diagnósticos podem ocorrer em virtude das flutuações dos marcadores utilizados como dos anticorpos contra diferente peptídeos virais, assim como

flutuações da viremia e, portanto, da detecção do RNA viral na amostra estudada. Estudos demonstram que na fase de pós-soroconversão a flutuação dos níveis do RNA plasmático tornou-se indetectável em alguns momentos, mesmo com testes com alta sensibilidade de detecção (Hyland, C. *et al*, 2003; Fang, C.T. *et al*, 2003). Estas flutuações da viremia refletem o efeito da resposta imune sobre o vírus e passam a ser motivo de preocupação para os serviços que adotaram a triagem de doadores através do uso de detecção do RNA viral em amostras de minipool uma vez que este procedimento pode diminuir a sensibilidade do ensaio.

Neste estudo, foi observado um caso de doador com ELISA repetidamente reativo, com padrão fraco de reatividade ($DO/CO = 1,052$), com Imunoblot negativo, mas que apresentou Nested PCR reativo. Este doador foi procurado para coleta de nova amostra, orientação, confirmação diagnóstica e análise da evolução da infecção e não foi possível localizá-lo por motivo de viagem.

Tendo-se como base o Fluxograma de investigação diagnóstica recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2005), mediante a suspeita da Hepatite C, deve-se solicitar o teste de triagem anti-HCV e, uma vez reativo, deve-se encaminhar o indivíduo para um centro de referência onde deverá ser realizada pesquisa de HCV-RNA. Segundo este algoritmo, seria eliminado o uso do teste complementar Imunoblot. No entanto, o uso do teste Imunoblot tem importante valor diagnóstico na análise da possibilidade de suspeita de “clearance” viral plasmático nos casos de ausência de RNA viral. Um estudo realizado em São Paulo avaliou o custo-benefício de diferentes algoritmos de diagnóstico da Hepatite C e constatou que o

algoritmo que inclui o teste de Imunoblot após os testes moleculares apresentou informações mais precoces sobre a viremia, além de considerar que o uso dos testes moleculares antes do Imunoblot traz menor custo ao processo (Barreto, A.M.E.C., *et al*, 2008).

A distribuição dos genótipos encontrada foi 87,5% de genótipo 1 e 12,5% de genótipo 3.

Em 49,2% dos doadores com presença de RNA viral detectada pelo Nested PCR não foi possível a conclusão do genótipo uma vez que o PCR para geração de amplicon apropriado para genotipagem (usando os primers HC11/HC18) não foi reativo.

O fator limitante para a positividade neste ensaio foi possivelmente a baixa carga viral do HCV nestas amostras, sendo abaixo do limite de detecção desta reação de PCR.

Entre as 33 amostras com viremia constatada pelo Nested PCR mas sem determinação do genótipo viral, foi possível a determinação da carga viral de 4 amostras, sendo todas elas baixas. Esta constatação reafirma que há a limitação técnica de conseguirmos o amplicon necessário para o sequenciamento e genotipagem pela condição de baixas viremias destas amostras. Além disso, a estratégia de concentração plasmática por centrifugação antes da extração permitiu a obtenção de amplicons e possibilitou a genotipagem de duas amostras. Este resultado reforça ainda mais a teoria da limitação pela baixa carga viral. Portanto, a técnica de concentração plasmática por centrifugação pode contribuir para aumentar a

sensibilidade do PCR usando o par de primers HC 11/18 permitindo o sequenciamento e conseqüente genotipagem do HCV.

Não foi encontrado entre as amostras seqüenciadas neste estudo o genótipo 2 do vírus. Porém, em estudos conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisa em Manaus – AM, em população de pacientes com Hepatite C crônica, observou-se a presença do genótipo 2 do HCV em 23% dos genótipos encontrados, sendo ainda 36% pelo genótipo 1 e 41% pelo genótipo 3 (Almeida, C.M.O, 2007) e na população de pacientes renais crônicos de um serviço de hemodiálise de Manaus – AM, foi observada a freqüência de 86,7% de genótipo 1 e 13,3% de genótipo 3, não sendo detectado nenhum caso de genótipo 2 (Feitosa, I.M.L, 2008).

A distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C na amostra estudada foi similar a reportada por outros estudos no Brasil. No estado do Acre, em uma população de profissionais da saúde, foi descrita a freqüência de 66,7% de genótipo 1, 25% de genótipo 3 e 8,3% de genótipo 2 (Paraná, R. *et al*, 2007).

Um estudo envolvendo amostragem de indivíduos de diversos estados brasileiros demonstrou a distribuição de 64% do genótipo 1, 33% do genótipo 3 e 3% do genótipo 2 (Focaccia, R. *et al*, 2004). No sudeste brasileiro foi descrita a freqüência de 70,0% de genótipo 1, 22,3% do genótipo 3, 4,2% do genótipo 2 em pacientes com hepatite C crônica (Cavalheiro, N. *et al*, 2002). Foi também descrita em uma população de indivíduos sob tratamento prolongado por hemodiálise a freqüência de 83% de genótipo 1, 10% do genótipo 3 e 7% do genótipo 4 (Moreira, R. *et al*, 2003). Em uma população de doadores de sangue de São Paulo, foi descrita

a distribuição de 73% de genótipo 1, 24% de genótipo 3 e 3% de genótipo 2 (Wendel, S. *et al*, 2007). Na região centro-oeste brasileira foi descrita a distribuição de 67% de genótipo 1, 29,1% de genótipo 3, e 3% de genótipo 2 (Martins, R.M.B. *et al*, 2006).

A técnica de concentração plasmática utilizada como estratégia para aumentar a capacidade de detecção do RNA viral plasmático demonstrou ser útil em casos de investigação diagnóstica promovendo a obtenção de amplicon para sequenciamento de amostras. No entanto, ainda assim, não foi possível a obtenção de amplicon ideal para o sequenciamento e genotipagem do HCV em 33 amostras.

O fato de ocorrerem os casos de indefinição do genótipo viral cria um incômodo no sentido de ficar limitado o aconselhamento e orientação ao indivíduo. Nestes casos, pode haver comprometimento da qualidade de vida do paciente infectado pelo HCV uma vez que é descrito o forte grau de comprometimento da qualidade de vida de pacientes infectados pelo vírus (Strauss, E. e Teixeira, M. C. D., 2006).

Técnicas alternativas foram desenvolvidas para a determinação do genótipo do HCV através da sorotipagem, isto é, a identificação de anticorpos tipo específicos contra frações da região NS4 (c100) e do Core do vírus, sem a presença de partícula viral e sem a necessidade de realização de técnicas moleculares (Cavalheiro, N., *et al*, 2002). No entanto, este método apresenta 75,8% de sensibilidade sendo limitada pelo estado de imunocompetência do portador (Harris, H.E. *et al*, 2007). Além disso, o alto custo do teste é um fator limitante para seu uso nos laboratórios clínicos e

de pesquisa. Além disso, o fato do conjunto diagnóstico identificar anticorpos contra a fração NS4 do vírus, limita a sua sensibilidade nos casos de possível sororeversão considerando que os anticorpos anti-NS4 são os primeiros a diminuir os títulos nas infecções crônicas de longa projeção e nos pacientes que iniciam a fase de sororeversão (Lefrère, J. *et al*, 2004).

Em casos em que não é identificado o RNA viral no plasma a busca de RNA viral na camada de células mononucleares (“buffy coat”) pode ser uma alternativa para determinação da presença da infecção. Alguns grupos obtiveram sucesso na busca da presença de RNA viral nas células mononucleares de sangue periférico e constataram a condição de “clearance” viral plasmático com presença de RNA viral na camada de células mononucleares periféricas. Demonstrando assim, a preocupação com o fato de que a ausência de RNA do HCV no soro ou plasma em pacientes com hepatite C crônica no final do tratamento não significa que não existe mais o vírus circulante e que a pesquisa de RNA do HCV nas células mononucleares periféricas deve ser um melhor indicador da persistência da infecção (Cavalheiro, N.P. *et al*, 2007). As técnicas de obtenção das células mononucleares periféricas mais utilizadas tem sido através de separação por gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque, obtendo-se boa concentração e pureza celular (Cavalheiro, N.P. *et al*, 2007).

Este estudo proporcionou contribuições para o avanço no potencial de diagnóstico e de aconselhamento de doadores soropositivos para anti-HCV em bancos de sangue. Foi possível ainda a ampliação das linhas de pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas –

HEMOAM e o fortalecimento das cooperações técnicas com o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Novos desafios ainda precisam ser vencidos no que diz respeito ao aconselhamento aos doadores de sangue soropositivos para anti-HCV através de acompanhamento de indivíduos com padrão de ELISA reativo, Imunoblot Indeterminado com ou sem viremia constatada e de indivíduos com padrão presumido de “clearance” viral plasmático. Neste último grupo abriu-se a perspectiva de investigação da presença de RNA viral nas células mononucleares periféricas.

Da mesma forma, o estudo demonstrou a necessidade de analisar a prevalência de infecção pelo HCV entre os familiares dos doadores de sangue infectados e de aprofundamento da análise das histórias de risco de transmissão relatadas pelos doadores.

Além disso, os resultados deste estudo e as experiências técnicas acumuladas servirão de base para mudança de conduta do acompanhamento dos doadores sororeativos para anti-HCV, além de proporcionar a adesão a um novo fluxograma de diagnóstico da infecção pelo HCV na Fundação HEMOAM com a inclusão do diagnóstico molecular previamente à análise pelo Imunoblot.

CONCLUSÕES

No período do estudo, o índice de descarte sorológico por anti-HCV reativo na população de doadores de sangue do Estado do Amazonas foi de 0,37%.

A condição diagnóstica de Imunoblot indeterminado deve ser acompanhada com cautela no serviço de hemoterapia da Fundação HEMOAM uma vez que 50% dos casos apresentaram positividade no Nested PCR indicando a presença de RNA plasmático.

A carga viral baixa é um fator limitante para a determinação do genótipo viral pelo método de sequenciamento.

A frequência de casos presumidos de “clearance” viral plasmático na amostra estudada foi de 18,8%.

O genótipo mais prevalente do HCV nos doadores do Estado do Amazonas é o genótipo 1 (87,5%) seguido do genótipo 3 (12,5%).

O genótipo 1 foi encontrado em doadores dos municípios de Apuí (região Sul do Amazonas), Coari, Itacoatiara, Manaus e Maués (região central do Amazonas) enquanto que o genótipo 3 foi encontrado apenas em Manaus.

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados com o vírus da Hepatite C.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre os tipos do vírus da Hepatite C envolvidos na infecção de doadores de sangue do Estado do Amazonas e estudar a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra esta infecção.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 20 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus, a confirmação do diagnóstico da infecção e como o organismo está respondendo contra o vírus. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus e outros no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz em nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento e na prevenção da hepatite C.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à hepatite C, podendo entrar em contato com as doutoras Kátia Torres e Adriana Malheiro (HEMOAM :Tel: 92-655-0100/ 92-656-0113). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do HEMOAM.

VOLUNTARIEDADE: A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

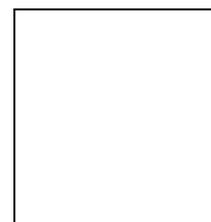
USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico), será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)

(Assinatura do pesquisador)



Manaus, ___/___/____

(Impressão dactiloscópica)

ANEXO B

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados com o vírus da Hepatite C.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA INCLUSÃO DE CASOS

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre os tipos do vírus da Hepatite C envolvidos na infecção de doadores de sangue do Estado do Amazonas e estudar a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra esta infecção.

CONSIDERAÇÕES GERAIS:

1. Este estudo está sendo realizado pelo laboratório de sorologia e coordenado pela Diretoria de Ensino e Pesquisa da Fundação HEMOAM fazendo parte de uma das linhas de pesquisa da Instituição;
2. É um projeto realizado em cooperação com o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/ USP.
3. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Fundação HEMOAM em Agosto de 2005.
4. Os critérios de inclusão de casos são:
 1. Doadores de sangue do sexo masculino ou feminino, da capital ou do interior do Estado do Amazonas, cadastrados em qualquer unidade de coleta e transfusão de sangue do Estado e que tiverem sorologia positiva nos testes de triagem sorológica para anti-HCV, inclusive os que apresentarem co-infecção com outras patologias diagnosticadas durante a triagem sorológica.
5. Os critérios de exclusão de casos são:

1. Doadores que após a repetição do teste anti-HCV (ELISA) com nova amostra, apresentarem resultado negativo para o parâmetro.

PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS:

- O HEMOAM irá comunicar as Unidades Hemoterápicas através de lista enviada por fax, a identificação dos doadores com sorologia reativa para anti-HCV;
- Os doadores deverão ser convidados para comparecimento a unidade Hemoterápica;
- O profissional responsável pela Unidade de coleta e transfusão do Município deverá prestar esclarecimentos quanto ao estudo que está sendo realizado pelo HEMOAM, explicando seus objetivos conforme indicado no documento Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A).
- Após os devidos esclarecimentos o técnico deverá solicitar ao doador que assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias. O técnico deverá ainda assinar também o documento e entregar uma via ao doador. A outra via deverá ser enviada através do fax (92-36550112) e também o original deverá ser enviado juntamente com documentos rotineiramente encaminhados ao HEMOAM acompanhando as amostras coletadas;
- Aplicar o questionário epidemiológico (ANEXO C) preenchendo todos os campos indicados. O responsável pelo atendimento deverá assinar e datar o documento, grampear e enviar juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o HEMOAM;
- Coletar dois tubos tipo PPT® (disponibilizados pelo HEMOAM). Para isso, os mesmos deverão ser identificados como a seguir:
 - Nome do doador
 - Data do nascimento
 - Número da bolsa (macarrão)

OBS: **Não deverá ser aberta a tampa do tubo PPT®**. Se possível, a coleta deverá ser feita por sistema a vácuo. Caso não seja possível, coletar com seringa descartável comum, **10 ml de sangue periférico** e transferir a amostra para o tubo PPT transpassando a agulha pela tampa do tubo (Sem abrir a tampa).

- Sem abrir as tampas, os tubos deverão ser centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos.
- Logo após a centrifugação os tubos deverão ser congelados (-20 °C: guardar no congelador) sem nenhum tipo de fracionamento da amostra.
- As amostras deverão ser enviadas ao HEMOAM juntamente com as remessas rotineiras da Unidade Hemoterápica, acompanhadas dos formulários citados acima (ANEXO A e C).

Qualquer dúvida ou comunicado deverá ser feito com Dra. Kátia Torres. Diretoria de Ensino e Pesquisa da Fundação HEMOAM através do telefone: 92- 36550113 ou 36550113 ou celular 92 81381098 ou fax: 92 36550112.

ANEXO C

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Título do projeto: Caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados com o vírus da Hepatite C

Código: _____

Dados pessoais/ demográficos:

Nome do doador: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: F M

Data da doação: ___/___/___ Tel de contato: _____

Número da bolsa: _____

Local da doação: HEMOAM (Manaus) Maternidade Ana Braga (Manaus) Coleta Externa (Manaus) Unidade Hemoterápica do Interior (especificar): _____

Dados epidemiológicos:

É a primeira doação? Sim Não

Quando foi a última doação?(informar dados das doações anteriores) _____

Estado civil: Casado Solteiro viúvo Divorciado

Outros _____

Múltiplos parceiros? Sim Não

Profissão _____

Já trabalhou em: Hospitais Clínicas médicas Unidades de diálise

Laboratório Consultório dentário Afins

Já precisou receber transfusão de sangue? Não Sim

Quando? _____ Por qual motivo? _____

Já teve hepatite? Sim Não Há quanto tempo? _____

Faz ou fez uso de drogas injetáveis/outras? Sim Não

Já fez cirurgia? Sim Não Quando? Qual? _____

Possui tatuagem ou piercing? Sim Não

Utiliza terapia por acupuntura? Sim Não

Faz uso de bebidas alcoólicas? Sim Não

Se submeteu a exame de endoscopia? Sim Não

Comentários: _____

Responsável pelo preenchimento: _____

Data: ___/___/___

ANEXO D

- Utensílios domésticos: não compartilhar lâminas de barbear, escovas de dente e agulhas com outras pessoas. Quanto ao resto (talheres, pratos, toalhas, roupas), não há qualquer problema.
- Outros tratamentos: sempre informar, em qualquer tratamento que realizar, que é portador do vírus da hepatite C aos profissionais de saúde que atenderem você.
- Manter sempre o acompanhamento médico, para que sejam detectadas alterações durante a infecção e, quando necessário, o tratamento seja feito adequadamente.

Qualquer dúvida: consulte sempre o seu médico!

Mais informações:

HEMOAM – 3655 01000

Ramal 0113 : Dra.Kátia Torres

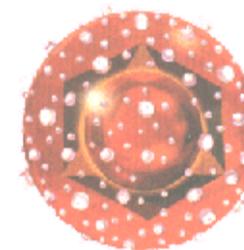
Dra. Márcia Morais

Consultas – Retornos

Data	Horário
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____

HEMOAM

Hepatite C



O que é preciso saber?

O que é Hepatite C?

O termo hepatite significa uma inflamação no fígado, podendo ter muitas causas (infecções, intoxicações pelo álcool, medicamentos etc). De todas as causas, a mais conhecida é a hepatite viral. Os vírus que atingem preferencialmente o fígado (hepatotrópicos) são denominados pelas letras do alfabeto: A, B, C, D, E, G). Portanto, a hepatite C é uma inflamação no fígado causada pelo vírus C.

Como é transmitida a hepatite C?

- Transfusão de sangue total ou seus derivados
- Uso de agulhas e seringas contaminadas
- Acidente ocupacional
- Tatuagens, *piercings* e acupuntura
- Relações sexuais sem preservativo
- Transmissão de mãe para filho
- Diálise, procedimento de endoscopia, outros.

O que acontece após a infecção?

Pode acontecer:

- Mal-estar geral

- Perda do apetite
- Pele e olhos amarelados
- Coccira da pele
- Escurecimento da urina
- Febre
- Dor abdominal
- Vômitos repetidos

Muitas pessoas não apresentam nenhuma manifestação clínica. Contudo, continuam portadoras do vírus e podem transmiti-lo a outras pessoas.

A doença pode persistir por mais de 6 meses (crônica) e, em alguns casos, evoluir para formas graves (cirrose, insuficiência hepática, tumor maligno).

Constatada a infecção, o que fazer?

Procurar um médico, que fará os exames necessários e orientará o tratamento.

Quais são os exames laboratoriais realizados?

Para constatar a infecção, são realizados exames laboratoriais em amostras de sangue, que podem detectar anticorpos contra o vírus ou até mesmo o material genético do vírus que causou a infecção.

Existe vacina?

Ainda não existe vacina eficaz para o vírus C devido à sua complexidade.

Como devo me comportar com a hepatite C?

Dieta: geralmente, a alimentação continua normal, devendo ser saudável e balanceada. Em casos de doença grave, o sal, as proteínas e as gorduras deverão ser mais controlados.

Bebidas: o álcool deve ser evitado, porque pode agravar a doença. Não existem restrições para outras bebidas (sucos, por exemplo). Em casos de dúvida, pergunte ao seu médico.

Fumo: não faz bem para ninguém.

Atividades físicas: quando não existem sintomas, não há restrição para as atividades. Quando surgem cansaço, dores no corpo e em casos graves, o paciente deve ficar em repouso.

Relações sexuais: sempre com uso de preservativo.



ANEXO E



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP PARECER – CAAE-0003/2005

I. Identificação

Título: Caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados pelo vírus da Hepatite C

Instituição: HEMOAM

Pesquisador responsável: Adriana Malheiro

Data de reapresentação ao CEP: 18.03.2005

Documentos Encaminhados: Carta de encaminhamento, Folha de Rosto, Projeto, TCLE, Questionário, Justificativa

Versão do Protocolo: 03/05

II. Objetivos

Geral: caracterizar os genótipos dos isolados do vírus da hepatite C encontrados entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas; estudar a distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite C isolados de doadores de sangue do Estado do Amazonas; caracterizar o perfil da resposta imunológica, celular e humoral nos indivíduos infectados com HCV.

Específico:

1. Relacionar o perfil sorológico do doador nos testes de triagem (Elisa) com o perfil de anticorpos específicos contra frações do HCV no teste Imunoblot;
2. avaliar o grau de associação entre a sensibilidade e reprodutibilidade dos testes anti-HCV (Elisa) e Imunoblot com teste molecular;
3. avaliar a distribuição geográfica dos diferentes genótipos dos vírus da hepatite C encontrados dentro da população de doadores do Estado do Amazonas;
4. associar o genótipo viral encontrado com a resposta humoral, de acordo com os níveis de anticorpos quantificados através do teste Elisa (densidade DO/cut off) e Imunoblot (presença e intensidade das bandas);
5. relacionar os genótipos encontrados com o perfil da resposta imunológica celular, através de marcadores de superfície celular e dosagem de citocinas;
6. associar o genótipo viral encontrado com manifestações clínicas dos indivíduos portadores.

III. Sumário do projeto

Descrição e caracterização da amostra: serão incluídos 160 doadores de sangue da capital ou do interior do Estado do Amazonas, com sorologia positiva nos teste de triagem para anti-HCV.

Critérios de inclusão e exclusão: **Inclusão:** serão incluídos 160 doadores de sangue, ambos os sexos, acima de 18 anos, da capital ou do interior do Estado do Amazonas, com sorologia positiva nos teste de triagem para anti-HCV.



Exclusão: serão excluídos os doadores com sorologia positiva para os marcadores da hepatite B, HIV, HTLV, Doenças de Chagas, Sífilis e doadores que após a repetição do teste anti-HCV com nova amostra apresentarem resultado negativo.

Adequação da metodologia: será um estudo descritivo observacional, transversal, com delineamento tipo detecção de casos para caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores com sorologia positiva para HCV.

IV. Comentários do CEP:

Este projeto foi reapresentado ao CEP em 18.03.05 e obteve parecer aprovado, sendo em seguida encaminhado a CONEP por se tratar de projeto de área temática especial, grupo I, em 05.05.05 emitiu parecer pendente com as seguintes considerações:

O estudo dever ser adequado às normas da Resolução CNS 347/05, já que o estudo irá dispor de armazenamento de material biológico para estudos posteriores e informar onde será armazenado o material;

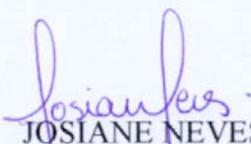
Informar a razão pela qual o estudo foi classificado como área temática especial de biossegurança.

As pesquisadoras estão enviando o TCLE com os ajustes referentes o armazenamento de material biológico; inclusão de justificativa quanto a necessidade de armazenamento para futuros estudos, norma instituída pela FHEMOAM e declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material biológico armazenado será submetido a aprovação do CEP.

V. Parecer do CEP: Projeto Aprovado.

VI. Data da Reunião: 15. 07.2005

VII. Data do parecer: 15.07.2005


 JOSIANE NEVES
 Secretária CEP/HEMOAM

ANEXO F



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.09.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **766/06**, intitulado:

"Caracterização e distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C (HCV) em infecção de doadores de sangue do Estado do Amazonas" apresentado pelo Departamento de DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS.

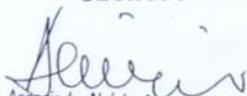
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

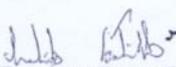
Pesquisador(a) Responsável: Dr(a): José Eduardo Levi (Orientadora)

Pesquisador(a) Executante: Sr(a): Kátia Luz Torres Silva (pós-graduanda)

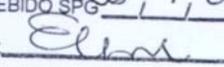
Ciente:

CAPPesq, 13 de Setembro de 2006.


 Prof. Associado Aluisio Augusto Cotrim Segurado
 Coordenador da Comissão de Pós-Graduação "stricto-sensu"
 Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
 Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo


 PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Presidente da Comissão de Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

RECEBIDO SPG 26,9,06

ASS. 

REFERÊNCIAS

ANNICCHIARICO, B.E., SICILIANO, M., AVOLIO, A.W., CARACCILO, G., AGNES, S., CASTAGNETO, M. **Treatment of chronic Hepatitis C Virus infection with Pegylated Interferon and Ribavirin in cirrhotic patients awaiting liver transplantation.** Transplantation Proceedings, 2008; v. 40, p.1918-20.

ALENCAR, R.S.M., GOMES, M.M.S., SITNIK, G.R., PINHO, J.R.R., MALTA, F.M., MELLO, I.M.V.G.C., MELLO, E.S., BACCHELLA, T. MACHADO, M.C.C., ALVES, V.A.F., CARRILHO, F.J. **Low occurrence of occult hepatitis B virus infection and high frequency of hepatitis C virus genotype 3 in hepatocellular carcinoma in Brazil.** Brazilian Journal of Med and Biol Research, 2008; v.41, p.235-40.

ALMEIDA, C.M.O. **Avaliação da resposta imune associada a manifestações neurológicas e comportamentais do sono em pacientes com Hepatite C** [dissertação]. Manaus: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas; 2007.

ALTER, M.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWCZYNSKI, K. *et al.* **Clinical outcome and risk factors associated with hepatitis C in the United States.** Hepatology, 1989; v.10, p.581.

ALTER,M.J.; KUHNERT,W.L.; FINELLI,L. **Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus.** MMWR Recommendations and Reports, 2003; v. 52 (RR03), p.1-16.

ALVARIZ,F.G.**Hepatite C crônica: aspectos clínicos e evolutivos.** Moderna Hepatologia, 2004; Ano 30, ed. Especial: 20-32.

AMORIM,R.M.S; OLIVEIRA,C.P; WYANT,P.S; CERQUEIRA,D.M;
CÂMARA,G.N.L; FLORES,L.S; MARTINS,R.M.B; MARTINS,C.F.
Hepatitis C virus genotypes in Blood donors from the Federal District, Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004; v.99(8): 895-897.

ANDRADE, A.F.B.; OLIVEIRA-SILVA, M.; SILVA, S.G.C *et al.*
Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2006; v. 101(6), p. 673-676.

ARUMUGASWAMI, V., REMENYI, R., KANAGAVEL, S., SUE, EY., HO, TN.
et al. **High-resolution functional profiling of Hepatitis C Virus genome.** PloS Pathog., 2008; v.40(10): e1000182.
doi:10.1371/journal.ppat.1000182.

BACCHETTI, P., TIEN,P.C., SEABERG,E.C., O'BIEN,T.R.,
AUBENBRAUN,M.H., KRAL,A. BUSCH,M.P., EDLIN,B.R. **Estimating**

past hepatitis C infection risk from reported risk factor histories: implications for imputing age of infection and modeling fibrosis progression. *MBC Infectious Diseases*. 2007; v.7:145-51.

BARRET, S.; KIERAN, N.; RYAN, E. *et al.* **Intrahepatic hepatitis C viral RNA status of serum polymerase chain reaction – negative individuals with histological changes on liver biopsy.** *Hepatology*, 2001; v. 33(6), p.1496-1502.

BARRETO, A.M.E.C.; TAKEI,K.; SABINO,E.C. *et al.* **Cost-effective analysis of different algorithms for the diagnosis of hepatitis C virus infection.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2008; v.41, p 126-134.

BASSIT, L.; KLETER, B.; SANTOS, G.R. *et al.* **Hepatitis C virus: prevalence and sequence analysis in blood donors of São Paulo, Brazil.** *Vox Sanguinis*, 1998; v.74, p.83-87.

BENVEGNÙ, L., GIOS, M., BOCCATO,S., ALBERTI, A. **Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complication.** *Gut*, 2004; v. 53: 744-9.

BERNARDIN, F.; TOBLER, L.; WALSH, I. *et al.* **Clearance of hepatitis C virus RNA from the peripheral blood mononuclear cells of blood**

donors who spontaneously or therapeutically control their plasma viremia. *Hepatology*, 2008; v. 47(5), p.1446-52.

BERQUO, E. S.I; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB; SABINA, L. D. – **BIOESTATÍSTICA.** São Paulo: Epu; 1980.

BHOPALE,G.M. & NANDA,R.K. **Prospects for Hepatitis C vaccine.** *Acta Virologica*, 2004; v. 48: 215-221.

BLACKARD, J.T.; HIASA, Y.; SMEATON, L. *et al.* **Compartmentalization of Hepatitis C Virus (HCV) during HCV/HIV coinfection.** *Journal of Infectious Diseases*, 2007; v. 195, p. 1765-73.

BLACKARD, J.T.; KREMMER, N. SHERMAN, K. **Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences.** *Hepatology*, 2006; v. 44, p.15-22.

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

BRADLEY, D.W. & MAYNARD, J.E. **Etiology and natural history of post-transfusional enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.** *Semin. Liver Dis*, 1996; V.6, p.56-66.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 343 de 13 de dezembro de 2002. Substitui a portaria nº 1.376, retirando obrigatoriedade de realizar o teste Chagas Hemaglutinação e dosagem de ALT para triagem de doadores de sangue. **Diário Oficial**. Brasília, nº 245, 19 dez. 2002. Seção 1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria no721/GH, de 09 de agosto de 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. **Diário Oficial**. Brasília, nº 229, 2 dez. 1993. Seção 1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 153

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hepatites Virais: O Brasil está atento**. Serie B. Textos básicos de Saúde. Brasília, Ministério da Saúde, 2005.

BRUNO, S., SILINI, E., CROSIGNANI, A., BORZIO, F. LEANDRO, G., BONO, F. *et al.* **Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study**. *Hepatology*, 1997; v. 25: 754-58.

BRUNO, S. CROSIGNANI, A. MAISONNEUVE, P., ROSSI, S., SILINI, E., MONDELLI, M.U. **Hepatitis C Virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with**

cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology*, 2007; v. 46: 1350-6.

BUKH,J., MILLER,R.H. & PURCELL,R.H. **Biology and genetic heterogeneity of hepatitis C virus.** *Clinical and Experimental Rheumatology*, 1995; v.13 (Suppl.13):S3-S7.

BUSCH M.P., GLYNN,S.A. , STRAMER,S.L. et al. **Correlates of hepatitis C (HCV) RNA negativity among HCV-seropositive blood donors.** *Transfusion*, 2006; v.46: 469-475.

BUSCH,M.P; GLYNN,S.A; STRAMER,S.L *et al.* **A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors.** *Transfusion*, 2005; v.45: 254-64.

CAMPIOTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J. *et al.* **Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil.** *Braz. J. of Medical and Biol. Research*, 2005; v. 38, p.41-49.

CANDOTTI, D., TEMPLE,J., SARKIDIE,F. ALLAIN,JEAN-PIERRE. **Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West Africa.** *Journal of Virology*, 2003; v.77 (14): 7914-7923.

CANTALOUBE,J.F; GALLIAN,P; ATTOUI,H; BIAGINI,P; DE MICCO,P; DE LABALLERIE,X. **Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France.** J Clin Microbiol, 2005; v.43(8): 3624-3629.

CAVALHEIRO, N.P. **Análise dos sorotipos do HCV identificados em pacientes da cidade de São Paulo, através do método imunoenzimático.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2000; v. (42) 1:8, p.25-30.

CAVALHEIRO, N.P. **Sexual transmission of hepatitis C.** Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2007; v. 49(5), p. 271-77.

CAVALHEIRO, N.P.; BARONE, A.A.; TENGAN, F.M. **HCV serotypes in Brazilian patients.** Int. J. Infect. Dis., 2002; v.6, p. 228-232.

CAVALHEIRO, N.P.; FILGUEIRAS, T.C.; MELO, C.E. *et al.* **Detection of HCV by PCR in serum and PMBC of patients with hepatitis C after treatment.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2007; v. 11(5), p. 471-474.

CDC. **Acute Hepatitis C virus infections attributed to unsafe injection practices at an endoscopy clinic – Nevada, 2007.** Weekly, 2008; v.57(19), p. 513-517.

CHLABICZ, S.; BONIFATIUK, I.; RADZIWON, P. **Prevalence of hepatitis C virus antibodies among blood donors in north-eastern Poland.**

Hepatology Research, 2005; v.33, p. 206-210.

CHOO, Q.L., PINHO, J.R.R. **Virologia Molecular. Variabilidade Viral.** In Focaccia, R. Tratado de Hepatites Virais. São Paulo: Atheneu, 2003; 195-204.

CHOO,Q.L., KUO,G., WEINER,A.J. *et al.* **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.** Science, 1989; v.244: 359-62.

CHOO,Q.L., RICHIMAN,K.H., HAN,J.H. *et al.* **Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus.** Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1991, 88:2451-5.

CIORLIA, L.A.S & ZANETTA, D.M.T. **Hepatite C em profissionais da saúde: Prevalência e associação com fatores de risco.** Rev. Saúde Pública, 2007; v. 41(2), p.229-35.

CONTREAS, A.M.; TINOCO,E.; CELIS,A. *et al.* **Hepatitis C antibody intraassay correlation: is retest in duplicate necessary?** Transfusion, 2007; v. 47, p. 1686-90.

CRAMP,M.E., CARUCCI,P., UNDEHILL,J., NAOUMOV N.V., WILLIAMS,R.
DONALDSON,P.T. **Association between HLA class II genotype and
spontaneous clearance of hepatitis C viraemia.** J. Hepatol., 1998;
29:207-213.

CUADRA-SÁNCHEZ,C.; MORONTA-PIÑANGO,R.; CÓRDOVA-
VILLANUEVA,E. *et al.* **Seroprevalencia del vírus de Hepatitis C (VHC)
em pacientes del Laboratorio Regional de Referencia Viroológica
(Maracaibo, Venezuela).** Ver. Gastroenterol. Peru, 2005; v.25: 248-253.

DIAMENT, D. **Aspectos epidemiológicos da Hepatite C no Brasil. I
Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o manuseio
e terapia da Hepatite C.** Sociedade Brasileira de Infectologia, 2008.

DIEPOLDER, H. M.; ZACHOVAL, R.; HOFFMANN, R. M. *et al.* **Possible
mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural
protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection.**
Lancet, 1995; v.346(14), p.1006-07.

ECHEVARRÍA, J.M. & LEON,P. **Epidemiology of viruses causing chronic
hepatitis among populations from the Amazon Basin and related
ecosystems.** Cad. Saude Publica, 2003; v.19(6): 1583-91.

ENGEL, M., MALTA, F.M., GOMES, M.S., et al. **Acute hepatitis C virus infection assessment among chronic hemodialysis patients in the Southwest Paraná State, Brazil.** BMC Public Health, 2007; v.7 (50).

ESPINOSA, M., MARTIN-MALO, A., OJEDA, R. **Marked reduction in the prevalence of hepatitis C virus infection in HD patients: causes and consequences.** Am. J. Kidney Dis., 2004; 43(4): 685-9.

ESTEBAN, J.I.; GONZALES, A.; HERNANDES, J.M. *et al.* **Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a contemporary study of transfusion-associated hepatitis.** N. Engl. J. Med., 1990; v.323, p.1107-12.

FANG, C.T.; TOBLER, L.H.; HAESCHE, C. *et al.* **Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor.** Transfusion, 2003; v. 43, p. 541-544.

FEITOSA, I.M.L. **Perfil de citocinas séricas e genótipos do vírus da Hepatite C em pacientes submetidos a hemodiálise** [dissertação]. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2008.

FELD, J.J. & LIANG, T.J. **HCV persistence: cure is still four letter word.** Hepatology, 2005; v. 41, p. 23-25.

FERREIRA,C.T.; SILVEIRA,T.R. **Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção.** Rev. Bras. Epidemiol.v. 7,n.4, 2004.

FOCACCIA, R.; DA CONCEIÇÃO, O.J.; SETTE Jr., H. *et al.* **Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population.** Braz. J. Infect. Dis., 1998; v. 2, p.269-284.

FOCACCIA,R; BARALDO,D.C.M; FERRAZ,M.L.G. *et al.* **Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil.** The Brazilian Journal of Infections Diseases, 2004; v. 8(5): 348-355.

FREEMAN,A.J., MARINOS,G., EFRENCH,R.A., LLOYOS,A.R. **Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection.** Immunol.Cell.Biol, 2001; v. 79: 515-536.

GERVAIS, A. **Quantitation of hepatic hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. Relationship with severity of disease, viral genotype and response to treatment.** Journal of hepatology, 2001; v.35, p.399-405.

GHOSN, J.; LERVEZ, M.; CHAIX, M.L. *et al.* **Sexual transmission of hepatitis C virus.** Press Med, 2005; v.34, p. 1034-8.

GODIN, G.; CONNE, M. SHERAN, P. *et al.* **Determinants of repeated blood donation among new and experienced blood donors.** Transfusion, 2007; v. 47, p.1607-15.

GOLÇALES, N.S.L.; COSTA, F.F.; VASSALLO, J. *et al.* **Diagnosis of hepatitis C virus in Brazilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: comparison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2000; v.42 (5), p. 263-67.

GONÇALES JR., F.L. **Prospective clinical and epidemiological evaluation of anti-HCV reagent blood donors candidates.** Rev. Soc. Bras. de Med. Trop, 1999; v.32(3), p.315-317.

GONÇALES JR., F.L.; STUCCHI, R.S.B; PAVAN, M.H.P. *et al.* **A clinical, epidemiological, laboratorial and ultrasonographical evaluation of anti-HCV EIA-2 positive blood donors.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2000a; v. 42(3), p.147-152.

GONÇALES JR., F.L.; STUCCHI, R.S.B; PAVAN, M.H.P. *et al.* **Hepatitis C virus in monozygotic twins.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2000b; v.42(3), p.163-165.

GONÇALES, N.S.L. **Hepatite C em doadores de sangue: Diagnóstico por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase e sua correlação com os testes imunoenzimáticos e “imunoblot”recombinante.** Dissertação (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997.

GRÜNER, N. H., GERLACH, T. J., JUNG, M.C. *et al.* **Association of hepatitis C virus-Specific CD8⁺ T cell with Viral Clearance in Acute Hepatitis C.** The Journal of Infectious Disease, 2000; v.181, p.1528-36.

GUIMARÃES, T., GRANATO,C.F.H., VARELA, D. *et al.* **High prevalence of hepatitis C infection in a Brazilian prison: Identification of risk factors for infection.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2001; v.5(3), p.111-18.

HAHN, J.A.; PAGE-SHAFER, K.; LUM, P.J. *et al.* **Hepatitis C virus infection and needle exchange use among young injection drug users in San Francisco.** Hepatology, 2001; v.34(1) p.180-186.

HAN, J.H.; SHYMALA, V.; RICHMAN, K.H.; *et al.* **Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5´ untranslated region and poly (A) tails at the 3´ end.** Proc Natl Acad Sci USA, 1991; v. 88:1711-15.

HARRIS, H.E.; ELDRIDGE,K.P.; HARBOUR, S. *et al.* **Does the clinical outcome of hepatitis C infection vary with the infecting hepatitis C virus Type?** Journal of Viral Hepatitis, 2006; v. 14, p. 213-20.

HATZAKIS, A.; KATSOULIDOU, A.; KAKLAMANI, E. *et al.* **Hepatitis C vírus genotype in HCV-related carcinogenesis: a case-control study.** Int J Câncer, 1996; v. 68(1): 51-53.

HELLER,T. & REHERMANN,B. **Acute Hepatitis C: a multifaceted disease.** Seminars in Liver Disease, 2005; v.25, p. 7-17.

HWANG,L.; KRAMER,J.R.; TROSI,C. *et al.* **Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and B virus infections in a low-risk population.** Hepatology, 2006; v. 44: 341-351.

HYLAND, C.; SEED, C.R.; KIELY, P. *et al.* **Follow-up of six blood donors highlights the complementary role and limitations of hepatitis C virus antibody and nucleic acid amplification tests.** Vox Sanguinis, 2003; v.85, p.1-8.

IBGE, 2007. www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php.

JAISWAL, S.P.B.; CHITNIS, D.S.; JAIN, A.K. *et al.* **Prevalence of hepatitis C viruses among multi-transfused homogenous thalassaemia patients.** Hepatology Research, 2001; v.19, p. 247-253.

JAIN, S.; GOHARKHAY, N., SAADE, G. *et al.* **Hepatitis C in pregnancy.**

Am. J. Perinatal, 2007; v. 2, p. 251-6.

KLEINMAN,S.H.; STRAMER,S.L.; BRODSKY,J.P. *et al.* **Integration of**

nucleic acid amplification test result into hepatitis C supplemental

serologic testing algorithms: implications for donor counseling and

revision of existing algoritms. Transfusion, 2006; v.46,p.695-702.

KOATE, B.B.; BUSERI, F.I.; JEREMIAH, Z.A. **Seroprevalence of hepatitis**

C virus among blood donors in River State, Nigeria. Transfusion

Med, 2005; v. 15(5), p. 449-51.

KRYEZKA,W; WALEWSKA-ZILECKA,B; DUTIKIEWICZ,E. **Acute**

seronegative hepatitis C manifesting itself as adult gigant cell

hepatitis – a case report and review of literature. Med. Sci. Monit,

2003; v.9 (Suppl 3):20-31.

KUIKEN,C., MIZOKAMI,M, DELEAGE,G, *et al.* **Hepatitis C database,**

principles and utility to researches. Hepatology, 2006; v.43 (5):1157-

1165.

KUO, G.; GHOO, Q.L.; ALTER, H.J. *et al.* **An assay for circulating**

antibodies to a major etiologic virus of human non A, non B

hepatitis. Science, 1989; v. 244, p. 362-364.

- LAUER, G.M. & WALKER, B.D. **Hepatitis C virus infection**. New England Journal of Medicine, 2001; v.345, p.41-52.
- LAVILLETTE,D; MORICE, Y; GERMANIDIS,G. *et al.* **Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection**. Journal of Virology, 2005b; v.79(10): 6023-6034.
- LAVILLETTE,D; TARR,A.W; VOISSET,C. *et al.* **Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis c virus**. Hepatology, 2005a; v. 41(2): 265-274.
- LEFRÉRE, J; GIROT, R.; LEFRÉRE, F. *et al.* **Complete or partial seroreversion in immunocompetent individuals after self-limited HCV infection: consequences for transfusion**. Transfusion, 2004; v. 44, p.343-348.
- LEVI, J.E.; TAKAOKA, D.T.; GARRINI, R.H. *et al.* **Three Cases of Infection with Hepatitis C Virus Genotype 5 among Brazilian Hepatitis Patients**. J. Clin. Microb., 2002; v. 40 (7), p. 2645-2647.
- LERAT, H. & HOLINGER, F.B. **Hepatitis C virus (HCV) occult infection or occult HCV RNA detection?** J. Infect. Dis, 2004; v. 189, p.3-6.

LIU, J.; LIN,H.; LIU,Y. *et al.* **Extremely high prevalence and genetic diversity of hepatitis C virus infection among HIV-infected injection drug users in Taiwan.** *Clinical Infectious Diseases.* 2008; 46.

LOPES, E.P.A., GRANATO, C.H. LANZONI,V. *et al.* **Evaluation of an Enzyme Imunoassay of Hepatitis C virus antibody detection using a recombinant protein derived from the Core region of hepatitis C virus genome.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 2000; v.95(5), p. 717-720.

MARTINS, M.B.; TELES, S.A.; FREITAS, N.R. *et al.* **Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,* 2006; v. 48(1), p. 43-55.

MATHEÏ, C.; WOLLANTS,E.; VERBEECK,J. *et al.* **Molecular epidemiology of hepatitis C among drug users in Flanders, Belgium: association of genotype with clinical parameters and with sex- and drug-related risk behaviours.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis,* 2005; v.24: 514-522.

MENDES-CORREA MC & BARONE A.A. **Hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus. A review and experience of a Brazilian ambulatory.** *Rev Inst Med Trop São Paulo,* 2005; 47(2):59-64

MENEGAZZI, P., REHO, E., ULIVI, M., VARNIER, O.E., LILLO, T.B., TAGLIAFERRO, L. **Rapid and accurate quantification of different HCV genotypes by LightCycler Real Time PCR and direct sequencing of HCV amplicons.** *New Microbiol*, 2008; 31(2):181-7.

MEYER, M.F.; LHAMANN, M.; CORNBERG, M. *et al.* **Clearance of low levels of HCV viremia in the absence of a strong adaptative immune response.** *Virology Journal*, 2007, v.4:58, p.1-11.

MORALES, J.M. **Hepatitis C virus Infection and Renal Transplantation.** *Transplantation Proceedings*, 1999; v. 31, p. 2221-2224.

MORAND, P; DUTERTRE, N; MINAZZI, H *et al.* **Lack of seroconversion in a health care worker after polymerase chain reaction-documented acute hepatitis C resulting from a needlestick injury.** *Clin. Infection Dis*, 2001; v.33: 727-729.

MOREIRA, R.; PINHO, J.R.R.; FARES, J. *et al.* **Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies.** *Can. J. Microbiol*, 2003; v.49, p. 503-7.

MOSLEY J.W.; OPERKALSKI, E.A.; TOBLER, L.H. *et al.* **The course of hepatitis C viraemia in transfusion recipients prior to availability of antiviral therapy.** *Journal of Viral Hepatitis*, 2008; v. 15, p. 120-28.

MULLIS ,K.B. & FALOONA, F.A. **Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalysed chain reaction.** Methods in Enzymology, 1987; v. 155, 335-350.

MULLIS, K.B., FALOONA, S.S., SAIKI, R. *et al.* **Specific enzyme amplification of DNA in vitro: The Polymerase chain reaction.** Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1986; v.51(1): 263-273.

NAGHETTINI, A.V.; DAHER, R.R.; MARTIN, R.M.B. *et al.* **Soroprevalência do vírus da hepatite C na população em diálise de Goiânia, GO.** Rev. Soc. Bras. de Med. Trop., 1997; v.30(2) p.113-117.

NARKEWEICZ, M. R.; CABRERA, R. GONZÁLEZ-PERALTA, RP. **The “C” of viral hepatitis in children.** Semin Liver Dis, 2007; v.27(3), p. 295-311.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT: **Management of hepatitis C: 2002 – June 10-12, 2002.** Hepatology, 2002; v.36, p.S3-S20.

NETSKI,D.M; MOSBRUGER,T; DEPLA,E. *et al.* **Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection.** Clin. Infec.Dis, 2005; v.41: 667-675.

NOWAKOWSKA,B. & KACPRZAK-BERGMANN,I. **Association between HLA antigens and hepatitis C (HCV) infection.** Postepy. Hig Med. Dosw, 2004; v.58: 458-462.

OETHINGER,M., MAYO,D.R., FALCONE,J. *et al.* **Efficiency of the Ortho VITROS assay for detection of hepatitis C virus-specific antibodies increased by elimination of supplemental testing of samples with very low sample-to-cut-off ratios.** J. Clin. Microbiol, 2005; v.43, p. 2477-80.

OKAMOTO, H.; OKADA, S.; SUGIYAMA, Y. *et al.* **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, 1990; v. 60:215-222.

OLIVEIRA, M. L. A.; BASTOS, F.I.; TELLES, P. L. *et al.* **Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil.** Braz. Jour. Med. Biol. Res., 1999; v.32 p.1107-14.

OLIVEIRA, M.L.A.; BASTOS, F.I.; SABINO, R. R. *et al.* **Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil.** Braz. Jour. Med. Biol. Res., 1999; v.32 p.279-282.

- ORLAND, J. R.; WRIGHT, T. L. & COOPER, S. **Acute hepatitis C.** Hepatology, 2001; v.33(2) p.321-326.
- PAGE-SHAPER, K.; PAPPALARDO, B.L.; TOBLER, L.H. *et al.* **Testing strategy to identify cases of acute Hepatitis C virus (HCV) infection and to project HCV incidence rates.** Journal of Clinical Microbiology, 2008; v.46,p. 499-506.
- PALTANIN, L.F. & REICHE, E.M.V. **Seroprevalência de anticorpos antivírus da hepatite C em doadores de sangue, Brasil.** Rev. Saúde Pública, 2002; v. 36(4), p. 393-9.
- PARANÁ, R.; LYRA, L.G. *et al.* **Hepatite crônica pelo vírus C.** Manual de Diagnóstico e tratamento das Doenças Hepáticas no paciente adulto e pediátrico, 1999; v.1 p.51-59.
- PARANÁ, R.; PAIVA, T.; LEITE, M.R. *et al.* **Infection with hepatitis C virus among health care workers in the brazilian western Amazon region (Rio Branco, State of Acre).** Am. J. Trop. Med. Hyg., 2007; v. 76(1), p.165-69.
- PEREIRA, B.J.G.; MILFORD, E.; KIRMAN, R.L. **Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation.** N. Engl. J. Med., 1991; v.325, p.454-460.

PERZ,J.F.; FARRINGTON,L.A.; PECORATO,C. *et al.* **Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection.** 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Boston,MA, USA, 2004; Sept 30-Oct 3.

PETIT, J.M.; BOUR, J.B; GALLAND-JOS, C. *et al.* **Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C.** Journal of Hepatology, 2001; v.35 p.279-283.

PHAM, T.N.Q.; MacPARLAND, S.A.; MULROONEY, P.M. *et al.* **Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of Hepatitis C.** Journal of Virology, 2004; v.78, p.5867-74.

PLANCOULAIN, S.; MOHAMED, M.K.; ARAFA, N. *et al.* **Dissection of familial correlations in hepatitis C virus (HCV) seroprevalence suggests evidence for intrafamilial viral transmission and genetic predisposition to infection.** Gut, 2008, (in press).

POWER,J.P., LAWLOR,E., DAVIDSON,F. *et al.* **Hepatitis C viraemia in recipients of Irish intravenous anti-D immunoglobulin.** Lancet, 1994; v.344 p. 2266-1167.

PUOTI, C., CASTELLACCI,R., MONTAGNESE, F., *et al.* **Histological and virological features and follow-up of Hepatitis C virus carriers with**

normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). J. Hepatol, 2002; v.37(1): 117-23.

RADKOWSKI, M.; GALLEGOS-OROZCO, J.F.; JABLONSKA, J. *et al.*
Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. Hepatology, 2005; v.41, p.106-114.

ROBERTSON.B., MYERS,G., HOWARD,C. *et al.* **Classification, nomenclature and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization.** Arch. Virol., 1998; v.143: 2493-2503.

ROSSINI, A.; GAZZOLA, G.B.; RAVAGGI, A. *et al.* **Long-term follow-up of and infectivity in blood donors with hepatitis C antibodies and persistently normal alanine aminotransferase levels.** Transfusion, 1995; v.35, p.108-111.

SAÉZ-ALQUEZAR A.; BASSIT, L.; SABINO, E.C. **Hepatites virais.** In: Ferreira A., Ávila, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001; p. 74-91.

SEEFF, L.B; HOLLINGER, F.B; ALTER, H.J *et al.* **Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C**

hepatitis: A national Heart, Lung and Blood Institute collaborative study. *Hepatology*, 2001; v. 33: 455- 463.

SHEPARD,C.W.; FINELLI,L.; ALTER,M. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet Infection Dis*, 2005; v.5: 558-567.

SHUKLA DD, HOYNE PA,WAR CW. **Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses.** *Arch Virol.* 1995; 140 (10): 1747-61.

SIMANIS, R.; LEJNIECE, S.; SOCHNEVS, A. *et al.* **Natural clearance of hepatitis C virus in hemophilia patients.** *Medicina (Kaunas)*, 2008; v. 44 (1), p.15- 21.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C. *et al.* **Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region.** *J. Gen. Virol.*, 1993; v. 74, p. 2391-99.

SIMMONDS, P. **Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on.** *Journal of General Virology*, 2004; 85: 3173-3188.

SIMMONDS,P. **Variability of Hepatitis C.** *Hepatology*, 1995; v.21(2): 570-583.

SMITH, D.B.; MELLOR, J.; JARVIS, L.M.; DAVIDSON, F.; KOLBERG, J.; URDEA, M.; YAP, P.-L.; SIMMONDS, P. AND THE INTERNATIONAL HCV COLLABORATIVE STUDY GROUP. **Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing.** J Gen Virol, 1995; v. 76:1749-1761.

STAPLETON JT, SCHMIDT WN, KATZ L, **Seronegative hepatitis C virus infection, not just RNA detection.** J Infect Dis, 2004; 190(3):651-2

STRAUSS, E. & TEIXEIRA, M.C.D. **Quality of life in hepatitis C.** Liver International, 2006; v.26, p.755-765

STRAUSS, E. **Barriers to care of chronic Hepatitis patients in Latin America.** Archives of Medical Research, 2007; v.38, p.711-15.

TAKAKI, A; WIESE, M; MAERTENS, G *et al.* **Cellular immune responses persist, humoral responses decrease two decades after recovery from a single source outbreak of hepatitis C.** Nature, 2000; v. 6:578-582.

TAWK, H.M.; VICKERY, K.; BISSET, L.; LO SK, COSSART YE, THE INFECTION IN ENDOSCOPY STUDY GROUP. **The significance of transfusion in the past as a risk for current hepatitis B and hepatitis C: a study in endoscopy patients.** Transfusion, 2005; v.45(5): 807-13

- TAZIKI,O., ESPAHBODI,F. **Prevalence of Hepatitis C Virus infection in Hemodialysis patients.** Saudi J. Kidney Dis Transpl, 2008; 19(3):475-478.
- TEDDER, R.S.; GILSON, R.J.; BRIGGS, M. *et al.* **Hepatitis C virus: evidence for sexual transmission.** BMJ, 1991; v. 1 (302), p. 1299-1302.
- THAKRAL, B.; MARWAHA,N. CHAWLA,Y.K. *et al.* **Prevalence & significance of hepatitis C virus (HCV) seropositivity in blood donors.** Indian J. Med. Res., 2006; v.124, p. 431-8.
- THIMME,R., BUKH,J., SPANGENBERG,H.C., *et al.* **Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002; v.99 (24): 15661-15668.
- THOMSON, B.J. e FINCH, R.G. **Hepatitis C virus infection.** Clin. Microbiol Infection, 2005; v.11, p.86-94.
- THOMAS,D.L; ASTEMBORSKI,J; RAI,R.M *et al.* **The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and enviromenmtal factors.** JAMA, 2000; v.284: 450-456.

TOBLER, L.H.; STRAMER,S.L.; KLEINMAN, S.H. *et al.* **Misclassification of HCV-viremic blood donors as indeterminate by RIBA 3.0 because superoxide dismutase reactivity.** Transfusion, 2001; v. 41(12), p. 1625-6.

TORRES, K.L.; PAIVA, L.G.R.; SANTOS, L.N.; *et al.* **Hepatitis C: a review.** Revista HUGV – Revista do Hospital Universitário Getúlio Vargas, 2003; v. 2 n. 1, p.59-68.

TORRES-PUENTE, M., CUEVAS, J.M., JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, N. *et al.* **Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response.** Journal of viral hepatitis, 2008; v.15:188-199.

TSENG, C.; BRIEN,T.R.; MINGSONG,Z. *et al.* **Seroprevalence of hepatitis C and hepatitis B virus among San Francisco Injection drug users, 1998 to 2000.** Hepatology, 2007; v.46, 3: 666-671.

USUI, C.S.M. **Avaliação da resposta imune em doadores de sangue da cidade de Manaus infectados com o vírus da hepatite C (HCV)** [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2007.

VERBEECK, J.; PEIGUE-LAFEUILLE, H. ROIS, R.S.; *et al.* **HCV genotype 5: epidemiology and spread of an uncommon genotype.** Journal of clinical virology, 2008; v.41, p. 170-71.

VIEIRA, S. – **Bioestatística: Tópicos Avançados**. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2004, p. 216.

WANG,B; SCHREIBER,G.B; GLYNN,S.A. *et al.* **Does prevalence of transfusion-transmissible viral infection reflect corresponding incidence in United States blood donors?** Transfusion, 2005; v.45: 1089-1096.

WENDEL, S., LEVI, J.E., TAKAOKA, D.T. *et al.* **Primary screening of blood donors by NAT testing for HCV-RNA: development of an “in-house” method and results.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2007; v.49(3), p.177-185.

YANG,C.S., CHAG,H.H., CHOU,C.C., PENG,S.J. **Isolation effectively prevents the transmission of hepatitis C virus in the HD Unit.** J. Formos Med Assoc. 2004; 102(2):79-85.

YOSHIDA, C.F.T.; TAKAHASHI, C.; GASPAR, A.M.C. *et al.* **Hepatitis C virus in chronic Hemodialysis patients with non-A, non-B hepatitis.** Nephron, 1992; v.60, p.150-153.

ZACHARY, P.; ULLMANN, M.; DJEDDI, S.; *et al.* **Evaluation of three commercially available hepatitis C virus antibody detection assays**

under the conditions of a clinical virology laboratory. Journal of Clinical Virology, 2005; v. 34, p. 207-210.

ZEIN, N.N. Clinical significance of Hepatitis C virus genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**, 2000; v. 33(2): 223-235.

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

ZYLBERBERG,H. & POL, S. **Reciprocal interactions between human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections.** Clin Infect Dis, 1996; v.23, p. 1117-25.

BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS

TEIXEIRA, M.C.D., RIBEIRO, M.F.G.S., GAYOTTO,L.C.C.,
CHAMONE,D.A.F., STRAUSS, E. **Worse quality of life in volunteer
blood donors with hepatitis C**. Transfusion, 2006; v.46, p. 278-83.