

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C**

por

PATRÍCIA PAIS MARTINS

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em
Ciências em Medicina Tropical.

Orientadores:

Dr^a Livia Melo Villar

Dr^a Elisabeth Lampe

Março, 2010

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Esta Dissertação intitulada:

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C**

Apresentada por

Patrícia Pais Martins

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Titulares:

Dr. Adilson José de Almeida

Dr. Leonardo Diniz Mendes

Dr^a. Vanessa Salete de Paula

Suplentes:

Dr^a. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho

Dr^a. Flavia Barreto dos Santos

Dissertação apresentada no dia 22 de março de 2010.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hepatites Virais
do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ,
Rio de Janeiro,RJ.

DEDICATÓRIA

**Aos meus amados pais, Norberto Abrantes Martins e Marisa Pais Martins; Às
minhas queridas irmãs Mariana Pais Martins e Marina Garzon Martins;
Aos meus amigos e familiares, em especial à minha tia Margarida Rosa
Sá e meus amigos Eugênio Damasceno Hotzz e Viviane Fernandes Meneses.**

**Em especial, à minha mãe Marisa Pais Martins e aos meus avôs Alberto
Martins e José Martins (*in memoriam*).**

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana".

Louis Pasteur

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor".

Johann Wolfgang von Goethe

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer às minhas ilustres orientadoras Dr^{as} Livia Melo Villar e Dr^a Elisabeth Lampe por me ajudarem, tanto na realização desta dissertação, como na minha formação científica. E, a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte da realização deste sonho. Entre eles:

Em especial, a Dr^a Clara Fumiko Tachibana Yoshida por quem tenho um imenso carinho e eterno agradecimento, por ser responsável pelo meu ingresso nessa equipe tão comprometida com a excelência;

Ao Messias da Silva por ser sempre tão paciente e atencioso em todos os momentos em que necessitei de sua ajuda;

À Lucy Dalva da Silva por sempre estar presente como amiga e profissional em todos os momentos, me apoiando, tanto no início da minha vida científica, quanto no ingresso no mestrado;

Aos amigos Eugênio Damasceno Hottz e Viviane Fernandes Menezes que sempre estiveram presentes, fornecendo apoio durante o trabalho e na vida pessoal;

Aos amigos Allan Peres da Silva e Ilton S'Antanna por terem me recebido tão bem quando ingressei no LAHEP e, pelos ensinamentos e alegria oferecidos durante todo esse período;

Aos amigos Carlos Fernandes, Eliana Abreu e Aline Pastore do Laboratório Central Noel Nutels pela colaboração na realização das técnicas de TMA e bDNA;

A todos do Grupo de atendimento do LAHEP que realizaram o atendimento dos pacientes, coleta das amostras e armazenamento das mesmas, em especial à Dr^a Lia Laura Lewis-Ximenez, que gentilmente cedeu as amostras deste estudo e, pelos seus ensinamentos que foram de suma importância para meu crescimento científico. Ao biólogo Paulo Sergio de Sousa que auxiliou na recuperação dos dados dos pacientes incluídos neste estudo;

À doutoranda Márcia Paschoal do Espírito Santo e a técnica Vanessa Marques que me auxiliaram na realização de diversas técnicas moleculares;

À bióloga Cristiane Muniz que me orientou na busca de informações dos pacientes deste estudo no banco de dados do LAHEP;

Ao Dr. Adilson José de Almeida pelo auxílio na realização de testes estatísticos com seu bom humor e companheirismo;

À Juliana Miguel, Elisangela da Silva e Jaqueline Correia que auxiliaram na caracterização das amostras pelos testes imunoenzimáticos e, pelo companheirismo durante a jornada de trabalho e nos momentos de descontração;

À bióloga Rosane Vieira de Oliveira pela realização da genotipagem das amostras deste estudo pela técnica de RFLP;

À Nailma da Silva pela colaboração na compra de insumos para a realização deste estudo;

Ao Dr. José Júnior pelos ensinamentos passados e pela amizade;

A todas as amigas do Studio de dança, em especial minha amiga Michelle Cassiano, que durante estes dois anos me mostraram a importância da dança para a minha vida;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IOC, em especial, aos coordenadores e professores do Curso que contribuíram com ensinamentos preciosos e grande amizade durante todo o curso;

Aos amigos do mestrado em Medicina Tropical que conquistei e que me conquistaram durante esses dois anos em que dividimos muitos momentos agradáveis juntos no Instituto Oswaldo Cruz, bem como em Congressos e na inesquecível viagem para Santa Isabel do Rio Negro/Manaus;

Ao CNPq pelo apoio financeiro na forma da bolsa de estudo a mim concedida e auxílio financeiro fornecido pelo Edital Universal 2009;

E, finalmente, à minha maravilhosa mãe que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, principalmente durante a minha vida acadêmica, quando teve fundamental importância por meio dos seus ensinamentos como exemplar professora e mãe que se mostrou. Sei que mesmo ausente estará orgulhosa de mim como a mãe coruja que sempre foi;

A todos, muito obrigada.

RESUMO

O vírus da hepatite C (Hepatitis C Virus ou HCV) apresenta genoma constituído de RNA de fita simples, polaridade positiva, e pertence ao gênero *Hepacivirus* dentro da família Flaviviridae. O diagnóstico da infecção pelo HCV é feito por meio de testes sorológicos e moleculares. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de metodologias para detecção e quantificação do RNA do HCV em dois grupos de pacientes: virgens de tratamento antiviral e durante o curso da infecção aguda. Amostras de soro obtidas de 43 indivíduos reativos para anti-HCV e de um grupo de seis indivíduos com amostras seriadas coletadas durante o curso da infecção foram submetidas às técnicas qualitativas (RT-*nested* PCR, PCR-ELISA e TMA) e quantitativas (PCR-ELISA Quantitativa e bDNA) de detecção do RNA do HCV, e genotipagem por análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP). A técnica TMA apresentou a maior taxa (98%) de detecção do RNA do HCV e a técnica bDNA apresentou a menor taxa (88%) de detecção do RNA viral. Ao compararmos os resultados obtidos entre as técnicas qualitativas (RT-*nested* PCR vs PCR-ELISA) e entre os testes quantitativos (PCR-ELISA Quantitativa vs bDNA) observamos boa concordância. Na PCR-ELISA Quantitativa (COBAS® AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0) a não realização de diluição das amostras de soro com carga viral acima de 700.000 UI/mL pode ter subestimado os valores de carga viral. De acordo com a avaliação de minimização dos custos, os testes qualitativos de menor e maior custo foram RT-*nested* PCR e TMA, respectivamente, e os testes quantitativos de menor e maior custo foram COBAS® AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0 e bDNA, respectivamente. O teste TMA foi o mais sensível dentre os três ensaios qualitativos analisados. Em relação ao desempenho dos testes quantitativos nas amostras seriadas, observamos que a carga viral foi melhor determinada pelo teste COBAS® AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0, que apresentou valores de carga viral superiores aos do bDNA, chegando a apresentar diferença superior a dois logs em algumas amostras. Após avaliação da taxa de concordância das técnicas e de seus custos, foi proposto um algoritmo para detecção do RNA do HCV. Foi possível estabelecer que a RT-*nested* PCR utilizada no Laboratório de Hepatites Virais/ FIOCRUZ apresentou boa concordância com o teste qualitativo comercial PCR-ELISA, além de baixo custo quando comparado aos outros testes, mostrando assim a importância de sua validação futura.

Palavras chaves: HCV, TMA, COBAS® AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0, COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0, bDNA e RT-*nested* PCR.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) has a positive polarity, single-stranded RNA genome, and belongs to the *Hepacivirus* genus within Flaviviridae family. The diagnosis of HCV infection is made by using serological and molecular tests. The aim of this study was to evaluate the performance of methods for detection and quantification of HCV RNA in antiviral therapy-naive patients and during the course of acute HCV infection. Serum samples obtained from 43 anti-HCV reactive individuals and a group of six individuals with serial samples collected during the course of acute infection were submitted to qualitative (RT-*nested* PCR, PCR-ELISA, and TMA) and quantitative (Quantitative PCR-ELISA and branched DNA or bDNA) techniques for detection of HCV RNA, and genotyping by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis (RFLP). TMA test presented the higher rate (98%) of detection of HCV and bDNA test the lower viral RNA detection rate (88%). When we compared results obtained with qualitative (RT-*nested* PCR vs PCR-ELISA) and quantitative (Quantitative PCR-ELISA vs bDNA) techniques, a good agreement rate was observed. Performing Quantitative PCR-ELISA (COBAS[®] AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0) with non-diluted serum samples with viral load greater than 700,000 IU/mL could have underestimated viral load values. According to minimum cost assessment, qualitative tests presenting the lowest and highest costs were RT-*nested* PCR and TMA, respectively, and quantitative tests with the lowest and highest costs were COBAS[®] AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0 and bDNA, respectively. Among the three qualitative assays analyzed, TMA test was the most sensitive one. In relation to qualitative test's performance in serial samples, we observed that viral load was better established by using COBAS[®] AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0, which presented viral load values greater than those by bDNA, achieving difference above two logs in a few samples. After evaluating agreement rate among all techniques and its costs, an algorithm for detection of HCV RNA was proposed. It was possible to establish that RT-*nested* PCR used at Viral Hepatitis Laboratory/FIOCRUZ presented good agreement with the commercial qualitative PCR-ELISA, besides its low cost when compared to the other tests, thus showing the relevance of its future validation.

Key words: HCV, TMA, COBAS[®] AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0, COBAS[®] AMPLICOR HCV Test v2.0, bDNA e RT-*nested* PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático do genoma e da poliproteína do HCV -----	2
Figura 2. Representação esquemática das principais etapas do mecanismo de replicação do HCV-----	5
Figura 3. Distribuição da hepatite C no mundo-----	7
Figura 4. Perfil sorológico da infecção aguda por HCV com progressão à cronicidade -----	8
Figura 5. Esquema da reação de síntese de cDNA após ação da Transcriptase Reversa -----	11
Figura 6. Representação esquemática da reação de PCR-----	12
Figura 7. Representação esquemática da reação de TMA-----	13
Figura 8. Representação esquemática da reação de PCR-ELISA qualitativa pelo COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0.-----	14
Figura 9. Representação esquemática da reação de quantificação do RNA do HCV utilizando-se a técnica do bDNA -----	16
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose onde as bandas demonstram positividade para a reação de RT- <i>nested</i> PCR para HCV-----	28
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas que determinam o genótipo-----	38
Figura 12. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de bDNA e PCR-ELISA quantitativa (COBAS® AMPLICOR MONITOR Test v2.0) nas amostras do estudo -----	43
Figura 13. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 1-----	46
Figura 14. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 2-----	47
Figura 15. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 5-----	48
Figura 16. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 6-----	49
Figura 17. Algoritmo sugerido para a realização da detecção do RNA do HCV-----	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Características das diferentes metodologias de diagnósticos moleculares comerciais quantitativos e qualitativos-----	17
Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR -----	26
Quadro 3. Interpretação dos possíveis resultados obtidos com a PCR-ELISA quantitativa-----	35
Tabela 1. Distribuição da amostra estudada de acordo com sexo e faixa etária-----	40
Tabela 2. Características dos indivíduos que doaram amostras seriadas de soro para pesquisa do RNA do HCV (n=6)-----	41
Tabela 3. Frequência de detecção do RNA do HCV nos pacientes estudados de acordo com as diferentes técnicas moleculares empregadas-----	41
Tabela 4. Relação entre a carga viral obtida pela técnica de bDNA e os resultados obtidos pela técnica de RT- <i>nested</i> PCR-----	44
Tabela 5. Frequência de amostras reagentes fornecidas pelos indivíduos com infecção pelo HCV coletadas em diferentes períodos após o início dos sintomas-----	45
Tabela 6. Custo e tempo gasto por teste realizado-----	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpos
Ava II	Enzima de restrição isolada da <i>Anabaena variabilis</i>
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
bDNA	DNA ramificado
cDNA	DNA complementar
CN	Soro-controle HCV-RNA negativo
CP	Soro-controle HCV-RNA negativo
C _T	<i>Cycle Threshold</i>
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal (COOH) da proteína
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMS	Software para gestão de dados
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNase free	Livre de DNase
dNTP	Dinucleotídeotrifosfato
DTT	Ditiotreitol
E1	Glicoproteína do Envelope 1
E2	Glicoproteína do Envelope 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EtBr	Brometo de etídeo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HAV	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCM QS	Solução do padrão interno de quantificação
HCV	Vírus da hepatite C
HCV LYS	Solução de lise
HCV MMX	Solução de mistura
HCV Mn ²⁺	Solução de manganês
HEV	Vírus da hepatite E
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IRES	Internal ribosome entry site
IgG	Imunoglobulinas G
IgM	Imunoglobulinas M
IFN-PEG	Interferon Peguilado
LAHEP	Laboratório de Hepatites Virais
MMLV	Vírus da leucemia murina de Moloney
NC	Não codificante
NHP	Plasma humano normal
NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5A	Proteína não-estrutural 5A
NS5B	Proteína não-estrutural 5B
N-terminal	Extremidade Amino-terminal (NH ₂) da proteína
NTPase	Nucleotídeo-trifosfatase

ORF	Fase de leitura aberta
pb	Pares de bases
P7	Proteína P7
PCR ₁	RT-PCR
PCR ₂	<i>Nested PCR</i>
RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RIBA	<i>Immunoblot assay recombinante</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RNAsin	Inibidor de RNase
RPM	Rotação por minuto
Rsa I	Enzima de restrição isolada da <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tampão Tris/Acetato/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCS	Sistema de Captura do Alvo
TMA	Amplificação mediada por transcrição
TTU	Unidades de 10 tubos
UTR	Região não traduzível
3' NC	Região 3' não codificante do HCV
5' NC	Região 5' não codificante do HCV

LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Percentual
°C	Graus Celcius
=	Igual
>	Maior
<	Menor
/	Fração
±	Mais ou menos
VI	Seis (algarismo romano)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
G	Gramas
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mMol	milimolar
pmol	picomol
nm	Nanômetro
min	minutos
s	segundos
RLU	Unidade Relativa de Luz
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
<i>p</i>	Valor de probabilidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	1
1.1. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO HCV-----	1
1.2. DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HCV-----	3
1.3. MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO HCV-----	4
1.4. EPIDEMIOLOGIA-----	6
1.5. ASPECTOS CLÍNICOS E TRANSMISSÃO-----	7
1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL-----	9
1.6.1. Diagnóstico sorológico-----	9
1.6.2. Diagnóstico molecular-----	10
1.6.2.1. Detecção qualitativa do RNA do HCV-----	10
1.6.2.2. Detecção quantitativa do RNA do HCV-----	14
1.6.2.3. Genotipagem-----	18
1.7. TRATAMENTO-----	18
2. JUSTIFICATIVA-----	20
3. OBJETIVOS-----	22
3.1. OBJETIVO GERAL-----	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	22
4. METODOLOGIA-----	23
4.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS-----	23
4.2. TESTES MOLECULARES-----	23
4.3. TESTES MOLECULARES QUALITATIVOS-----	24
4.3.1. Extração do RNA viral, transcrição reversa e RT- <i>nested</i> PCR-----	24
4.3.1.1. Extração do RNA viral -----	24
4.3.1.2. Reação de transcrição reversa-----	25
4.3.1.3. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR da região 5'NC--	26

4.3.1.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR ₁)-----	26
4.3.1.5. <i>Nested</i> PCR em amostras de soro (PCR ₂)-----	27
4.3.1.6. Eletroforese em gel de agarose-----	28
4.3.2. Amplificação mediada pela transcrição (TMA) -----	29
4.3.3. PCR-ELISA qualitativa-----	31
4.4. TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS-----	33
4.4.1. PCR-ELISA quantitativa-----	33
4.4.2. DNA ramificado – Teste quantitativo comercial-----	35
4.5. GENOTIPAGEM-----	37
4.6. AVALIAÇÃO DE MINIMIZAÇÃO DE CUSTOS-----	39
4.7. ANÁLISE DOS DADOS-----	39
5. RESULTADOS-----	40
5.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE ESTUDO-----	40
5.2. DETECÇÃO DO RNA DO HCV -----	41
5.3. QUANTIFICAÇÃO DO RNA DO HCV-----	42
5.4. GENOTIPAGEM -----	44
5.5. AVALIAÇÃO DO DESEMPANHO DAS TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HCV DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO AGUDA-----	44
5.6. AVALIAÇÃO DE MINIMIZAÇÃO DE CUSTOS-----	49
6. DISCUSSÃO-----	51
6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS-----	51
6.2. AVALIAÇÃO DOS TESTES DE DETECÇÃO QUALITATIVA DO RNA DO HCV-----	51
6.3. AVALIAÇÃO DOS TESTES DE DETECÇÃO QUANTITATIVA DO RNA DO HCV-----	53
6.4. COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS-----	55
6.5. AVALIAÇÃO ECONÔMICA-----	56
6.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	57

7. CONCLUSÕES----- 59

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----- 61

1. INTRODUÇÃO

1.1. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO HCV

As hepatites virais causadas pelo vírus da hepatite A (Hepatitis A Vírus ou HAV), vírus da hepatite B (*Hepatitis B Vírus* ou HBV), vírus da hepatite C (*Hepatitis C Vírus* ou HCV), vírus da hepatite Delta (*Hepatitis D Vírus* ou HDV) e o vírus da hepatite E (*Hepatitis E Vírus* ou HEV) constituem grave problema de Saúde Pública (MELNICK & HOWARD, 1994).

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus* dentro da Família Flaviviridae e apresenta-se como partícula viral esférica com diâmetro de 65 a 75 nm. É composto por genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva, com uma única fase de leitura aberta (*Open Reading Frame* ou ORF) e cerca de 9.600 nucleotídeos (LI *et al.*, 1995). Esta fase de leitura aberta codifica uma única poliproteína que será clivada pelas proteases virais e da célula hospedeira gerando as proteínas estruturais e não estruturais do HCV (TELLINGHUSEIN *et al.*, 2007).

O genoma do HCV apresenta três regiões: a região 5' não-codificante (5' NC), uma fase de leitura aberta e uma região 3' não-codificante (3' NC) (ROSEN *et al.*, 1999). A região 5' NC é formada por 341 nucleotídeos cuja sequência é altamente conservada entre os diferentes isolados do HCV, com mais de 92% de identidade nucleotídica. Esta região apresenta uma série de estruturas secundárias, denominada de IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), responsável pela ligação do RNA viral à subunidade 40S do ribossoma, determinando o início da síntese da poliproteína viral (TSUKIYAMA-KOHARA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1993). A região 3' NC consiste em uma sequência pouco conservada de aproximadamente 40 nucleotídeos, um trato de polipirimidina (poli-U ou poli-UC) de extensão variável e uma sequência altamente conservada contendo estruturas secundárias, de aproximadamente 98 nucleotídeos chamada cauda X ou 3' X (CHOO *et al.*, 1991; HAN *et al.*, 1991). A região 3' NC possui papel importante na replicação viral (FRIEBE *et al.*, 2002). A figura 1 apresenta um modelo esquemático da composição do genoma do HCV e da poliproteína codificada pela fase aberta de leitura do genoma viral.

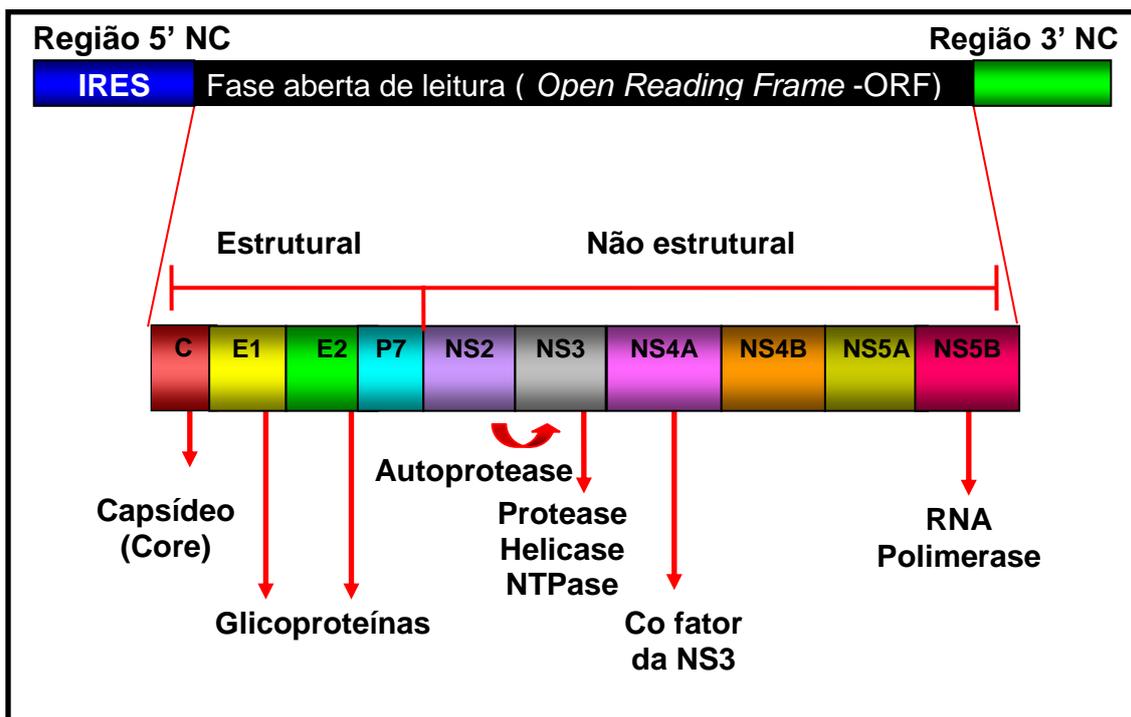


Figura 1. Modelo esquemático do genoma e da poliproteína do HCV (Adaptado de LYRA *et al.*, 2004).

A fase de leitura aberta do genoma viral codifica uma única poliproteína precursora de cerca de 3.000 aminoácidos, que será clivada para dar origem a proteínas estruturais e não estruturais. A proteína do core é uma proteína estrutural que participa da formação do nucleocapsídeo viral e, é uma das proteínas mais conservadas do HCV (CHOO *et al.*, 1991).

As duas glicoproteínas de envelope, E1 e E2, desempenham papel importante na entrada do vírus na célula através da ligação do vírus ao(s) receptor(es) da célula hospedeira e posterior indução da fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula (BARTOSCH *et al.* 2006; COCQUEREL *et al.*, 2006), além de participação na montagem das partículas infecciosas (WAKITA *et al.*, 2005).

O polipeptídeo p7 está localizado entre as proteínas estruturais e não-estruturais da poliproteína viral (LIN *et al.*, 1994; MIZUSHIMA *et al.*, 1994) e parece ser essencial para a infectividade do HCV em chimpanzés (SAKAI *et al.*, 2003).

As proteínas não-estruturais são: NS2 cuja função é formar o complexo proteolítico NS2-NS3 responsável pela clivagem autocatalítica da junção

NS2/NS3, com liberação de NS2 e NS3 (LINDENBACH *et al.*, 2001); NS3 possui atividade de serino-protease em sua extremidade N-terminal, e atividades de RNA-helicase e nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) em sua extremidade C-terminal; NS4A forma um complexo estável com NS3 e promove a clivagem da poliproteína depois da região NS3, liberando os componentes do complexo de replicação viral (LINDENBACH *et al.*, 2005); NS4B é uma proteína não-estrutural altamente hidrofóbica que parece ser parte do complexo replicativo, sendo detectada em associação com as membranas do retículo endoplasmático (HUGLE *et al.*, 2001; LUNDIN *et al.*, 2003; GRETTON *et al.*, 2005), NS5A é uma proteína que está ancorada no retículo endoplasmático através de sua parte N-terminal (PENIN *et al.*, 2004a), sendo essencial para a replicação do genoma (SEEGER *et al.*, 2005; APPEL *et al.* 2006); NS5B tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA, sendo desprovida da atividade de reparação dos erros na incorporação de novas bases (*proofreading*), o que leva a formação de *quasispecies* (BUKH *et al.*, 1995).

1.2. DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HCV

A heterogeneidade do genoma do HCV foi descrita no início da década de 1990, seguida pelo desenvolvimento de testes de genotipagem para diferenciação das variantes com consequente classificação dos isolados. Porém, somente em 1994, foram estabelecidos critérios e uma classificação universal foi consolidada, que inclui a identificação de seis grandes grupos ou genótipos virais, numerados de 1 a 6, podendo cada qual conter vários subtipos. Recentemente, um novo isolado está sendo proposto com o objetivo de ser classificado como genótipo 7 (MURPHY *et al.*, 2007). Os genótipos do HCV possuem 88 a 99% de similaridade na sequência nucleotídica, os subtipos possuem de 74 a 86%, e os isolados possuem de 56 a 72% quando analisadas sequências inteiras do genoma viral (SIMMONDS *et al.*, 1995). Além disso, variantes virais, conhecidas como *quasispecies*, se desenvolvem nos indivíduos infectados como resultado da alta taxa de mutação ocorrida durante a replicação devido a incorporação errônea de nucleotídeos pela RNA polimerase viral. Apesar da diversidade entre as sequências, todos os genótipos possuem

a mesma organização do genoma, ciclo de replicação e capacidade de estabelecer infecção persistente (SIMMONDS, 2004).

Em relação à prevalência dos genótipos do HCV, foi observado que o genótipo 1 é o mais prevalente em todo mundo, e que a presença de um único genótipo, porém com numerosos subtipos em uma região geográfica é um padrão sugestivo de um longo período endêmico de infecções. Por outro lado, a presença de mais de um genótipo do vírus, com cada um deles representado por apenas poucos subtipos pode indicar introdução recente destes isolados em áreas endêmicas (SMITH *et al.*,1997). No Brasil, o genótipo 1 é o mais prevalente seguido do genótipo 3, e em menor proporção pelo genótipo 2; porém, já foram descritos os 4 e 5 em alguns estudos (LAMPE *et al.*, 2002; CAMPIOTTO *et al.*,2005).

1.3. MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO HCV

O mecanismo de entrada do HCV na célula hospedeira ainda não foi completamente elucidado, contudo, parece que a interação entre a glicoproteína E2 e a alça extracelular da molécula CD81, uma proteína transmembrana da superfamília das tetraspaninas, tem papel importante neste processo. Além da proteína CD81, vários outros receptores celulares parecem estar envolvidos no processo de adsorção do vírus à célula hospedeira, como por exemplo: moléculas de superfície celular da superfamília CD36 denominadas SR-B1 (Scavenger receptor class B type I); receptor da lipoproteína de baixa densidade; fibronectina; glicoproteína plaquetária VI (BARTOSCH *et al.*,2006); lectinas tipo C; glicosaminoglicanas; e proteína claudina-1 (HARRIS *et al.*, 2008).

Conforme pode ser visto na figura 2, após ligação da partícula viral ao receptor celular, o vírus é internalizado por endocitose, processo este que requer a formação de vesículas (endossomos) cobertas por clatrina (HELLE *et al.*,2008). Logo após, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana endossomal liberando o genoma do HCV no citossol. O RNA viral é traduzido em proteínas estruturais e não-estruturais que induzem alterações nas membranas do retículo endoplasmático, formando uma rede membranosa chamada de "complexo de replicação" que servirá como local para a replicação

do RNA. A proteína não-estrutural NS5B em associação a este complexo e, juntamente com fatores celulares participam da replicação do RNA viral (RICE *et al.*, 2005). A replicação do RNA ocorre por meio da síntese de fitas simples de RNA complementar, de polaridade negativa, chamadas de replicativos intermediários. A seguir, os replicativos intermediários servem de molde para a síntese de fitas positivas que constituirão novos RNAs a serem incorporados às novas partículas virais. Os novos RNAs virais são então encapsidados no retículo endoplasmático formando os nucleocapsídeos, os quais são a seguir envelopados e maturados no aparelho de Golgi, antes de serem liberados no espaço pericelular por exocitose (PENIN *et al.*, 2004b). Após a infecção, o HCV se distribui rapidamente pela corrente sanguínea até os hepatócitos, porém, há evidências da presença do vírus em linfócitos, plaquetas, células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (ZIGNEGO *et al.*, 1992; FLINT *et al.*, 2001; DE ALMEIDA *et al.*, 2009).

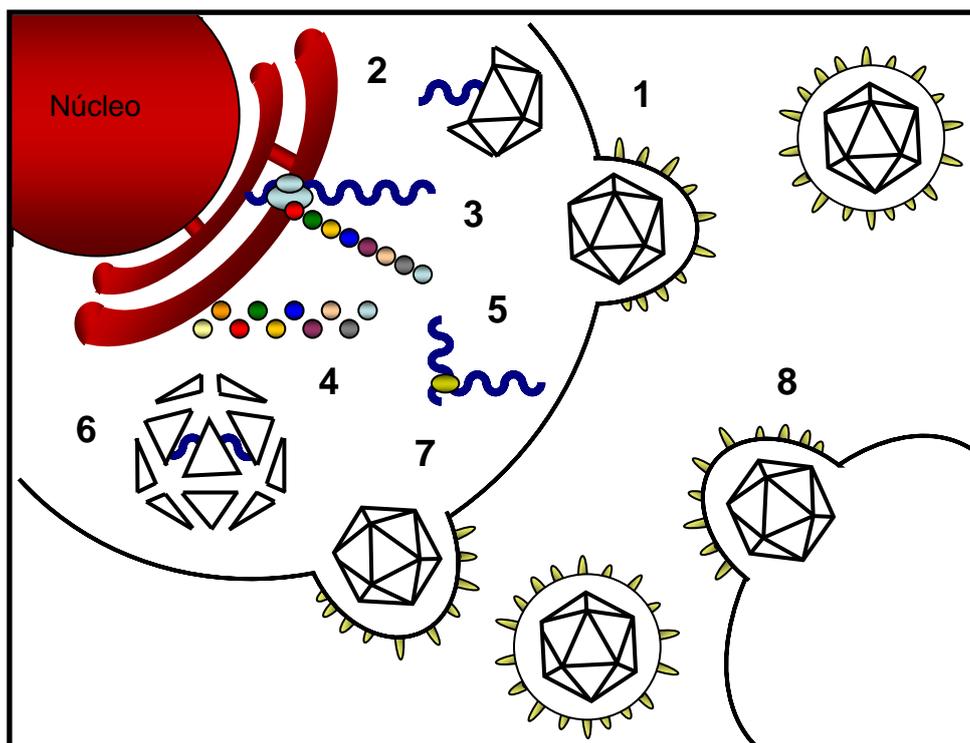


Figura 2. Representação esquemática das principais etapas do mecanismo de replicação do HCV. 1) endocitose da partícula viral após ligação com receptor celular. 2) descapsidização e liberação do genoma do HCV no citosol. 3) tradução do genoma RNA positivo em uma poliproteína. 4) proteínas virais individualizadas após o processo de clivagem. 5) replicação do RNA pela NS5B 6) formação do nucleocapsídeo e montagem da partícula viral. 7) liberação de vírions infecciosos. 8) re-infecção (Adaptado de PAWLITSKY & GISH; 2006).

1.4. EPIDEMIOLOGIA

O HCV é responsável por 90% dos casos relacionados de hepatite crônica e 25% dos casos esporádicos de hepatite aguda (MAJOR *et al.*, 2001). A prevalência global da infecção pelo HCV é 2,2%, correspondendo a cerca de 123 milhões de indivíduos infectados pelo vírus em todo o mundo, com risco de desenvolvimento de cirrose hepática e câncer de fígado (GLOBAL BURDEN OF DISEASE OF HEPATITIS C WORKING GROUP, 2004). No Brasil, existem poucos dados sobre a prevalência da infecção pelo HCV, principalmente em populações saudáveis. Através de dados obtidos da rede de hemocentros, a frequência do marcador anti-HCV foi estimada em 1,23% em pré-doadores de sangue, o que representa mais de 2,2 milhões de indivíduos infectados pelo HCV (FONSECA, 1999). Resultados preliminares do inquérito epidemiológico de caráter nacional, de base populacional, concluído em algumas macro-regiões do Brasil, mostraram uma prevalência de anti-HCV de 0,94% e 1,89%, na faixa etária de 10 e 69 anos (MS, 2008).

A prevalência de anticorpos anti-HCV tem diminuído nos últimos anos de acordo com estudos realizados em hemocentros brasileiros, com prevalências de 3,1% no Rio de Janeiro, em 1990 (LEITE *et al.*, 1992), 2,6% em Campinas, em 1993 (GONÇALES *et al.*, 1993), 1,2% em Ribeirão Preto, entre 1996 e 2001 (VALENTE *et al.*, 2005), e 0,9 % no Paraná, em 2002 (PALTANIN *et al.*, 2002). Levantamentos realizados no ano de 2002 em hemocentros brasileiros demonstraram que as taxas de inelegibilidade devido à sorologia positiva para hepatite C foram 0,5% para todo o país e de 0,5% e 0,2% na região Sudeste e no Estado de Minas Gerais (MG), respectivamente (ANVISA, 2006).

A prevalência de anti-HCV entre pacientes em hemodiálise no Brasil tem diminuído nos últimos anos, após implantação de medidas de controle de infecção em centros de diálise. Estudos realizados na região centro-oeste mostraram que a prevalência de anti-HCV diminuiu de 37,8% para 16,5% entre os anos 1999 a 2002 (CARNEIRO *et al.*, 2005; 2007).

Oliveira e colaboradores encontraram soroprevalência média trimestral de infecção pelo HCV no estado de Minas Gerais de $13 \pm 9\%$, sendo o tempo

em diálise significativamente relacionado com a soroprevalência da infecção pelo HCV (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em usuários de drogas, o marcador anti-HCV foi detectado em 7,1% em 691 amostras de sangue coletadas da região centro-oeste do Brasil. Destes, 48 foram positivos após realização do teste imunoblot, mostrando uma prevalência de 6,9% de anti-HCV; o RNA do vírus foi detectado por PCR em 85,4% das amostras anti-HCV reativas (LOPES *et al.*, 2009).

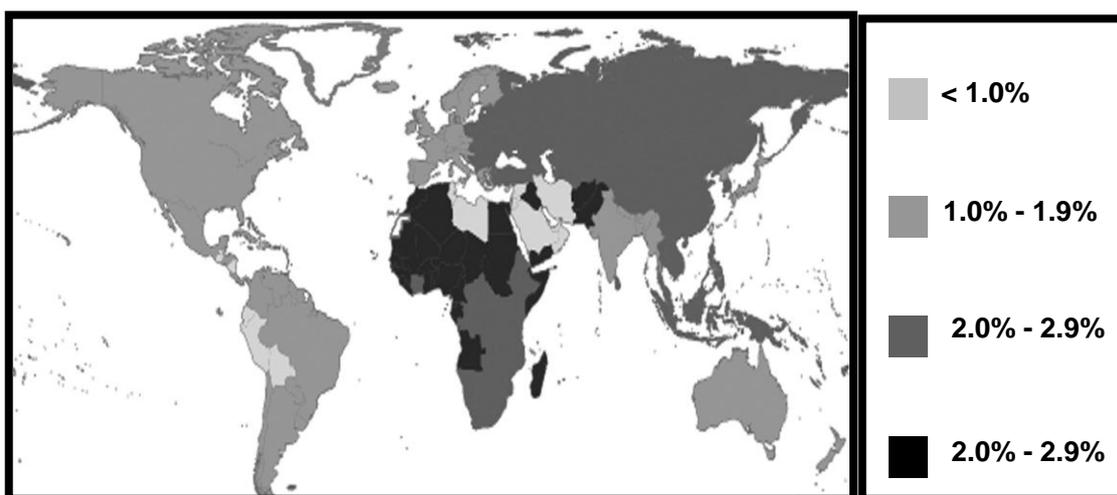


Figura 3. Distribuição da hepatite C no mundo (adaptado de ALTER *et al.*, 2007).

1.5. ASPECTOS CLÍNICOS E TRANSMISSÃO

O vírus pode ser identificado a partir da segunda semana de infecção quando é possível observar elevação da TGP (FARCI *et al.*, 1991). O período médio de incubação da infecção pelo HCV varia de 6 a 8 semanas. Infecções subclínicas são predominantes, de modo que, cerca de 95% dos casos não apresentam manifestações clínicas na fase aguda da infecção. A hepatite C crônica é definida pela persistência de viremia por mais de seis meses, o que ocorre em aproximadamente 85% dos pacientes (MAJOR *et al.*, 2001). A alta taxa de cronicidade aliada ao caráter silencioso da infecção pelo HCV leva ao desenvolvimento, ao longo dos anos, de complicações da doença hepática crônica, como a cirrose hepática descompensada e o carcinoma hepatocelular.

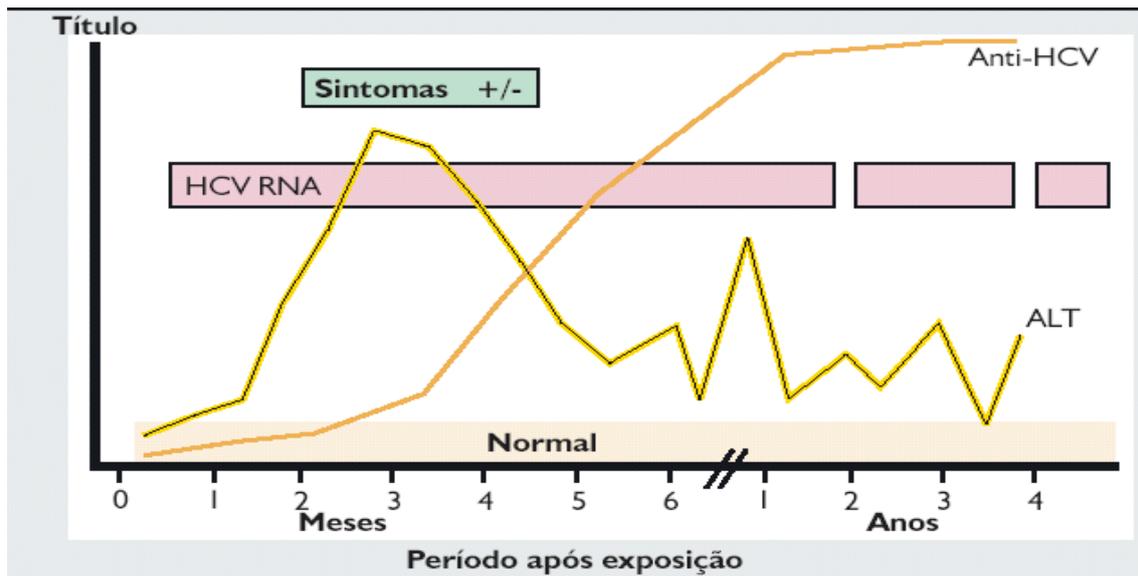


Figura 4. Padrão sorológico da infecção aguda pelo HCV com progressão à cronicidade (CDC,1999).

O HCV é transmitido, principalmente, pela via parenteral, após grandes ou repetidas exposições percutâneas diretas ao sangue (ex. transfusão ou transplante de doadores infectados pelo HCV e uso de drogas injetáveis) (CDC, 1998). A transmissão do HCV por exposição percutânea inaparente tem sido também relatada e, foi atribuída à contaminação cruzada pelo reuso de agulhas e seringas, uso de medicações endovenosas múltiplo usuário e, acessórios para uso de drogas injetáveis (HAGAN *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2004). Hoje em dia, grande parte dos indivíduos infectados é representado por usuários de drogas endovenosas e/ou intranasal ilícitas e receptores de hemoderivados (ALTER *et al.*, 2002). Em estudo realizado na região centro-oeste do Brasil, com usuários de drogas injetáveis, observou-se que entre os usuários de drogas injetáveis houve predominância do subtipo 1a (LOPES *et al.*, 2009). Casos de transmissão de HIV e HCV através de transplante hepático podem ocorrer, sendo documentado, principalmente, no período de janela imunológica (AHN & COHEN *et al.*, 2008).

Indivíduos que receberam transplante de órgãos de doadores anti-HCV positivos também representam um grupo de risco bem definido (HO, 1991). Porém, calcula-se que 40% a 50% dos indivíduos com infecção por HCV não apresentam qualquer comportamento de risco parenteral conhecido na sua história epidemiológica, identificados como casos esporádicos da infecção (STRAUSS, 2001).

1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.6.1. Diagnóstico sorológico

Desde a descoberta do HCV, em 1989, muitos avanços na área de testes para diagnóstico da hepatite C foram obtidos (CHOO *et al.*, 1989). O diagnóstico da infecção pelo HCV é feito através de testes que visam a detecção de anticorpos anti-HCV e do RNA viral.

O teste imunoenzimático de detecção de anticorpos anti-HCV apresenta como vantagens o fácil manuseio, rapidez no processamento, alta confiabilidade e custo relativamente baixo; a sua utilização na triagem de amostras em bancos de sangue se tornou obrigatória no Brasil a partir de 1993 (MS, 1993).

Os testes de detecção de anticorpos anti-HCV foram sendo aprimorados nos últimos anos. O primeiro teste utilizado, ELISA de primeira geração (ELISA I) (não mais utilizado na prática clínica), tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3, com sensibilidade de 80% (GRETCH *et al.*, 1992). A segunda geração dos testes ELISA (ELISA II) foi desenvolvida em 1992, nos Estados Unidos (ALTER *et al.*, 1992), com a incorporação de duas proteínas recombinantes do HCV: c22-3 (derivada da região estrutural, ou core) e c33-c (derivada da região não estrutural NS3). A proteína c33-c foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200, aumentando a sensibilidade, a especificidade, e, dessa forma, reduzindo o tempo médio de detecção de anticorpos durante o período de soroconversão, conhecido como janela imunológica. No teste ELISA de terceira geração (ELISA III) foram incluídos antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e adicionado um antígeno da região NS5. A principal vantagem desta nova geração foi a redução do tempo médio de detecção de anticorpos durante o período de soroconversão (GRETCH *et al.*, 1997), além do aumento na sensibilidade e especificidade (UYTTENDAELE *et al.*, 1994; BARRERA *et al.*, 1995). A detecção precoce também pode ser realizada pelo teste de quarta geração, já disponível no mercado, que detecta simultaneamente o antígeno core do HCV e anticorpos anti-core e anti-NS3 em amostras de soro ou plasma, permitindo redução do período de janela

imunológica e demonstrando alta sensibilidade e especificidade (LAMBERT, 2007; TUKE *et al.*, 2008).

1.6.2. Diagnóstico molecular

Em muitas infecções, o isolamento do patógeno em cultura celular é um instrumento útil para estabelecer o seu diagnóstico, entretanto, a cultura de células para propagação do HCV é extremamente difícil e, por este motivo, ensaios moleculares foram desenvolvidos para detectar, quantificar, e/ou caracterizar o genoma do HCV em indivíduos infectados. Os ensaios moleculares para a hepatite C podem ser divididos em três categorias gerais: 1) testes que detectam a presença do genoma do HCV no plasma ou soro (testes qualitativos); 2) testes que avaliam a quantidade de RNA do HCV em amostras de plasma ou soro (testes quantitativos); 3) testes que determinam o genótipo do vírus (testes de genotipagem) (GRECHT *et al.*, 1997).

A detecção do RNA viral tornou-se ferramenta essencial para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCV, já que a detecção de anticorpos não distingue infecção passada de presente. Suas vantagens incluem a possibilidade do diagnóstico precoce da infecção viral aguda, diagnóstico da infecção em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos, em pacientes com doenças crônicas, tais como pacientes com insuficiência renal crônica, e na confirmação da infecção ativa em situações específicas como em resultados sorológicos indeterminados e em recém-natos de mães infectadas pelo HCV (GERMER & ZEIN, 2001).

1.6.2.1. Detecção qualitativa do RNA do HCV

Os testes qualitativos comumente utilizados para detecção do RNA do HCV são: RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase), PCR-ELISA (reação em cadeia da polimerase seguida pela detecção colorimétrica) e TMA (transcrição mediada pela amplificação).

A utilização da técnica de RT-PCR para detecção do HCV se iniciou na década de 90 e apresenta boa sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção da infecção antes do aparecimento de anticorpos anti-HCV,

diferenciação dos casos de infecção ativa daqueles de resolução da infecção, além do diagnóstico em pacientes com deficiência de formação de uma resposta imune efetiva (GARSON *et al.* 1990; ZAAIJER *et al.* 1993).

A etapa inicial da técnica de RT-PCR (Figura 5) consiste na síntese do DNA complementar (cDNA) de fita dupla, a partir de uma fita de RNA viral, que será catalizada pela enzima transcriptase reversa. Este processo é denominado transcrição reversa (RT). Uma vez que o RNA é convertido em cDNA, este é submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região-alvo.

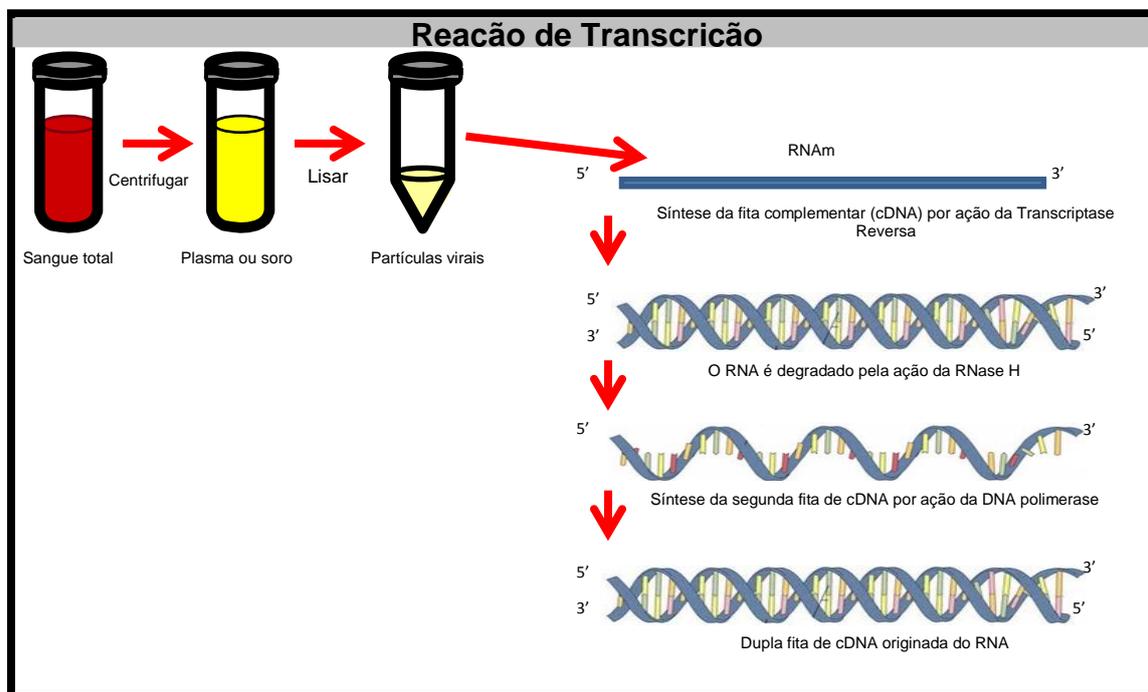


Figura 5. Esquema da reação de síntese de cDNA após ação da Transcriptase Reversa (Adaptado de ALBERTS *et al.*, 2008).

A reação de PCR é uma técnica de biologia molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida. Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas (Figura 6). Este processo ocorre num termociclador através de uma série de ciclos de diferentes temperaturas. Primeiramente a temperatura é elevada (de 94-95°C) para promover a separação da cadeia dupla do DNA em dois filamentos, sendo este processo conhecido como “desnaturação”. Em seguida, a temperatura é diminuída para 45-65°C para que ocorra a hibridização dos oligonucleotídeos (ou *primers*) às sequências-alvo,

sendo denominada de temperatura de anelamento ou hibridização. Após a ligação dos primers às sequências complementares de DNA, a temperatura é ajustada para 72°C quando a enzima responsável pela replicação da cadeia de DNA, a Taq DNA polimerase, tem atividade máxima de polimerização. O objetivo da PCR não é replicar a cadeia inteira de DNA, mas apenas replicar a sequência de interesse que é delimitada pelos iniciadores (ALBERTS *et al.*, 2008).

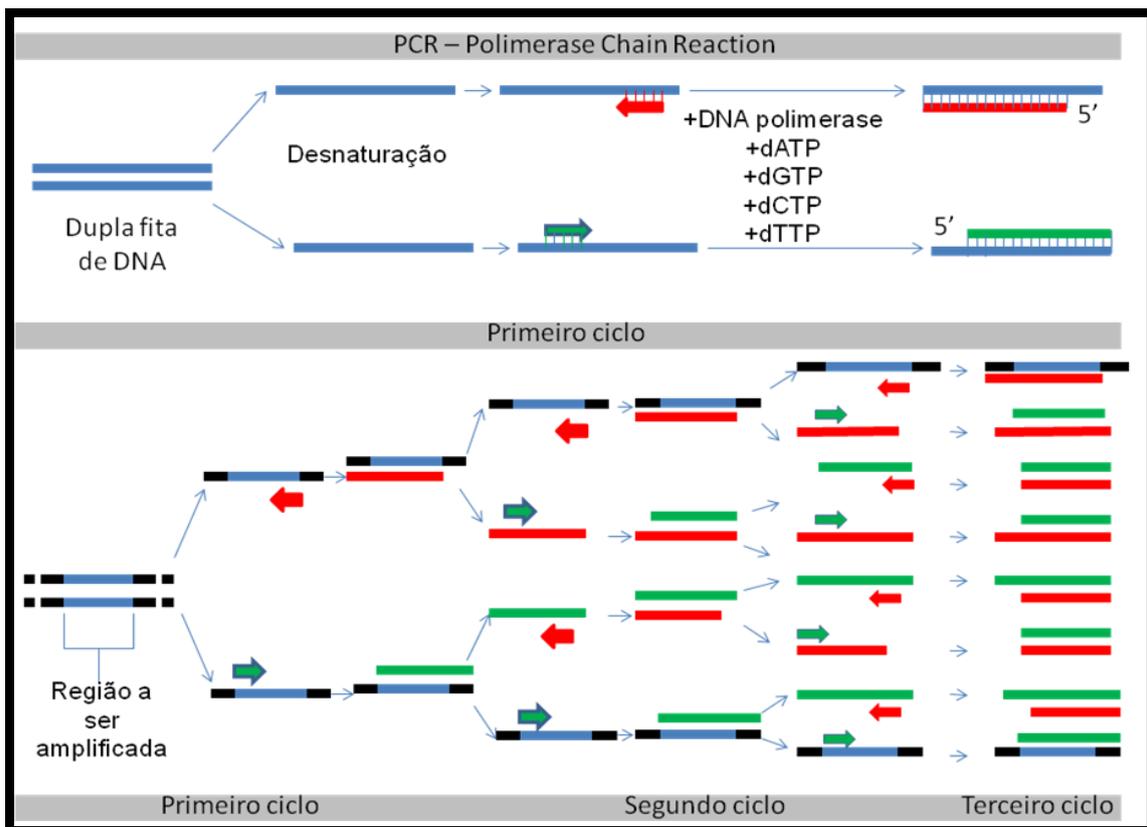


Figura 6. Representa o esquemática da rea o de PCR (Adaptado de ALBERTS *et al.*, 2008).

A técnica de TMA (amplifica o mediada por transcri o) detecta o RNA do HCV no soro ou plasma e possui limite inferior de detec o 10 UI/mL. A técnica envolve a hibridiza o do RNA viral com oligonucleotídeos de captura complementares   região 5' NC (Figura 7). Estes alvos são capturados por partículas magnéticas, e os iniciadores da rea o se ligam ao RNA-alvo que será transcrito pela transcriptase reversa (RT) do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV). Logo após, o RNA   degradado pela atividade de RNase H da RT, e um segundo iniciador se hibridiza   fita de DNA que será replicada

pela atividade DNA polimerase do domínio amino-terminal da MMLV. Este DNA de fita dupla inclui a região promotora para T7 que faz parte do primeiro iniciador. A T7 RNA polimerase se liga à região promotora e transcreve o DNA de forma a produzir 100 a 1000 cópias do RNA. Estas cópias são RNA de polaridade negativa, de forma que todo o processo se repetirá para a formação de fitas de RNA de polaridade positiva que são complementares às sondas marcadas com ésteres de acridina, que por sua vez, apresentam propriedade quimioluminescente. Em seguida, o luminômetro mede os sinais específicos para o HCV e para os controles internos de cada amostra, e os resultados são registrados por um programa específico (ARNOLD *et al.*, 1989; NELSON *et al.*, 1996).

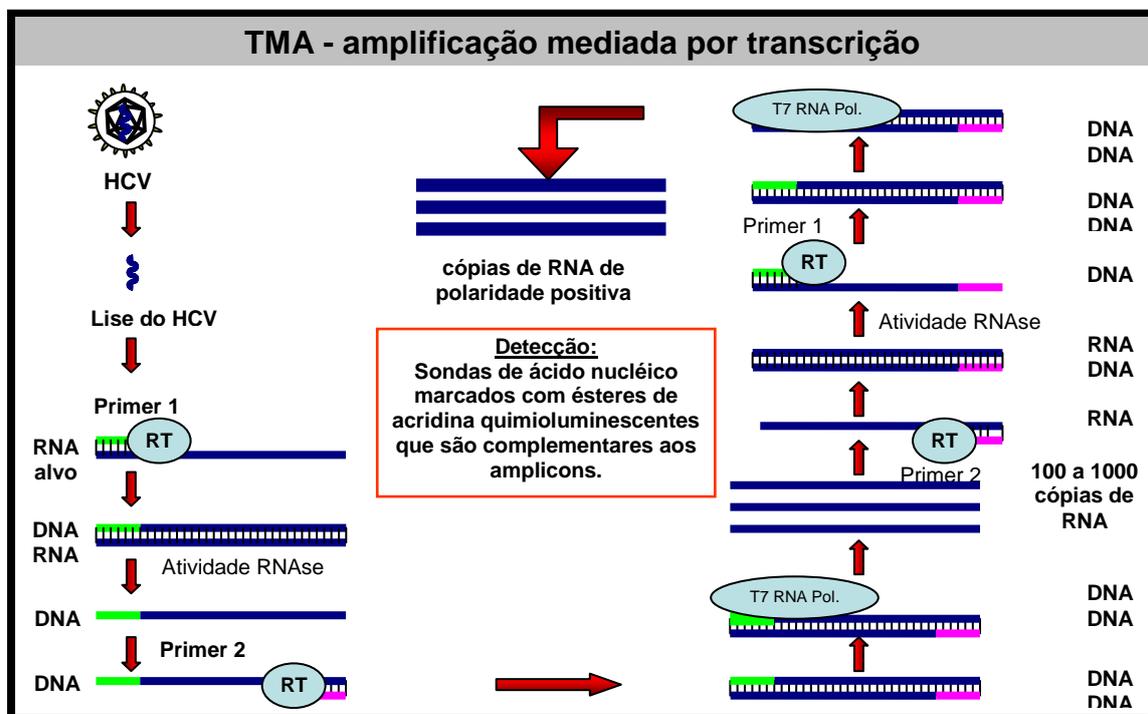


Figura 7. Representação esquemática da reação de TMA (Adaptado de KACIAN & FULTZ, 1995).

Um dos testes cujo princípio é a PCR-ELISA é o COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0. O ensaio baseia-se em cinco processos principais que envolvem a extração do RNA viral de amostras biológicas; transcrição reversa do RNA-alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA-alvo, utilizando-se iniciadores complementares específicos para o HCV; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas

específicas para os alvos e detecção dos produtos amplificados e hibridizados à sonda por determinação colorimétrica (Figura 8). O ensaio COBAS® AMPLICOR HCV Test v.2.0 permite, de forma simultânea, a transcrição reversa e amplificação do HCV-RNA-alvo e do RNA de um controle interno do HCV disponível no ensaio. O reagente da mistura principal contém um par de iniciadores específicos para o HCV-RNA e outro para o RNA do controle interno do HCV. A detecção de DNA amplificado é efetuada através de sondas oligonucleotídicas específicas que permitem a identificação independente do produto amplificado do HCV e do controle interno do HCV (LEE *et al.*, 2000).

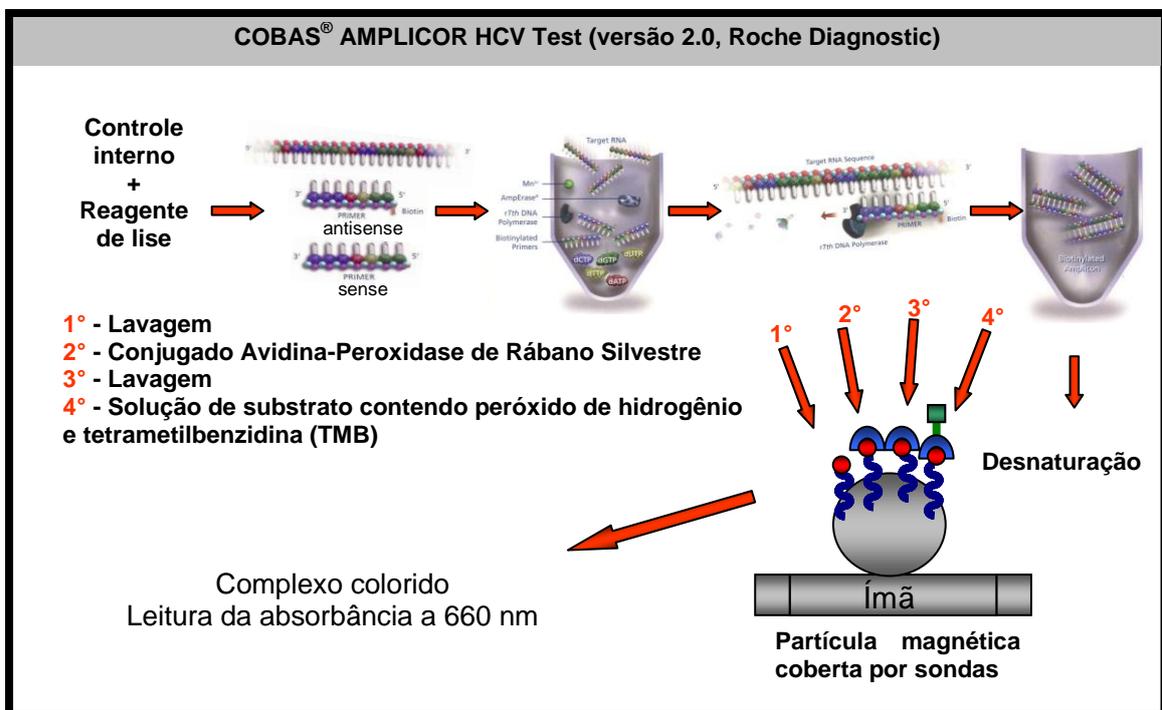


Figura 8. Representação esquemática da reação de PCR-ELISA qualitativa pelo COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0.

1.6.2.2. Detecção quantitativa do RNA do HCV

Os testes quantitativos têm a capacidade de determinar a quantidade de RNA do HCV (carga viral) presente no soro de pacientes infectados, o que tem importância para o prognóstico e monitoramento da terapia antiviral. Pacientes portadores do genótipo 1, que não apresentam redução de pelo menos 2 logs no valor da carga viral após 12 semanas de tratamento com PEG-INF e ribavirina, dificilmente obterão resposta com tratamento antiviral mais prolongado (BALLARDINI *et al.*, 1997).

Os testes quantitativos devem apresentar elevada sensibilidade para determinação da carga viral antes e durante o tratamento antiviral, enquanto os testes qualitativos devem ser mais sensíveis antes e ao fim do tratamento antiviral, para avaliar a eficácia da terapêutica (STRAUSS, 2001).

A quantificação do RNA do HCV é realizada, principalmente, por uma das seguintes técnicas: RT-PCR competitiva, PCR-ELISA quantitativa, PCR em tempo real e amplificação de sinal (DNA ramificado ou bDNA).

Os testes acima têm limites inferiores de detecção semelhantes, conforme pode ser observado no Quadro 1, ainda que o DNA ramificado exiba uma faixa dinâmica de detecção mais ampla, evitando a necessidade, na maioria das vezes, de re-testes com diluição de amostras com carga viral muito elevada (DESOMBERE *et al.*, 2005).

Apesar da metodologia da RT-PCR competitiva para quantificação do HCV no soro ser empregada há longa data, com bons resultados, em muitos laboratórios de diagnóstico, sua baixa sensibilidade analítica e limitada faixa de resolução de 3 logs impõem algumas limitações (ZEUZEM *et al.*, 1994). Isto tem impulsionado a busca de metodologias alternativas que possam suprir estas deficiências.

O teste COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR v2.0 apresenta o mesmo princípio do teste COBAS[®] AMPLICOR HCV v2.0, porém no primeiro teste ocorre a detecção simultânea do RNA alvo e do RNA do padrão de quantificação em cada amostra. Deste modo, a quantificação do RNA viral do HCV é efetuada comparando-se o sinal do RNA-alvo do HCV com o sinal do padrão de quantificação do HCV em cada amostra. O padrão de quantificação é um transcrito de RNA não-infeccioso com locais de ligação do iniciador idênticos aos do RNA-alvo do HCV e uma região específica de ligação da sonda que permite que o produto amplificado do padrão de quantificação do HCV se diferencie do produto amplificado do HCV. O padrão de quantificação do HCV é incorporado em um número de cópias conhecidas em cada amostra e processado em conjunto com RNA-alvo do HCV em todas as etapas do ensaio.

Outro teste de quantificação do RNA do HCV é baseado na técnica de DNA ramificado que se fundamenta na hibridização específica dos oligonucleotídeos sintéticos às regiões 5' NC e core do genoma do RNA do HCV imobilizado na superfície da microplaca. Moléculas sintéticas de DNA

ramificado amplificadas e várias cópias de uma sonda de fosfatase alcalina são hibridizadas ao complexo imobilizado. O complexo é incubado em conjunto com um substrato quimioluminescente e a emissão de luz é medida pelo equipamento. A intensidade do sinal é proporcional a quantidade de ácido nucléico-alvo. A quantidade de RNA do HCV na amostra é determinada por comparação a uma curva-padrão (Figura 9). O limite mínimo de detecção do ensaio é de 615 UI/mL (SMITH *et al.*, 1996).

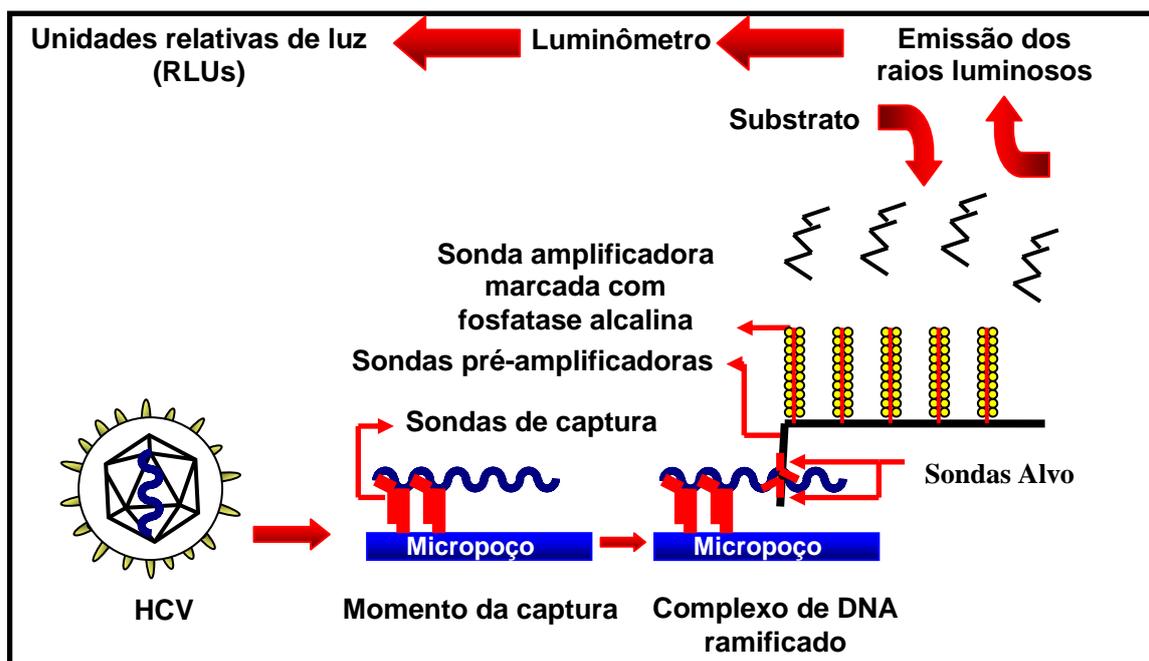


Figura 9. Representação esquemática da reação de quantificação do RNA do HCV utilizando-se a técnica do bDNA (Adaptado de SISMOUR & STEVEN, 2005).

Alguns avanços no desenvolvimento das técnicas realizadas na década de 90, utilizados conjuntamente, trouxeram possibilidades consideráveis ao método tradicional de PCR, tais como: 1) emprego da atividade 5'-3' exonuclease da enzima *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase para gerar um sinal específico detectável concomitante à reação de PCR (HOLLAND *et al.*, 1991); 2) sistema de detecção de sinal fluorescente simultâneo à realização da reação de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1992); 3) uso de sonda ligada covalentemente a fluoróforo na reação de PCR (LEE *et al.*, 1993). Estes desenvolvimentos possibilitaram a criação da metodologia de PCR em tempo real, capaz de permitir a detecção do produto da PCR na medida em que este vai sendo formado, e não somente ao final da reação de PCR. Dessa forma, acrescentou-

se ao extremamente sensível método de PCR, maior praticidade, menor tempo para obtenção do resultado e diminuição da possibilidade de contaminação (LIVAK *et al.*, 1995; GIBSON *et al.* 1996; HEID *et al.*, 1996). A PCR em tempo real é uma técnica precisa e reprodutível, porque determina o nível de amplificação durante a fase exponencial da reação, evitando que qualquer variação mínima na eficiência de amplificação possa produzir dramáticas diferenças na quantificação do produto final, e tornando o resultado extremamente confiável. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T) e correlaciona-se com a quantidade inicial de RNA na amostra alvo. Este ponto permite a quantificação exata baseada na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto amplificado de PCR. Esta técnica pode permitir a análise rápida de amostras em larga escala como, por exemplo, no diagnóstico de indivíduos com hepatite C crônica. Dentre os sistemas de PCR em tempo real mais utilizados, destacam-se o Taqman e Syber Green (WATZINGER *et al.*, 2006; CIKOS & KOPPEL, 2009).

No Quadro 1, é possível observar diferentes características de testes moleculares comercialmente disponibilizados para detecção e quantificação do HCV.

Quadro 1. Características das diferentes metodologias de diagnósticos moleculares comerciais quantitativos e qualitativos.

Nome comercial	Método	Princípio	Resultado	Empresa	Nível de automação	Limite inferior de detecção (UI/mL)	Faixa de detecção (UI/mL)
Versant® HCV RNA 3.0 Assay	bDNA	Amplificação de sinal	Quantitativo	Siemens	Semi-automático	615	615–7.700.000
COBAS® AMPLICOR HCV Monitor Test v2.0	RT-PCR	Amplificação do alvo	Quantitativo	Roche	Semi-automático	600	600–700.000
COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0	RT-PCR	Amplificação do alvo	Qualitativo	Roche	Semi-automático	50	
Versant® HCV Qualitative Assay	TMA	Amplificação do alvo	Qualitativo	Siemens	Manual	9,6 (10)	

1.6.2.3. Genotipagem

São vários os métodos utilizados para genotipagem. Dentre eles temos:

- a) Seqüenciamento nucleotídico de parte do genoma do HCV com posterior análise filogenética (FORNS & COSTA, 2006);
- b) RT-PCR utilizando *primers* genótipo-específicos, em geral específicos para a região core do genoma do HCV (OKAMOTO *et al.*, 1992; WIDELL *et al.*, 1994);
- c) Hibridização reversa com sondas de oligonucleotídeos ligadas à membrana de nitrocelulose e específicas para a região 5' NC ou 5'NC/core, capaz de identificar os principais genótipos do HCV (*Line probe assay* ou LIPA) (STUYVER *et al.*, 1993);
- d) Sorotipagem que é um método baseado em ensaios imunoenzimáticos que visam à detecção de anticorpos séricos genótipo-específicos contra epítomos do core ou NS4 (MONDELLI *et al.*, 1994; SANDRES *et al.*, 2001);
- e) Análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (*Restriction fragment length polymorphism* ou RFLP). A técnica RT-PCR/RFLP basea-se na digestão dos produtos da PCR por enzimas de restrição, que são separados de acordo com seus comprimentos de eletroforese em gel (NAKAO *et al.*, 1991).

1.7. TRATAMENTO

Atualmente, o tratamento padrão da infecção crônica pelo HCV consiste na administração da combinação de interferon alfa-2a ou alfa-2b (IFN) e ribavirina (FRIED *et al.*, 2002). Embora o modo de ação exato não seja conhecido em detalhe, ambas as drogas têm um importante efeito antiviral e imunomodulador. A taxa de resposta depende do genótipo infectante, o que sugere que as diferenças de sequências entre genótipos influenciam a susceptibilidade a esses medicamentos.

Por meio da Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007, do Brasil, o MS dispôs sobre o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C. De acordo com esta Portaria, os pacientes infectados pelo HCV portadores de

genótipo 2 ou 3 deverão completar 24 semanas de tratamento com a combinação de interferon convencional e ribavirina; e os pacientes infectados com HCV genótipo 4 ou 5 deverão completar 48 semanas de tratamento com Interferon convencional e ribavirina. Os pacientes infectados com HCV genótipo 1 deverão receber Interferon Peguilado (PEG-IFN) e ribavirina e completar 48 (quarenta e oito) semanas de tratamento, desde que seja documentada a presença de resposta virológica precoce na 12^a semana de tratamento, com negativação ou redução de 2 log (100 vezes) do RNA do HCV, em relação ao nível pré-tratamento (MS, 2007).

Pacientes recidivantes ou não-respondedores à terapia com IFN convencional associado ou não à ribavirina, dos genótipos 1 a 5, poderão ser novamente tratados com a associação de PEG-IFN e ribavirina (MS, 2007).

Ao término da terapia antiviral deverá ser realizado o teste qualitativo para avaliação da resposta virológica ao final do tratamento (RVFT). Caso este exame indique resultado não-detectado, o exame deverá ser repetido após 24 semanas para avaliação da resposta virológica sustentada (RVS) (MS, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta, em 1989, do vírus da hepatite C (CHOO *et al.*, 1989) foi demonstrado que o HCV é a principal causa de hepatite crônica em todo o mundo. A rotina de diagnóstico virológico desta infecção baseia-se na detecção de anticorpos (Ac) contra o HCV. No entanto, estes testes não confirmam se o indivíduo está com infecção passada ou presente, visto que estes anticorpos não induzem imunidade (KOBAYASHI *et al.*, 1993; YOUNG *et al.*, 1993; WOLFE *et al.*, 1994). Por este motivo a detecção da infecção presente pelo HCV é realizada por testes de detecção do genoma viral.

A detecção do RNA do HCV constitui o método padrão-ouro para diagnóstico e monitoramento terapêutico da infecção pelo HCV, segundo as diretrizes de consenso da Associação Européia para o Estudo do Fígado (*European Association for the Study of Liver*, 1999) e Norte Americana (National Institutes of Health Consensus, 2002).

A detecção do RNA do HCV antes do aparecimento de anticorpos anti-HCV é importante para redução da probabilidade de transmissão do HCV por transfusão sanguínea. Já a quantificação do RNA é relevante na avaliação do tratamento antiviral, determinando muitas vezes a interrupção do tratamento antiviral em pacientes que não serão beneficiados pelo prolongamento do mesmo.

Deste modo, é fundamental a avaliação das metodologias qualitativas e quantitativas para detecção do RNA do HCV, a fim de se estabelecer as metodologias mais adequadas em diferentes estágios da infecção, tal como no monitoramento da infecção aguda pelo HCV, antes do início do tratamento ou durante o mesmo. Os testes moleculares, com baixo limite inferior de detecção devem apresentar ótimo desempenho quanto ao diagnóstico da infecção. Além disso, é importante avaliar os custos de cada método para minimizar os gastos relativos ao monitoramento da infecção, principalmente durante o tratamento antiviral.

Neste estudo, realizamos a avaliação de duas metodologias quantitativas e três metodologias qualitativas para o diagnóstico da infecção pelo HCV em pacientes virgens de tratamento e durante o curso da infecção.

Esta avaliação pretende determinar os métodos mais eficientes e de menor custo para o estabelecimento de tecnologias com alta sensibilidade e especificidade. Com isto, esperamos contribuir para o desenvolvimento de estratégias efetivas voltadas ao diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HCV.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de metodologias para detecção e quantificação do RNA do vírus da hepatite C (HCV) em pacientes com infecção aguda e crônica pelo HCV.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho da técnica de PCR qualitativa para a detecção do RNA do HCV, desenvolvida no Laboratório de Hepatites Virais/FIOCRUZ, em indivíduos anti-HCV positivos antes do tratamento, e durante o curso da infecção;
- Avaliar o desempenho de testes moleculares comerciais para o diagnóstico e monitoramento do curso da infecção aguda pelo HCV, sendo dois deles desenvolvidos para detecção qualitativa do RNA (Amplificação mediada pela transcrição ou TMA e PCR-ELISA) e os outros dois desenvolvidos para quantificação do RNA (bDNA e PCR-ELISA);
- Avaliar o custo-minimização do diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HCV.

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Amostras de soro foram obtidas de 43 indivíduos atendidos no Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do Laboratório de Hepatites Virais (LAHEP) da FIOCRUZ, as quais haviam sido previamente coletadas e caracterizadas como reagentes para anticorpos anti-HCV. Neste grupo, 37 indivíduos não apresentavam histórico de tratamento prévio para hepatite C e forneceram uma única amostra para avaliação do desempenho das técnicas moleculares para o diagnóstico da hepatite C. Outros seis indivíduos com infecção aguda pelo HCV doaram amostras seriadas (n=59) de soro, em diferentes períodos durante o curso da infecção, para avaliação do desempenho das técnicas moleculares no monitoramento da infecção aguda pelo HCV. Este estudo faz parte do projeto intitulado: “Padronização de testes de diagnóstico da infecção pelo vírus das hepatites B e C em amostras de saliva”, que foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FIOCRUZ, em 15 de julho de 2008, sob o número de protocolo 433/07.

4.2. TESTES MOLECULARES

Os testes moleculares para detecção qualitativa do RNA do HCV em amostras de soro foram realizados utilizando-se três métodos distintos: reação em cadeia da polimerase após síntese de cDNA por transcrição reversa (RT-*nested* PCR padronizado no LAHEP); TMA, amplificação mediada pela transcrição (VERSANT HCV RNA qualitative assay product insert, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tanytown, NY, EUA) e PCR-ELISA qualitativa (COBAS® AMPLICOR v2.0, Roche Diagnostics, França).

Os testes moleculares para quantificação do RNA do HCV em amostras de soro foram realizados utilizando-se dois métodos distintos: PCR- ELISA quantitativa (COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR test, Roche Diagnostics, França) e bDNA (VERSANT® HCV RNA 3.0 Assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Tanytown, NY, EUA).

A fim de evitar contaminação na realização dos testes moleculares, todas as etapas das técnicas foram realizadas em salas separadas. Em todas as reações foram incluídas amostras de água ultrapura como controles negativos. As corridas eletroforéticas em gel de agarose também foram realizadas em salas separadas para evitar a contaminação do produto da PCR.

4.3. TESTES MOLECULARES QUALITATIVOS

4.3.1. Extração do RNA viral, transcrição reversa e RT- *nested* PCR

As amostras de soro foram submetidas à reação de RT-*nested* PCR. O RNA viral foi extraído utilizando-se um conjunto de reagentes de extração comercial baseado no princípio adsorção-eluição à sílica. Em seguida, foi realizada a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e amplificação do genoma viral pela reação em cadeia da polimerase (reação de RT-PCR). Um segundo ciclo de PCR, utilizando iniciadores internos (*nested* PCR), foi necessário para a visualização do produto da reação de PCR em gel de agarose.

4.3.1.1. Extração do RNA viral

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais para extração “Viral RNA mini Kit” (Qiagen Sciences, Maryland, EUA)
- Etanol 100%

Procedimento:

O RNA das amostras de soro foi extraído utilizando-se o conjunto de reagentes comercial da Qiagen, seguindo as instruções do fabricante. A cada tubo devidamente identificado e contendo 560 μ L do tampão AVL (“Viral Lysis buffer”) foram adicionados 140 μ L da amostra de soro correspondente. Após a homogeneização (Vortex-Genie 2, EUA) e incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 560 μ L de etanol 100% e, novamente, homogeneizados. Esta solução foi transferida para colunas e submetida a

centrifugação de 8000 rpm (rotação por minuto) por 1 minuto em centrífuga Excelsa II (FANEM, São Paulo, Brasil). Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 500 µL do tampão AW1 (“Washer buffer 1”) para lavagem da coluna, outra centrifugação de 8000 rpm por 1 minuto é realizada. Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Foram adicionados 500 µL do tampão AW2 (“Washer buffer 2”) para segunda lavagem; as colunas foram centrifugadas à 14000 rpm durante 4 minutos e, mais uma vez, os tubos coletores foram removidos. Após colocar tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL na parte inferior da coluna, foram adicionados 60 µL do tampão de eluição (AVE -“Elution buffer”) para eluir o RNA e as colunas foram submetidas à centrifugação de 8000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral foram estocados a -70° C até o momento de sua utilização para síntese do DNA complementar (reação de transcrição reversa).

4.3.1.2. Reação de transcrição reversa

Materiais:

- Iniciador randômico - 20 pmol/µL (Invitrogen, Escócia)
- dNTP's -10 mM (Invitrogen, CA, EUA)
- DTT -0,1M (Invitrogen, CA, EUA)
- Inibidor de RNase (RNase out) – 5.000U (40 U/µL) (Invitrogen, Escócia)
- 5X Tampão de reação da enzima SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen, CA, EUA).
- Enzima SuperScript Reverse Transcriptase III – 10.000 U (200 U/µL) (Invitrogen, CA, EUA)

Procedimento:

As amostras foram incubadas à 65° C durante 10 minutos e, em seguida, acrescentou-se em cada tubo correspondente à amostra uma mistura contendo 4 µL de tampão 5X, 2 µL de DTT, 1 µL de dNTPs, 1 µL de iniciador randômico,

1 µL de inibidor de RNase, 1 µL da enzima SuperScript III e 10 µL da amostra. As amostras foram incubadas à 50 °C durante 60 minutos para ocorrer a transcrição reversa do RNA em DNA complementar. Logo após, a enzima foi inativada pela incubação das amostras a 70 °C por 10 minutos em termociclador (Analítica, Reino Unido), as quais foram, em seguida, estocadas à -70 °C.

4.3.1.3. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR da região 5' NC

Foram utilizados nas reações de PCR os seguintes oligonucleotídeos:

Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.

Oligonucleotídeo	Polaridade/ sentido 5'- 3'	Posição genoma	Seqüência (5'- 3')
1B	Negativa/ anti-senso	322-342	GGG TGC AGC GTC TAC GAG ACC
2A	Positiva/ senso	18-33	GGC GAC ACT CCR CCA T
K15	Positiva/ senso	29-48	ACC ATR RAT CAC TCC CCT GT
K16	Negativa/ anti-senso	288-307	CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT

4.3.1.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR₁)

Materiais:

- Água destilada DNase, RNase free (GIBCO, EUA)
- 10 µM de oligonucleotídeos específicos 1B e 2A
- dNTP's - 1,25 mM (Invitrogen, CA, EUA)
- MgCl₂ - 50 mM
- 10 x tampão de PCR (Invitrogen, CA, EUA)
- Enzima Taq polimerase platinum- 5 U/µL (Invitrogen, CA, EUA)

Procedimento:

Aos tubos de poliestireno de 0,5 mL foram acrescentados 12,5 µL de água destilada DNase, RNase free; 2,5 µL de tampão da Taq polimerase

platinum (10X); 1,5 μL de MgCl_2 ; 4 μL dNTPs; 2 μL de cada oligonucleotídeo; 0,3 μL Taq polimerase e 2,5 μL do cDNA. Em seguida, a reação foi realizada em um termociclador (Analítica, Reino Unido) e após a desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, foram submetidas a 30 ciclos de temperaturas para amplificação. Cada ciclo consistia de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 1 minuto para hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C por 1 minuto para síntese do DNA. Após o último ciclo, uma etapa de 72°C por 7 minutos foi acrescentada para alongamento final das cadeias de DNA amplificadas. Em seguida, as amostras foram submetidas a um segundo ciclo de amplificação (*nested*-PCR).

4.3.1.5. *Nested* PCR em amostras de soro (PCR₂)

Materiais:

- Água destilada DNase, RNase free (GIBCO, NI, EUA)
- 10 μM de oligonucleotídeos específicos k15 e K16
- dNTP's - 1,25 mM (Invitrogen, CA, EUA)
- MgCl_2 -25 Mm
- 10 x tampão de PCR (Invitrogen, CA, EUA)
- Enzima Taq polimerase platinum – 5 U/ μL (Invitrogen, CA, EUA)

Procedimento:

Aos tubos de 0,5 mL foram acrescentados 14,5 μL de água destilada DNase, RNase free; 2,5 μL de tampão da Taq polimerase (10X); 1,5 μL de MgCl_2 ; 4 μL de dNTPs; 1 μL de cada um dos oligonucleotídeos (K15 e K16), 0,3 μL Taq polimerase platinum e 1 μL do produto da PCR₁. As amostras foram colocadas no termociclador (Analítica, Reino Unido) e após a desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, foram submetidas a 25 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia em: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 45 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C por 1 minuto para síntese do DNA e, por último, segue-se uma etapa de alongamento adicional a 72°C por 7 minutos.

4.3.1.6. Eletroforese em gel de agarose

Materiais:

- Tampão Tris-Borato-EDTA (tris base 10,8g/ ácido bórico 5,5g/ EDTA 4 mL, água destilada q.s.p. 1 litro)
- Tampão da amostra (azul de bromofenol 0.03%, 0.03% xileno cianol FF, 0.4% laranja G, 15% Ficoll[®] 400, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) e 50mM EDTA (pH 8.0) (Promega, Madison, WI, EUA)
- Brometo de etídio (EtBr) a 10 mg/mL (Invitrogen, CA, EUA)
- Agarose 1,5% em tampão TBE contendo 0,5 µg/mL de EtBr
- Padrão de peso molecular (φX174 DNA/Hae III) (Invitrogen, CA, EUA)

Procedimento:

Uma alíquota de 10 µL do produto da PCR₂ foi misturada com 2 µL do tampão da amostra e aplicadas em poços formados no gel de agarose a 1,5%. O marcador de peso molecular (10 µL) foi colocado em um poço adicional para a determinação do tamanho da banda obtida na segunda PCR.

As amostras foram submetidas à corrida eletroforética (100 volts/60 minutos). Após a corrida eletroforética, o gel foi examinado em luz ultravioleta adaptada a um software (TMW-20, UVP Imagestore, CA, EUA) para a visualização das bandas de DNA de aproximadamente 247 pares de bases conforme pode ser observado na figura 10.

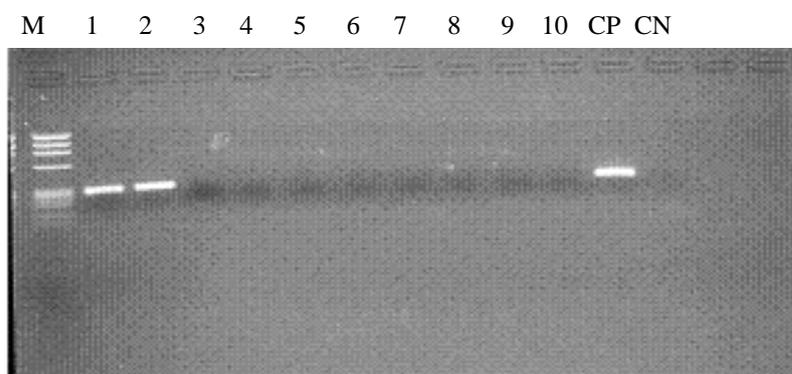


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose onde as bandas demonstram positividade para a reação de RT- *nested* PCR para HCV. Linhas: M – Marcador; 1 a 10 – Amostras de soro reagentes e não reagentes para a técnica de PCR; CP – Controle Positivo constituído por amostra de soro reagente para a reação de RT- *nested* PCR; CN – Controle Negativo constituído por amostra de soro não reagente para a reação de RT- *nested* PCR.

4.3.2. Amplificação mediada pela transcrição (TMA)

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais VERSANT HCV RNA qualitative assay product insert (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA) contendo os seguintes insumos:

Reagente de controle interno

Reagente de amplificação

Reagente enzimático

Reagente de sonda do HCV

Calibrador positivo do HCV

Calibrador negativo

Reagente de captura do alvo

Reagente de seleção

Solução de lavagem

Reagente de óleo

Solução tampão para o fluido de desativação

Conjunto de auto detecção

Ponteiras de 1mL

Pipetas sorológicas de 1,0mL, 5,0 mL, 10,0mL e 25,0mL

Unidades de 10 tubos (TTU)

Cassetes de 10 ponteiras (TTC)

Cartões selantes

Tubos estéreis de polipropileno de 4,0 mL, 10,0 mL e 50mL

Procedimento:

Inicialmente, adicionamos com o auxílio de uma pipeta 400 µL do reagente de captura do alvo nos tubos de plástico provenientes do ensaio (tubos TTU - Ten-Tube Unit). Em seguida, adicionamos 500 µL do calibrador positivo, 500 µL do calibrador negativo, 500 µL do controle positivo, 500 µL do controle negativo e 500 µL de cada amostra de soro em cada tubo correspondente. A seguir, os tubos são homogeneizados por 10 a 20 segundos em equipamento de agitação automática (VX-2500 Multi-tube vortexer) e incubados em banho-maria a 60°C por 20 minutos.

Após a incubação, deve-se estabilizar a temperatura dos tubos por 15 minutos e, em seguida, colocá-los no equipamento de captura do alvo (TCS) por 10 minutos. Após este período, os tubos foram lavados duas vezes conforme descrito a seguir: o líquido dos tubos foi aspirado utilizando-se uma bomba à vácuo e adicionou-se 1 mL de solução de lavagem em cada tubo. Em

seguida, os tubos foram homogeneizados por 10 a 20 segundos, a estante foi girada e novamente realizou-se a homogeneização por 10 a 20 segundos no equipamento de agitação. Após este procedimento, os tubos foram colocados no TCS por 5 minutos. Após a segunda lavagem, todo o líquido foi aspirado do tubo para proceder à amplificação.

Para amplificação, adicionamos 75 µL do reagente de amplificação e 200µL do óleo reagente em cada tubo. Em seguida, os tubos foram homogeneizados por 10 a 20 segundos, a estante foi girada e novamente realizou-se a homogeneização por 10 a 20 segundos. As amostras foram incubadas a 60°C por 10 minutos e, posteriormente, a 41,5°C por 10 minutos. Adicionou-se 25 µL do reagente enzimático nos tubos durante a incubação a 41,5°C. Após esta etapa, os tubos foram homogeneizados manual e vigorosamente, sendo incubados novamente a 41,5°C por 60 minutos.

Em seguida, 100 µL do reagente da sonda foi adicionado em cada tubo e este foi homogeneizado por 10 a 20 segundos, a estante foi girada e, novamente, realizou-se a homogeneização por 10 a 20 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-Maria a 60°C por 15 minutos e, após a incubação, foram adicionados 250 µL do reagente de seleção em cada tubo. Os tubos foram, novamente, homogeneizados como descrito acima e incubados por mais 10 minutos em banho-maria a 60 °C.

Antes da detecção, a tubulação do luminômetro foi limpa com os reagentes de detecção (auto detect I e II), enquanto as amostras foram incubadas em banho-maria (19 a 27°C) por no mínimo 10 minutos. Após este período, os tubos foram colocados no equipamento (HC+Luminometer) e procedeu-se a programação do equipamento para a realização do ensaio.

O luminômetro mede as unidades relativas de luz (RLUs) do alvo ou analito (o sinal luminescente) e do controle interno (o sinal em “flash”). O programa de redução de dados da TMA calculará então dois limites discriminatórios do teste: um limite do analito (Analyte Cutoff [Analyte CO]) para o sinal do analito e um limite do controle interno (Internal Control cutoff [IC cutoff]) para o sinal do controle interno. Os valores dos limites são determinados da seguinte forma: valor do limite do controle interno=0,5 x (NC_x [IC]) e valor do limite do controle analito= NC_x (Analito) + (0,04 x PC_x [Analito]), onde NC_x (IC) representa a média dos valores do calibrador negativo do sinal do controle

interno; NC_x (Analito) é a média dos valores do calibrador negativo do sinal do analito e PC_x (Analito) representa a média dos valores do calibrador positivo do sinal do analito.

4.3.3. PCR-ELISA qualitativa

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 (Roche Diagnostics, França) contendo os seguintes insumos:
 - HCV Reagente de lise (HCV Lys)
 - HCV Diluente de amostras (HCV DIL)
 - HCV Controle interno (HCV IC)
 - Plasma humano negativo (NHP)
 - HCV Controle negativo (HCV(-)C)
 - HCV Controle positivo (HCV(+)C)
 - HCV Mistura principal (HCV MMX)
 - HCV Solução de Manganês (HCV Mn^{2+})
 - HCV Suspensão de sonda 1 (CX PS1)
 - HCV Suspensão de sonda 2 (CX4)
 - Solução de desnaturação (DN4)
 - Conjugado avidina-peroxidase de rábano silvestre (CN4)
 - Substrato A (SB3)
 - Substrato B (SB)
 - Solução de lavagem 10x (WB)
- Isopropanol 99,5%
- Etanol 70%

Procedimento:

Primeiramente, foi preparada a solução de trabalho (Working HCV LYS, v2.0) com todo o conteúdo do frasco da solução de lise (HCV LYS, v2.0) e 100 μ L do controle interno (HCV IC, v2.0). Em seguida, foi adicionado 400 μ L da solução de trabalho em cada tubo devidamente identificado como amostras e controles. Logo após, adicionamos 200 μ L de soro de cada paciente nos respectivos tubos e 200 μ L de plasma humano normal (NHP) em cada tubo dos controles. Após homogeneização das amostras por 3 a 5 segundos, adicionou-se 20 μ L dos controles nos tubos correspondentes e procedeu-se nova homogeneização. Em seguida, as amostras foram incubadas a 60 °C por 10 minutos em termobloco (Multi block heater).

Logo após adicionou-se 600 µL de isopropanol e as amostras foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 13.000 a 16.000g em centrífuga (centrifuge 5402) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e adicionado 1 mL de etanol 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 13.000 a 16.000g por 5 minutos e o sobrenadante foi aspirado; em seguida, foi realizada nova centrifugação por 2 a 3 segundos para remover o etanol residual.

O precipitado foi ressuspensão pela adição de 200 µL do diluente (Specimen diluent) e homogeneizado em agitador automático (Vortex-Genie 2, EUA) por 20 segundos. Este RNA viral é estável por 3 horas à temperatura ambiente e por 1 mês no freezer a -70°C, podendo ser feitos até 2 descongelamentos.

Os A-rings (tubos dispostos em forma de anel) foram posicionados em suporte apropriado enquanto a mistura de reação foi preparada com a adição de 100 µL da solução de manganês (HCV Mn²⁺) no frasco contendo a solução de mistura (HCV MMX). Em seguida, esta mistura foi homogeneizada por agitação por inversão 10 a 15 vezes e 50 µL da reação foi colocada em cada tubo de reação. Em seguida, adicionamos 50 µL do RNA viral extraído para proceder a reação.

Os tubos de reação foram colocados no analisador automático (Roche Instrument Center, Suíça) após a inclusão da lista de trabalho no programa do aparelho. Antes do início da reação, também foram incluídos no equipamento os seguintes reagentes: solução de suspensão da sonda CX (2,5 mL da solução de CX PS1 no frasco de reagente contendo a solução de CX4), solução de suspensão da sonda IC (2,5 mL de solução de IC PS1 em frasco de reagente contendo a solução de IC4), solução de desnaturação, solução do conjugado avidina-HRP, solução do substrato (5 mL da solução de SB no frasco contendo a solução SB3) e solução de tampão de lavagem (diluído 10 vezes em água destilada).

4.4. TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS

4.4.1. PCR-ELISA quantitativa

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais COBAS® AMPLICOR MONITOR HCV Test v2.0 (Roche Diagnostics, França) contendo os seguintes insumos:
 - Reagente de lise (HCM Lys)
 - Padrão de quantificação (HCM QS)
 - Diluyente de amostras (HCM DIL)
 - Plasma humano negativo (NHP)
 - Controle negativo (HCV (-) C)
 - Controle negativo baixo (HCV L(+))C)
 - Controle negativo alto (HCV H(+))C)
 - Mistura principal (HCM MMX)
 - Solução de Manganês (HCM Mn²⁺)
 - Reagente de diluição do amplicon (AD3)
 - Suspensão de sonda 1 (CM PS1)
 - Suspensão de sonda 2 (CM4)
 - Suspensão de sonda do padrão de quantificação 1 (CQ PS1)
 - Suspensão de sonda do padrão de quantificação 2 (CQ4)
 - Solução de desnaturação (DN4)
 - Conjugado avidina-peroxidase de rábano silvestre (CN4)
 - Substrato A (SB3)
 - Substrato B (SB)
 - Solução de lavagem 10x (WB)
- Isopropanol 99,5%
- Etanol 70%

Procedimento:

Primeiramente, foi preparada a solução de trabalho (Working Lysis Reagent) pela adição de 100 µl da solução do padrão interno de quantificação (HCM QS, v2.0) no frasco contendo a solução de lise (HCV LYS, v2.0). Em seguida, foi adicionado 400 µL da solução de trabalho em cada tubo devidamente identificado como amostras e controles. Logo após, adicionamos 100 µL de soro de cada paciente nos tubos respectivos e 100 µL de plasma humano normal (NHP) em cada tubo dos controles, homogeneizando-os (vortex-Genie 2, EUA) em seguida. Após homogeneização das amostras por 3 a 5 segundos, adicionou-se 100 µL dos controles nos tubos correspondentes e

procedeu-se nova homogeneização. Em seguida, as amostras foram incubadas a 60°C por 10 minutos em termobloco (Lab-Line, EUA).

Logo após, adicionou-se 500 µL de isopropanol e as amostras foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.500 a 16.000g em centrífuga (Eppendorf, EUA) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e adicionado 1 mL de etanol 70%. Procedeu-se nova centrifugação a 12.500 a 16.000g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi aspirado; em seguida, foi realizada nova centrifugação por 2 a 3 segundos para remover o etanol residual.

O precipitado foi ressuspensão pela adição de 1000 µL do diluente (HCM Dil v2.0) e seguido pela agitação em agitador automático (vortex-Genie 2, EUA) por 20 segundos. Este RNA viral é estável por 3 horas à temperatura ambiente e por 1 mês no freezer a -70°C, podendo ser feito somente um descongelamento.

Os A-rings (tubos dispostos em forma de anel) foram posicionados em suporte apropriado enquanto a mistura de reação foi feita com a adição de 100 µL da solução de manganês (HCV Mn²⁺) no frasco contendo a solução de mistura (HCV MMX v.2.0). Em seguida, esta mistura foi homogeneizada por agitação por inversão 10 a 15 vezes e 50 µL da reação foi colocada em cada tubo de reação. Em seguida, adicionamos 50 µL do RNA viral extraído para proceder a reação.

Os tubos de reação foram colocados no analisador automático (Roche Instrument Center, Suíça) após a inclusão da lista de trabalho no programa do equipamento. Antes do início da reação, também foram incluídos no equipamento os seguintes reagentes: solução de suspensão da sonda CX (2,5 mL da solução de CX PS1 no frasco de reagente contendo a solução de CX4), solução de suspensão da sonda IC (2,5 mL de solução de IC PS1 em frasco de reagente contendo a solução de IC4), solução de desnaturação, solução do conjugado avidina-HRP, solução do substrato (5 mL da solução de SB no frasco contendo a solução SB3) e solução de tampão de lavagem (diluído 10 vezes em água destilada). O analisador automático COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 realiza a transcrição, amplificação, diluição do produto e detecção. Ao fim do procedimento, o equipamento gera um documento impresso contendo os

valores de absorbância para todas as diluições de HCV e do padrão de quantificação, e o valor em UI/mL do HCV é calculado para cada amostra e controle. No quadro 3 podemos observar a interpretação de alguns resultados obtidos neste ensaio.

Quadro 3. Interpretação dos possíveis resultados obtidos com a PCR-ELISA quantitativa

Sinal	Comentário	Interpretação
Q	QS_INVALID	Os valores de absorbância do QS estão fora do intervalo.
	TARGETOD_LO	Todos os valores de absorbância da amostra estão abaixo do intervalo de OD do ensaio.
	TARGETOD_HI	Todos os valores de absorbância da amostra estão acima do intervalo de OD do ensaio.
	RESULT_LO	Os valores do QS e da amostra estão dentro do intervalo do ensaio, mas o valor calculado está abaixo do limite inferior do intervalo linear do teste.
	RESULT_HI	Os valores do QS e da amostra estão dentro do intervalo do ensaio, mas o valor calculado está acima do limite superior do intervalo linear do teste.
	TARG_RANGE	Todos os valores de absorbância da amostra estão fora do intervalo de OD do ensaio.
	OD_SEQUENCE	Indica um valor de A660 do alvo fora da sequência. Nenhum valor será calculado, repetir todo procedimento, extração de amostras e controles, amplificação e detecção.
	QS_SEQUENCE	Indica um valor de A660 do QS fora da sequência. Nenhum valor será calculado, repetir todo procedimento, extração de amostras e controles, amplificação e detecção.

4.4.2. DNA ramificado – Teste quantitativo comercial

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais RNA do HCV Versant 3.0 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tanytown, NY, EUA) contendo os seguintes insumos:

Diluyente de lise
 Reagente de lise
 Sondas de captura
 Sondas alvo
 Solução de lavagem A
 Solução de lavagem B
 Poços de captura

Barreira pelicular
Diluyente do pré-amplificador
Diluyente da sonda marcada
Sulfato de dextrano
Sondas pré-amplificadoras
Substrato
Intensificador do substrato
Sonda marcada
Controle positivo alto
Controle positivo baixo
Controle negativo
Padrões A, B, C, D e E
Reservatório de reagentes de 50mL
Tubos de polipropileno de 15 e 50mL
Micropoços vazios e negros

- Etanol 70%

Procedimento:

Antes do início da reação, acrescentamos o tampão de lavagem A (880 mL), tampão de lavagem B (640 mL), a solução de limpeza e água no módulo de fluidos do equipamento Versant 440 Molecular System.

Inicialmente, foi realizada a preparação dos reagentes. O reagente de trabalho de lise foi preparado pela adição de 10,5 mL do diluyente de lise, 1,44 mL do reagente de lise, 100 µL da sonda de captura e 100 µL da sonda-alvo em um tubo cônico de polipropileno de 50 mL. O reagente pré-amplificador foi preparado acrescentando 13 mL do diluyente de trabalho pré-amplificação/amplificador e 100 µL da sonda pré-amplificadora em um tubo de polipropileno de 30 mL. O reagente de amplificação foi feito acrescentando 13 mL do diluyente de trabalho pré-amplificação/ amplificador e 100 µL da sonda amplificadora em um tubo de polipropileno de 30 mL. Todos os reagentes acima foram homogeneizados por inversão em agitador automático por 5 a 10 segundos.

Após o preparo, colocamos em posições específicas da estante de reação localizada no equipamento os seguintes reagentes: um tubo de polipropileno contendo 12 mL do diluyente de sonda, outro tubo contendo 100 µL do diluyente da sonda marcada, um tubo contendo 11 mL do substrato, um tubo contendo 1 mL do ativador de substrato, o reagente pré-amplificador e o reagente de amplificação. Todos os tubos devem estar destampados.

Em seguida, adicionamos 100 µL de Reagente de Lise em todos os micropoços de captura da microplaca e 50 µL de cada amostra, padrão e controles em cada poço respectivo, conforme indicado na lista de trabalho. A placa foi colocada no equipamento coberta com o filme selante e silicone. Após a programação do equipamento, deu-se início a reação.

Os dados finais do sistema 340 são registrados como unidades relativas de luz (RLUs). A luz emitida está diretamente correlacionada com o número de cópias do RNA do HCV/mL (cópias/mL). O programa de Gestão de Dados relata os resultados do teste em cópias/mL e Unidades Internacionais (UI/mL) da Organização Mundial de Saúde (WHO).

Uma curva logística de 4 parâmetros é utilizada para modelar o logaritmo das RLUs como uma função da concentração do RNA do HCV.

O DMS (Software para gestão de dados) usa as RLUs observadas e as concentrações dos cinco pontos da curva padrão para determinar a curva que apresenta o melhor ajuste para fazer o gráfico da curva padrão e para calcular a concentração do RNA do HCV de cada controle e de cada amostra de paciente. A curva padrão é calculada a partir de nove micropoços de padrões (um micropoço para cada um dos padrões B e C, dois micropoços para cada um dos padrões A e D, e três micropoços para cada padrão cada do padrão E. Os resultados de cada teste são impressos em forma de relatório.

O teste registra valores entre 3.200 cópias/mL e 40.000.000 cópias/mL. As amostras com valores inferiores a 3.200 cópias/mL ou superiores a 40.000.000 cópias/mL estarão fora da área do relatório do teste e serão relatadas como inferiores a 3.200 cópias/mL ou superiores a 40.000.000 cópias/mL, respectivamente. 1UI/mL equivale a 5,2 cópias/mL.

4.5. GENOTIPAGEM

A determinação do genótipo viral foi realizada a partir da análise do polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição da região 5' NC obtidos pela técnica de RT-PCR/RFLP, de acordo com o protocolo estabelecido no LAHEP (DRIESEL *et al.*, 1994).

Materiais:

- Tampão Tris-Borato-EDTA (tris base 10,8g/ ácido bórico 5,5g/ EDTA 4mL, água destilada q.s.p. 1 litro)
- Tampão da amostra
- Brometo de etídeo (EtBr) à 10 mg/mL (Invitrogen, CA, EUA)
- Agarose a 3% em tampão TBE contendo 0,5 µg/mL de EtBr
- Água Milli-Q tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC)
- Enzimas de restrição Ava II e Rsa I
- Peso molecular 25 pb DNA Ladder

Procedimento:

Adiciona-se 10 µL do produto da RT-*nested* PCR a 10 µL de cada mistura contendo 5U da enzima Ava II ou 10U da enzima Rsa I, 2 µL dos respectivos tampões de enzima e 8 µL de água Milli-Q tratada com DEPC. As amostras foram incubadas a 37°C por 3 horas e, após rápida centrifugação, os produtos das digestões enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 3% em solução tampão TBE contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e, por fim, examinados em luz ultravioleta no transiluminador (TMW-20, UVP Imagestore, CA, EUA). Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram analisados frente ao padrão de peso molecular (25 pb DNA Ladder) para a identificação dos genótipos do HCV e o perfil de restrição de cada amostra foi avaliado de acordo com os padrões observados para cada genótipo (Figura 11).

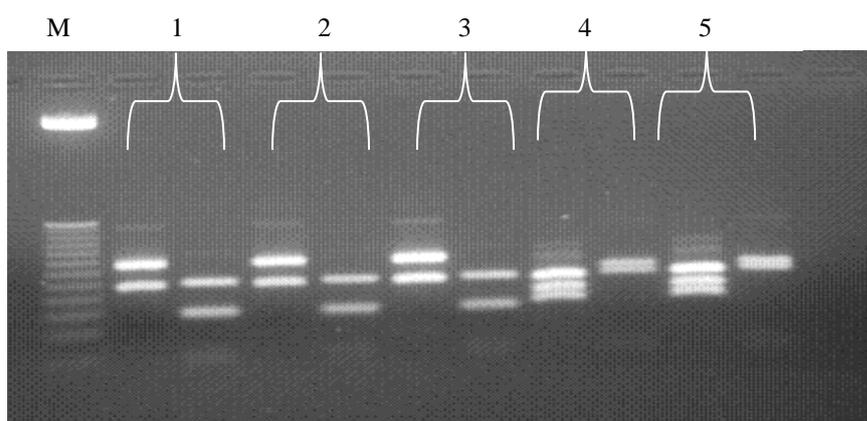


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas que determinam o genótipo.

M – Marcador 25 pb

Os números 1,2 e 3 representam o padrão eletroforético de amostras do Genótipo 3 (Ava II – bandas de 118 e 161 pb / Rsa I – bandas de 67, 69 e 123 pb) enquanto que os números 4 e 5 representam o padrão de amostras do Genótipo 1 (Ava II – bandas de 72, 89 e 118 pb / Rsa I – bandas de 123 e 136 pb).

4.6. AVALIAÇÃO DE MINIMIZAÇÃO DE CUSTOS

Na área da saúde, os principais métodos de avaliação econômica utilizados são: análise custo-benefício, análise de minimização de custos, análise custo-efetividade e análise custo-utilidade (MELO & NETO, 2008).

Baseando-se na definição de análise de minimização de custos, o custo dos insumos foi medido em unidades monetárias e explicitado em custo por teste.

O valor de todos os insumos utilizados em todos os testes, qualitativos e quantitativos, foi obtido através dos fabricantes de cada insumo. A quantidade de insumos utilizados por teste foi registrada para posterior avaliação, dividindo-se o valor total do insumo pela quantidade utilizada para a realização de um teste.

Foram apenas avaliados os insumos e conjuntos de reagentes utilizados em cada técnica, não incluindo a avaliação do custo da mão-de-obra e dos equipamentos.

4.7. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados demográficos e epidemiológicos (sexo, idade, comportamento de risco) e os resultados obtidos nos testes foram digitados e codificados em uma planilha criada no programa EXCEL 8.0 (Windows). Foi realizada análise estatística descritiva com cálculo de freqüências, média \pm desvio padrão, mediana e intervalos de confiança (IC).

A correlação entre variáveis foi analisada através do coeficiente de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A concordância entre os ensaios foi realizada pelo cálculo do valor de kappa.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad InStat® 3.01 (GraphPad software, San Diego, CA) e MedCalc for Windows, version 8.0.1.0 (MedCalc software, Maria Kerke, Bélgica). Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism ou Excel 8.0.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE ESTUDO

A amostra de pacientes estudada foi composta por 43 indivíduos soropositivos para hepatite C (anti-HCV positivo), dos quais 37 não haviam sido submetidos ao tratamento antiviral. Houve a participação de 23 (53,5%) mulheres e 20 (46,5%) homens, com média de idade de 52,6 anos +/- 9,7 anos (variando de 23 a 70 anos). Houve predomínio (69,8%) de indivíduos na faixa etária de 41 a 60 anos como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição da amostra estudada de acordo com sexo e faixa etária

Faixa etária	Sexo		
	Feminino	Masculino	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
0 - 30	0 (0)	2 (100)	2 (4,7%)
31 - 40	1(50)	1 (50)	2 (4,7%)
41 - 50	9 (60)	6 (40)	15 (34,9%)
51 - 60	6 (40)	9 (60)	15 (34,9%)
61 - 70	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (20,9%)
Total	23 (53,5)	20 (46,5)	43 (100)

Um grupo de seis indivíduos com infecção aguda pelo HCV forneceu amostras seriadas de soro durante o curso da infecção, sendo, três indivíduos do sexo feminino e três do sexo masculino. Com média de idade de 44,5 anos +/- 9,8 anos (variando de 38 a 58 anos) e o número de amostras doadas variou de cinco a 16 coletas por indivíduo. Diferentes fatores de risco foram relatados, porém, o contato sexual com parceiro infectado pelo HCV foi o mais relatado. Os outros fatores de risco indicados foram: tatuagem, hospitalização, contato com paciente hospitalizado, hemodiálise e coinfeção pelo HIV (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos indivíduos que doaram amostras seriadas de soro para pesquisa do RNA do HCV (n=6)

Paciente	Nº de amostras	Sexo	Idade	Comportamento de risco	Tratamento antiviral
1	7	F	58	Tatuagem/hospitalização	sim
2	12	F	48	Relação sexual com parceiro positivo	não
3	9	F	44	Relação sexual desprotegida	não
4	5	M	38	Hospitalização familiar	não
5	16	M	30	Coinfecção com HIV	não
6	9	M	56	Hemodiálise	não

5.2. DETECÇÃO DO RNA DO HCV

Na tabela 3, podemos observar as frequências de detecção do RNA do HCV pelas diferentes técnicas empregadas, sendo considerado resultado positivo nos testes quantitativos as amostras cujos resultados foram acima do limite mínimo de detecção do teste. A técnica TMA apresentou a maior frequência (98%) de detecção do RNA do HCV em relação às outras técnicas utilizadas. Por outro lado, a técnica de DNA ramificado apresentou a menor frequência (88%) de detecção, com 38 amostras reagentes. Já a técnica de *nested* RT-PCR desenvolvida em nosso laboratório apresentou frequência de detecção semelhante às outras técnicas, com maior positividade (n=40; 93%) do que as técnicas de DNA ramificado (n=38; 88%) e COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 (n=39; 91%).

Tabela 3. Frequência de detecção do RNA do HCV nos pacientes estudados de acordo com as diferentes técnicas moleculares empregadas

Resultado	RT-Nested PCR in house n (%)	PCR-ELISA qualitativa a n (%)	TMA n (%)	bDNA n (%)	PCR-ELISA quantitativa b n (%)
Positivo	40 (93)	41 (95)	42 (98)	38 (88)	39 (91)
Negativo	03 (7)	02 (5)	01 (2)	05 (12)	04 (9)
Total	43	43	43	43	43

a COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0

b COBAS® AMPLICOR MONITOR HCV Test v2.0

Verificamos que todas as amostras reagentes pela técnica de RT- *nested* PCR também foram reagentes pelos testes moleculares qualitativos comerciais (COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 e TMA). Uma amostra foi reagente pela técnica de PCR-ELISA qualitativa e TMA, porém, não foi detectada pela RT- *nested* PCR ou pelas técnicas quantitativas. Além disso, uma única amostra foi reagente somente pela técnica TMA e outra amostra foi não-reagente para todos os testes empregados.

Ao compararmos os resultados obtidos entre a técnica de RT-*nested* PCR e PCR-ELISA qualitativa, observamos boa concordância entre ambos, com valor de kappa de 0,788. No entanto, ao compararmos os resultados obtidos entre a técnica de RT-*nested* PCR e TMA, o valor de kappa foi bem menor (0,482), demonstrando baixa concordância entre esses dois testes.

Em relação aos resultados obtidos entre os testes quantitativos, verificamos boa concordância entre os resultados do teste de DNA ramificado e PCR-ELISA quantitativa, com valor de kappa igual a 0,876. Ao compararmos a detecção pela técnica de RT-*nested* PCR com o resultado obtido pela técnica de PCR-ELISA quantitativa verificamos boa concordância com valor de kappa igual a 0,845; porém, em relação a técnica de DNA ramificado, esta concordância foi relativamente menor, com valor de kappa igual a 0,726.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DO RNA DO HCV

A carga viral obtida na amostra de pacientes estudados variou de 1652 a 3.181.220 UI/mL pela técnica de DNA ramificado, e de 1.740 a mais de 700.000 UI/mL pela técnica de PCR-ELISA. Observamos forte correlação positiva entre estes resultados, com valor de coeficiente de correlação de Spearman igual a 0,91 ($p < 0,0001$).

Podemos observar na figura 12 que a carga viral determinada na maioria das amostras (32/43) pelo DNA ramificado se concentrou abaixo de 500.000UI/mL. Já dentre as amostras analisadas pela PCR-ELISA quantitativa, a maioria (23/43) apresentou carga viral acima de 500.000UI/mL.

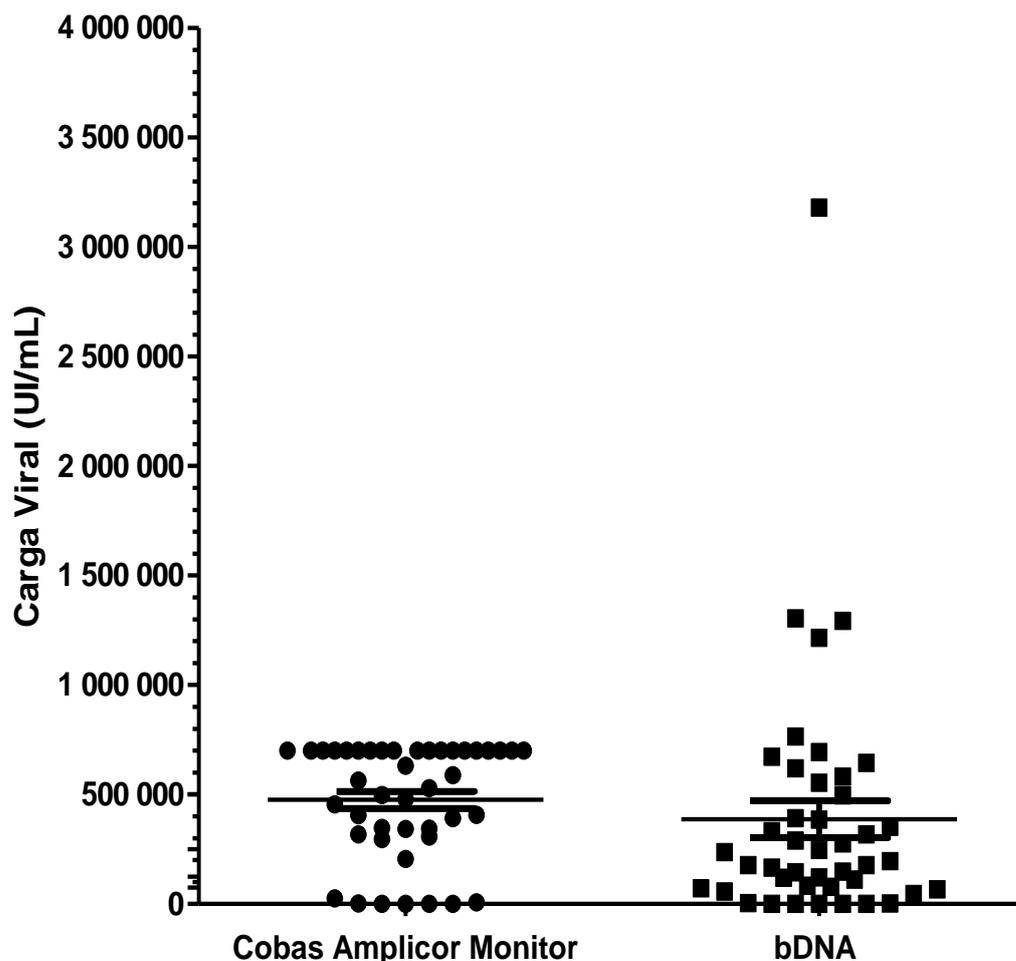


Figura 12. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de bDNA e PCR-ELISA quantitativa (COBAS® AMPLICOR MONITOR Test v2.0) nas amostras do estudo.

Ao avaliarmos a relação entre a carga viral e a detecção do RNA pela técnica de RT-*nested* PCR, observamos que a maioria das amostras reagentes pela técnica RT-*nested* PCR (36/40) apresentava carga viral abaixo de 800.000 UI/mL pela técnica de DNA ramificado (Tabela 4). Porém, não foi possível realizar a comparação entre as amostras reagentes pela técnica de RT-*nested* PCR e a carga viral obtida pela técnica de PCR-ELISA quantitativa pela não diluição das amostras que apresentaram carga viral igual a 700.000 UI/mL. Foi possível observar que todas as amostras não reagentes pela técnica de RT-*nested* PCR também não foram detectadas pelos testes quantitativos comerciais.

Tabela 4. Relação entre a carga viral obtida pela técnica de bDNA e os resultados obtidos pela técnica de RT-*nested* PCR

Carga Viral (UI/mL)	RT-Nested PCR		Total
	Positivo	Negativo	
< 800.000	36	3	36
≥ 800.000	4	0	4
Total	40	3	43

5.4. GENOTIPAGEM

Neste estudo, 36 indivíduos apresentaram o genótipo 1 e seis indivíduos apresentaram genótipo 3, e um indivíduo não foi possível a identificação do genótipo infectante pela técnica RT-PCR/RFLP. Todas as amostras de genótipo 3 foram detectadas por todos os testes qualitativos avaliados neste estudo. Dos 36 indivíduos com genótipo 1, dois não foram detectados pela RT- *nested* PCR e um não foi detectado pela PCR-ELISA qualitativa, porém todos foram detectados pelo TMA. Nos pacientes com genótipo 1, a carga viral variou de 340.000 UI/mL a 700.000 UI/mL na PCR-ELISA quantitativa e de 46.099 UI/mL a 1.304.930 UI/mL no DNA ramificado. A carga viral dos pacientes com genótipo 3 variou de 0 a 700.000 UI/mL na PCR-ELISA quantitativa e de 0 a 3.181.210 UI/mL no DNA ramificado, sendo um paciente em tratamento e cinco não tratados. O paciente de número 1 é o paciente em tratamento enquanto que os pacientes de número 2, 3, 4, 5 e 6 não foram tratados.

5.5. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO HCV DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO AGUDA

Neste estudo, seis indivíduos (pacientes 1 a 6, tabela 2) que apresentavam infecção aguda pelo HCV forneceram amostras seriadas desde a semana 0 até a 290^a semana após o início dos sintomas. Na tabela 5, está apresentada a frequência de resultados reagentes para as técnicas utilizadas em relação ao período de coleta após o início dos sintomas. Podemos observar que a técnica de TMA forneceu maior número de amostras reagentes dentre as amostras coletadas até a 12^a semana e a partir da 24^a semana após o início dos sintomas. A técnica de DNA ramificado foi mais eficiente no período de 13 a 24 semanas após o início dos sintomas e a técnica de PCR-ELISA quantitativa teve igual eficiência no período de 0 a 12 semanas e 13 a 24 semanas após o

início dos sintomas. A técnica de RT-nested PCR apresentou a terceira maior taxa de detecção em todos os períodos avaliados.

Tabela 5. Frequência de amostras reagentes fornecidas pelos indivíduos com infecção pelo HCV coletadas em diferentes períodos após o início dos sintomas

Período (semana) de coleta das amostras (n= 52)	RT- nested PCR n (%)	PCR-ELISA qualitativa a n (%)	TMA n (%)	bDNA n (%)	PCR-ELISA quantitativa b n (%)
S₀-S₁₂ (n=14)	7	9	13	6	7
S₁₃-S₂₄ (n=10)	5	6	7	4	5
>S₂₄ * (n=28)	7	10	14	4	5
Total	19/52	25/52	34/52	14/52	17/52

a COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0

b COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0

S, semanas após o início dos sintomas

* Até a 290ª semana

Também avaliamos os resultados dos testes qualitativos e quantitativos para a detecção do RNA do HCV nos seis pacientes com infecção aguda que forneceram amostras seriadas neste estudo. Nas figuras 13 a 16 estão representadas as cargas virais obtidas pelos métodos de DNA ramificado e PCR-ELISA quantitativa destes pacientes.

Na figura 13 estão representados os resultados das cargas virais do paciente 1 que apresentava história de tatuagem e hospitalização e forneceu amostras das 28.^a a 85.^a semanas. Observamos carga viral mais alta na primeira amostra coletada, onde o indivíduo ainda não tinha sido submetido ao tratamento antiviral, com valores de 589.000 UI/mL e 352.557 UI/mL nos testes COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 e DNA ramificado, respectivamente. Após o início do tratamento, que ocorreu após a 28ª semana, verificamos redução de 1 log da carga viral pela técnica de DNA ramificado a partir da 32ª semana, apresentando níveis indetectáveis na 36ª semana pelo DNA ramificado.

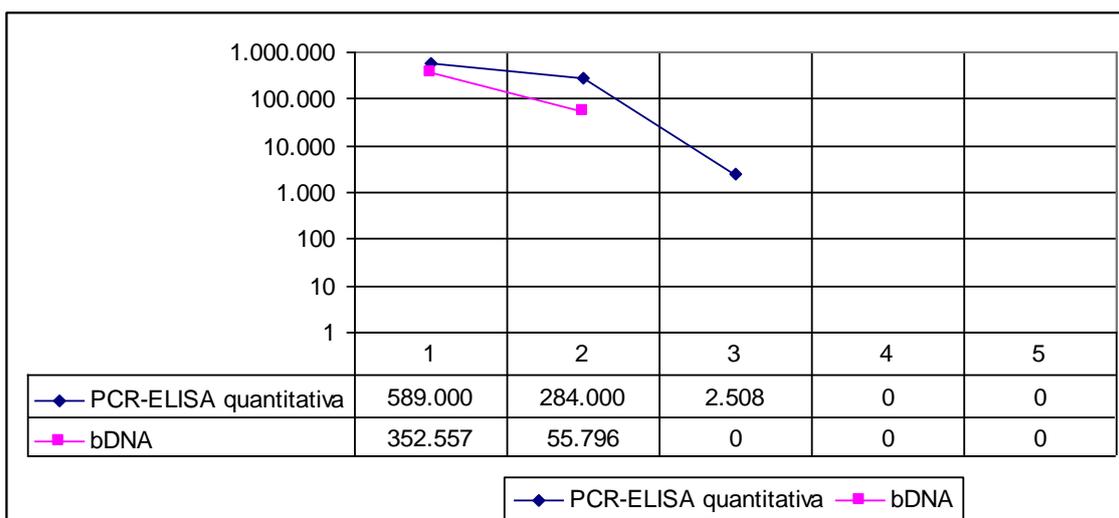


Figura 13. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 1.

Na figura 14 estão representados os resultados das cargas virais do paciente 2 que tinha história de relação sexual com parceiro com hepatite C e apresentou picos de viremia nas 12^a, 20^a e 24^a semana. Este paciente não foi tratado durante o período do estudo. Podemos observar que a técnica de PCR-ELISA quantitativa apresentou taxas maiores de detecção em relação ao DNA ramificado, visto que na 20^a semana após a infecção o paciente apresentou resultado reagente pela PCR-ELISA quantitativa, mas indetectável pelo DNA ramificado. Porém, ao se avaliar os resultados dos testes qualitativos observou-se positividade na 12^a, 20^a, 24^a e 28^a semana por todos os testes qualitativos, sendo positivo apenas pelo TMA nas 3^a, 4^a, 10^a e 21^a semanas. Na 16^a semana, o RNA viral foi detectado tanto pelo COBAS[®] AMPLICOR HCV Test v2.0 como pelo TMA.

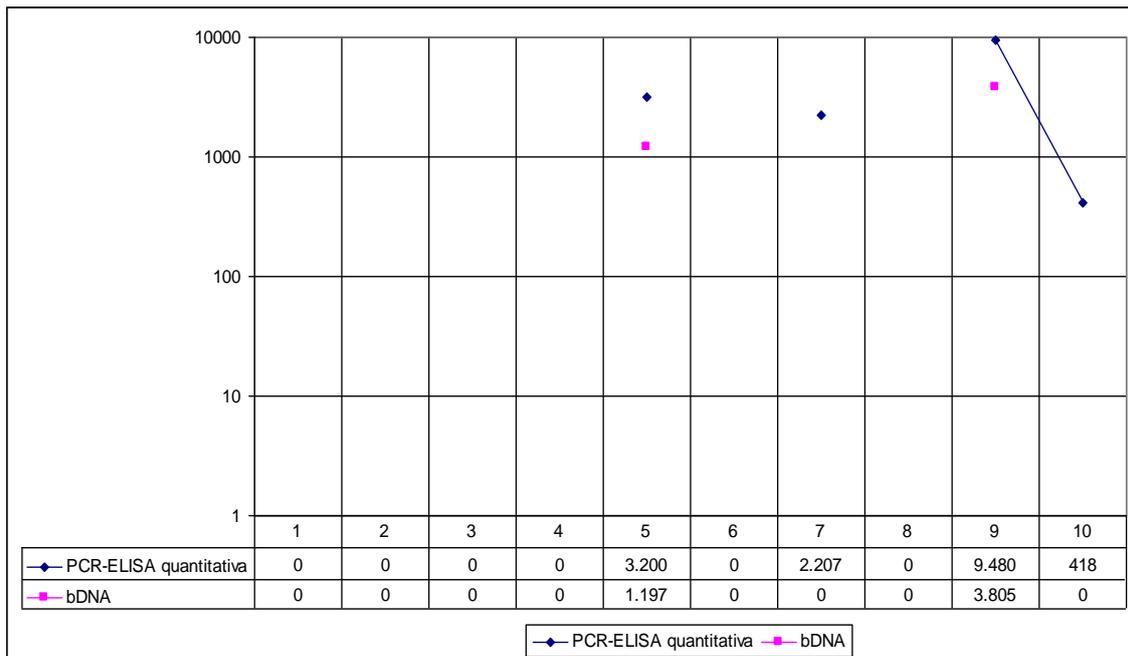


Figura 14. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 2.

O paciente 3 apresentou como comportamento de risco o fato de manter relações sexuais com indivíduo desconhecido. Este paciente apresentou carga viral baixa durante todo o período (13^a a 144^a semana) em que foi atendido no Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do LAHEP. Devido a este fato, não teve carga viral detectada por ambos os testes quantitativos avaliados neste estudo, porém, teve o RNA do HCV detectado pelo TMA na 144^a semana.

O paciente 4 apresentou como comportamento de risco hospitalização familiar. Foi atendido no Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do LAHEP no período da 12^a a 32^a semana, não apresentando carga viral detectável pelos testes quantitativos avaliados neste estudo, porém, apresentou o RNA do HCV detectável na 12^a semana pelas técnicas de TMA e PCR-ELISA qualitativa e na 32^a apenas pelo TMA.

Na figura 15 estão representados os resultados das cargas virais detectáveis pelo COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 e pelo DNA ramificado do paciente 5. Paciente com coinfeção HCV/HIV que na 48^a semana obteve níveis de cargas virais indetectáveis pelas técnicas quantitativas avaliadas neste estudo. Porém, quando avaliado pelos testes qualitativos, observamos positividade nas 8^a, 14^a, 25^a e 32^a semanas por todos os testes

qualitativos avaliados neste estudo; positividade nas 48^a, 161^a, 176^a e 199^a pelo TMA; e positividade nas 112^a e 176^a semanas pelo COBAS[®] AMPLICOR HCV Test v2.0.

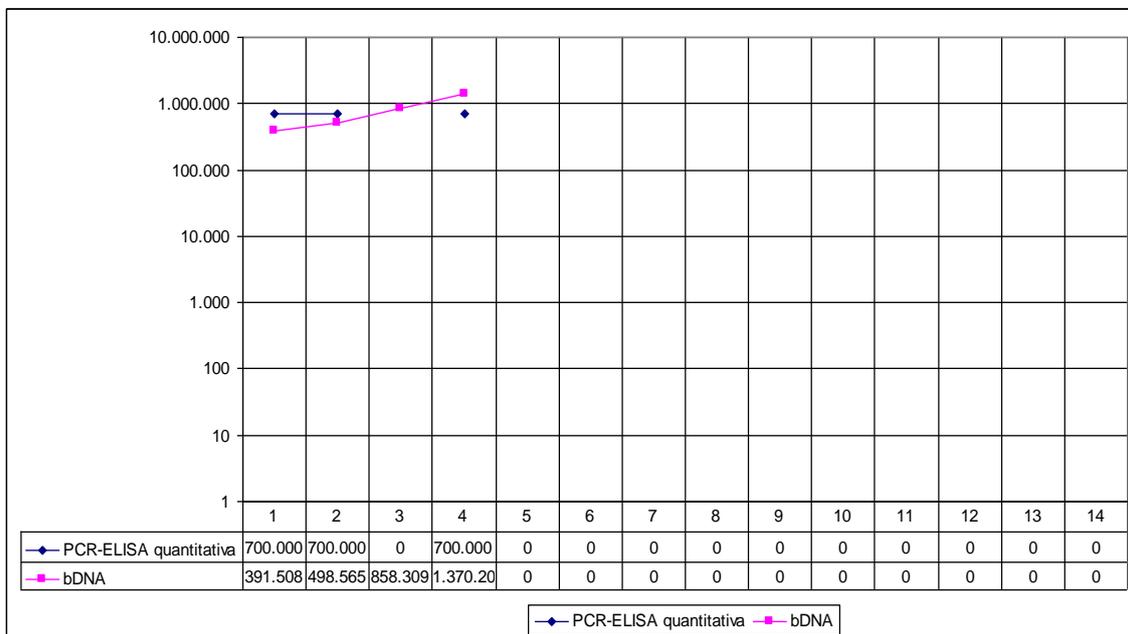


Figura 15. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 5.

Na figura 16 estão representados os resultados das cargas virais detectadas pelo COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 e pelo DNA ramificado do paciente 6 que era hemodialisado e não foi tratado durante o período em que foi atendido pelo Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do LAHEP. Foi possível observar um aumento da carga viral entre a 4^a e a 10^a semana. Em relação à positividade nos testes qualitativos, todas as amostras referentes ao período da 4^a a 20^a semana foram detectáveis, somente apresentando-se negativo na 4^a semana pela RT-*nested* PCR.

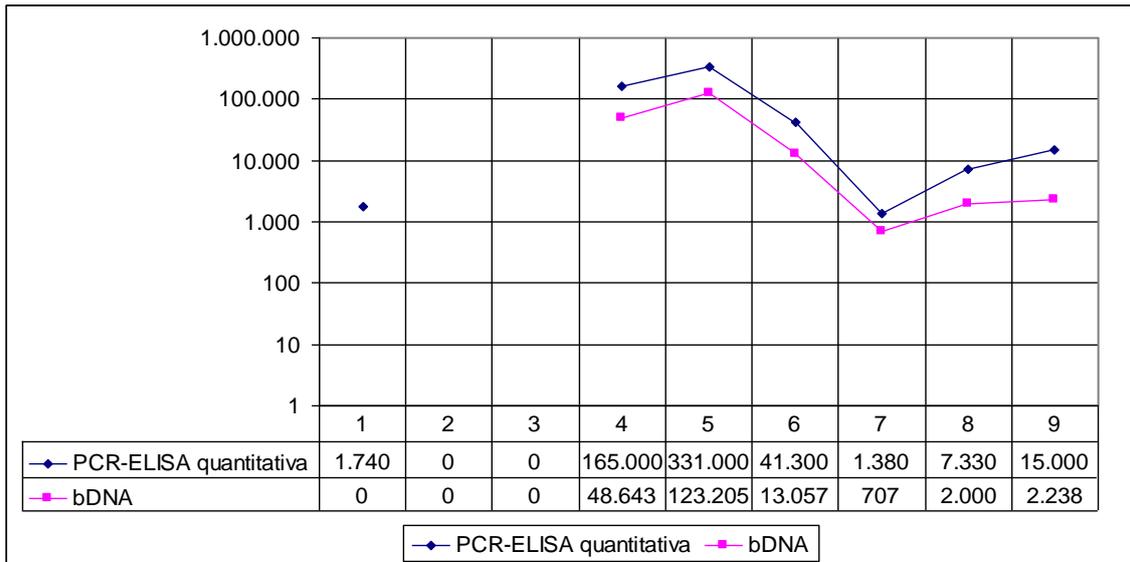


Figura 16. Valores de carga viral obtidos pelos métodos de PCR-ELISA quantitativa e bDNA no paciente 6.

5.6. AVALIAÇÃO DE MINIMIZAÇÃO DE CUSTOS

Neste estudo, avaliamos o custo das diferentes técnicas moleculares utilizadas para identificar os testes qualitativos e quantitativos de menor e maior custo (Tabela 6).

A RT-*nested* PCR foi identificada como a técnica com menor custo por teste (R\$ 45,00). Além dessa vantagem, a técnica apresentou desempenho semelhante ao da PCR-ELISA qualitativa; porém, apresenta a desvantagem de ser uma técnica manual, aumentando o risco de contaminação.

A PCR-ELISA quantitativa apresentou custo baixo (R\$ 121,00) quando comparado ao DNA ramificado (R\$ 516,00). Ambas as técnicas de DNA ramificado e PCR-ELISA quantitativa são semi-automatizadas, porém a PCR-ELISA quantitativa apresenta uma desvantagem de ser uma técnica onde a etapa de extração do RNA viral é manual. Ambas as técnicas apresentaram valores de carga viral muito correlacionados.

A técnica de TMA é a que possui maior custo (R\$ 487,00) quando comparada às outras técnicas qualitativas (PCR-ELISA qualitativa - R\$ 141,00 e RT-*nested* PCR - R\$ 45,00). Além disso, é manual como a técnica de RT-*nested* PCR, enquanto que PCR-ELISA é semi-automatizada.

Tabela 6. Custo e tempo gasto por teste realizado

Teste	TMA	RT-nested PCR	PCR-ELISA qualitativa	PCR-ELISA quantitativa	bDNA
Custo por teste (R\$)	487,00	45,00	141,00	121,00	516,00
Tempo gasto por teste realizado (minutos)	9,56	23,96	17,73	24,28	12,69

6. DISCUSSÃO

6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A infecção pelo vírus da hepatite C atinge 123 milhões de indivíduos em todo o mundo, sendo o HCV o principal agente causal das hepatites crônicas (PERZ *et al.*, 2004). A infecção apresenta caráter assintomático na maioria dos casos e, por este motivo, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a triagem sanguínea em bancos de sangue por meio da Portaria nº 1376, de 19 de novembro de 1993 (MS, 1993), assim como determinou, em 2002, a utilização de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para detecção do RNA do HCV em todas as unidades de coleta de sangue no país por meio da Portaria nº 1407 (MS, 2002).

Os testes moleculares são essenciais para a redução da janela imunológica, pois os anticorpos anti-HCV, em geral, podem ser detectados somente entre 12 e 26 semanas a partir do contágio (ERENSOY, 2001). Além disso, tais testes são úteis para o estabelecimento do diagnóstico e monitoramento da resposta à terapia antiviral. A utilização de técnicas moleculares de alta sensibilidade torna-se fundamental em indivíduos imunossuprimidos ou imunodeficientes, assim como em pacientes hemodialisados, a fim de reduzir a transmissão viral.

Assim, vários ensaios foram produzidos com diferentes metodologias e custos variados. Por este motivo, torna-se necessária a avaliação destes métodos para caracterização dos métodos mais apropriados a serem utilizados em diferentes períodos do curso da infecção.

6.2. AVALIAÇÃO DOS TESTES DE DETECÇÃO QUALITATIVA DO RNA DO HCV

No presente estudo, cinco técnicas moleculares foram avaliadas para a detecção e quantificação do RNA do HCV. Para a detecção qualitativa do RNA do HCV avaliamos três técnicas com princípios metodológicos distintos, a saber, RT-*nested* PCR, PCR-ELISA e TMA, onde observou-se boa concordância entre os resultados obtidos em pacientes com infecção crônica

pelo HCV e virgens de tratamento antiviral, demonstrando ótimo desempenho destas técnicas para o diagnóstico da infecção pelo HCV.

Os testes RT- *nested* PCR e PCR-ELISA apresentam o mesmo limite mínimo de detecção (50 UI/mL) (LEE *et al.*, 2000; DE ALMEIDA *et al.*, 2007), enquanto a técnica de TMA apresenta limite de detecção de aproximadamente 10 UI/mL e, por este motivo, tem sido utilizada para identificar os casos suspeitos de infecção pelo HCV quando as técnicas qualitativas baseadas em RT-PCR não foram capazes de detectar o RNA viral (LAUER *et al.*, 2001). Além disso, a técnica TMA também se mostrou útil na avaliação da resposta ao tratamento antiviral, principalmente na detecção de viremia residual ao final do tratamento. (SARRAZIN *et al.*, 2000; COMANOR *et al.*, 2001). Os nossos resultados comprovaram a maior sensibilidade desta técnica, pois 98% das amostras de soro obtidas de pacientes virgens de tratamento antiviral foram reagentes por esta técnica, demonstrando a utilidade da mesma para avaliação mais precisa da resposta virológica, e fornecendo, assim, resultados clinicamente mais relevantes tal como observado por outros autores (YAMAKAWA *et al.*, 1998; DOGLIO *et al.*, 1999 ; McHUTCHISON *et al.*, 1999).

Apesar da alta sensibilidade da técnica TMA, também observamos boa sensibilidade da técnica RT-*nested* PCR desenvolvida em nosso laboratório, tendo demonstrado ser bastante útil na detecção do RNA do HCV em pacientes antes do tratamento antiviral. Esta mesma técnica também já foi empregada para a detecção do RNA do HCV em plaquetas onde apresentou excelente efetividade, inclusive detectando infecção oculta pelo HCV ao final do tratamento antiviral (DE ALMEIDA *et al.*, 2009).

Em relação ao curso da infecção aguda pelo HCV, não verificamos grandes diferenças em relação à técnica de RT-*nested* PCR e COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0, porém, a técnica TMA foi mais sensível, principalmente, após a 24ª semana. Resultados similares foram demonstrados por outros autores (YAMAKAWA *et al.*, 1998; DOGLIO *et al.*, 1999; McHUTCHISON *et al.*, 1999; SARRAZIN *et al.*, 2000; COMANOR *et al.*, 2001).

6.3. AVALIAÇÃO DOS TESTES DE DETECÇÃO QUANTITATIVA DO RNA DO HCV

A utilidade clínica da quantificação do RNA do HCV está bem estabelecida na literatura científica (SARRAZIN *et al.*, 2006). A quantificação do RNA do HCV representa um importante marcador de valor prognóstico para resposta ao tratamento antiviral. O monitoramento da carga viral antes, durante e após o término da terapia antiviral é crucial para o controle da hepatite C. Na caracterização da avaliação da resposta virológica é fundamental que o paciente apresente diminuição no valor da carga viral em 2 logs, daí a necessidade de o paciente ter a sua avaliação de resposta ao tratamento realizada pelo mesmo teste diagnóstico durante toda a terapia, uma vez que, de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, foi possível observar variação nos valores de carga viral das amostras clínicas analisadas. Foi observada diferença de mais de 2 logs quando se comparam as cargas virais determinadas pela PCR-ELISA quantitativa e pelo bDNA nos diferentes períodos da infecção pelo HCV. Estes resultados mostraram uma superestimação do valor da carga viral do HCV pela PCR-ELISA quantitativa quando da utilização de metodologias distintas de quantificação durante o tratamento, o que pode interferir na avaliação da resposta ao tratamento pelo médico assistente.

Os médicos devem estar cientes do método de ensaio utilizado para quantificação do HCV no seguimento de pacientes durante o curso terapêutico, já que a manutenção da mesma metodologia poderá otimizar a avaliação dos resultados em cada paciente. Em pacientes com carga viral baixa, este efeito é relativamente mínimo, mas em pacientes com carga viral elevada, pode ocorrer grande variabilidade na determinação da carga viral, comprometendo a avaliação da resposta ao tratamento (KENNETH *et al.*, 2002).

A falta de padronização entre os ensaios de quantificação do HCV foi superada, em parte, pelo desenvolvimento e adoção da Unidade Internacional (UI) padrão na expressão dos resultados (SALDANHA *et al.*, 2005). No entanto, os resultados continuam apresentando diferenças significativas entre os testes, apesar da padronização em UI/mL (CALIENDO *et al.*, 2006).

A incapacidade de detectar níveis mais baixos de RNA do HCV de acordo com algumas metodologias pode levar a relatos de resultados falsos

negativos ao término da terapia antiviral e pode implicar no uso de ensaios complementares dotados de maior sensibilidade, incluindo PCR qualitativa e TMA (KENNETH *et al.*, 2002). Neste trabalho, foram avaliados os testes bDNA v2.0 e COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0, que são testes comerciais, amplamente utilizados na rotina diagnóstica. Ambos os testes têm excelente reprodutibilidade, mas o DNA ramificado tem uma baixa sensibilidade quando comparado ao teste COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0, provavelmente por terem princípios distintos (McHUTCHISON *et al.*, 1998; DOGLIO *et al.*, 1999; HSIEH *et al.*, 2007).

O COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 quando comparado ao bDNA possui um limite superior de detecção muito mais baixo (700.000 UI/mL *versus* 7.700.000 UI/mL). Dessa forma, com a utilização do COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 será necessário, em muitos casos, a repetição do teste com a inclusão de uma etapa a mais, a de diluição da amostra, para determinação precisa da carga viral. Estudos anteriores mostraram que cerca de 70% das amostras de soro de pacientes em pré-tratamento contêm 2.000.000 cópias/mL (cerca de 800.000 UI/mL) do RNA do HCV (McHUTCHISON *et al.*, 1998), fazendo com que o COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 seja um ensaio impróprio para quantificação exata do RNA do HCV na maior parte dos soros de paciente em pré-tratamento se não for incluída etapa de diluição da amostra. Contudo, do ponto de vista da relevância clínica, valores altos de carga viral são considerados para aquelas acima de 800.000UI/mL (PAWLOTSKY *et al.*, 2000).

Dados recentes indicaram superestimação e subestimação dos níveis de HCV RNA pelo teste da Roche COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan HCV Test, que é um método baseado na PCR em tempo real. Primeiramente, há uma superestimação nos níveis de RNA do HCV em amostras não diluídas, de aproximadamente 0,6 log UI/mL, e a superestimação aumenta na medida em que ocorre o aumento da carga viral. Segundo Chevaliez e colaboradores, há uma subestimação nos níveis de RNA do HCV em aproximadamente 15% das amostras infectadas com o genótipo 2 e 30% das amostras com o genótipo 4, provavelmente, devido a incompatibilidades das sequências-alvo com o *primer* e / ou a sonda utilizados neste ensaio (CHEVALIEZ *et al.*, 2007). Grandes diferenças na quantificação do RNA do HCV entre o teste da COBAS[®]

AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan HCV Test e o bDNA foram restritos apenas ao bDNA genótipo 1 e / ou 4 (CALIENDO *et al.*, 2006). De acordo com Sarrazin e colaboradores (2006) o teste apresentou concentrações de RNA do HCV 0,5 log menor em comparação com a análise feita por meio do COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 para amostras com genótipos 1 a 3, enquanto que uma boa correlação das concentrações do RNA do HCV foi encontrada em amostras infectadas com genótipo 4 ou 5 quando usados os testes bDNA e COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0.

Com o uso do teste de bDNA 2.0 valores precisos dos títulos virais podem não ser obtidos quando a carga viral encontra-se abaixo de 100.000 UI/mL, podendo apresentar taxa de resultados falsos negativos de até 3%, enquanto que o COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 não demonstrou a presença de resultados falsos positivos mesmo após a avaliação de 495 amostras HCV negativas de doadores de sangue (PAWLOTSKY *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2000).

Os testes mais sensíveis para a quantificação do RNA do HCV são baseados em RT-PCR quando comparados ao bDNA, que possui um princípio diferente onde o RNA não é amplificado, mas capturado por hidridização com sondas específicas que são, por sua vez, detectadas por quimioluminescência, cuja intensidade é proporcional à quantidade de RNA presente na amostra (TRABAUD *et al.*, 1997). O COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 é uma técnica baseada na RT-PCR e, de acordo com os dados obtidos neste estudo, apresentou valores de carga viral maiores na grande parte das amostras seriadas testadas quando comparados aos resultados obtidos com a técnica de bDNA.

6.4. COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS

O COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 apresentou superestimação da carga viral quando o comparamos com o bDNA, principalmente, quando avaliamos os pacientes agudos que apresentavam determinação seriada da carga viral (figuras 11, 12, 13 e 14). É possível que fosse ainda maior essa superestimação, caso a diluição das amostras de soro

que foram quantificadas pelo COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 tivesse sido realizada (PISANI *et al.*, 2002; KONNICK *et al.*, 2005).

Apesar dos limites mínimos de detecção do RNA do HCV dos testes quantitativos serem bem semelhantes (bDNA, 615 UI/mL *versus* COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0. 600 UI/mL), o COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 obteve maior detecção em relação ao bDNA (91% *versus* 88%).

O COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0. forneceu valores de sensibilidade de 97,5% e de especificidade de 100 %, de acordo com os dados estatísticos fornecidos pela curva ROC, enquanto que o bDNA apresentou sensibilidade de 95,0 % e especificidade de 100 %.

Os testes qualitativos avaliados neste estudo apresentaram frequências de resultados detectados e não detectados semelhantes, com exceção do TMA que forneceu a maior taxa de amostras positivas, possivelmente, por possuir limite mínimo de detecção mais baixo (10 UI/mL) enquanto que o COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 possui um limite de detecção de 50 UI/mL (MORISHIMA *et al.*, 2006).

De acordo com o teste qui quadrado os testes RT- *nested* PCR e o COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 se comportam de forma semelhante com um p de 0,0001 enquanto que o RT- *nested* PCR e o TMA não se comportam de forma semelhante com um p de 0,0875.

Os genótipos das amostras estudadas foram caracterizados como genótipo 1 ou 3, porém, devido ao pequeno tamanho amostras (n=6) não foi possível avaliar os valores de sensibilidade e especificidade dos testes em relação ao genótipo 3.

6.5. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

O teste qualitativo TMA apresentou custo mais elevado quando comparado aos outros testes qualitativos analisados no presente estudo, sendo a RT-*nested* PCR o teste de menor custo financeiro. O valor gasto para realizar um teste pelo TMA permite a realização de 10 testes pela RT-*nested* PCR.

Em relação aos testes quantitativos, o COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 apresentou menor custo quando comparado ao bDNA. O

valor gasto para a realização de um teste pelo bDNA permite a realização de quatro testes pelo COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0.

Caso haja a necessidade da quantificação do RNA do HCV para o início do tratamento ou durante o acompanhamento é importante se considerar, além da faixa dinâmica de detecção, o seu custo financeiro, já que o bDNA é uma técnica mais cara do que a PCR-ELISA quantitativa por teste realizado. Mesmo nos casos em que as amostras necessitem de diluição, pelo COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0, o custo do bDNA continua sendo superior.

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A. Os testes qualitativos e quantitativos aqui apresentados são de extrema aplicabilidade para o diagnóstico laboratorial e monitoramento no pré-tratamento, durante e pós-tratamento quando se objetiva avaliar o tipo de resposta virológica nos pacientes tratados.

A RT-*nested* PCR, por ser uma técnica de baixo custo e possuir uma ótima concordância com a PCR-ELISA qualitativa, é indicada na detecção do RNA do HCV, sendo o TMA indicado nos casos em que não houver detecção pelo RT-*nested* PCR. Isto porque o TMA é uma técnica com elevado custo, porém com um baixo limite mínimo de detecção permitindo a detecção de HCV-RNA em amostras com baixa viremia. Na Figura 16 é apresentado um algoritmo sugerido para a realização da detecção do RNA do HCV, no qual a técnica RT-*nested*-PCR constitui o teste de primeira escolha na caracterização das amostras de soro a serem testadas.

Cada ensaio (qualitativo ou quantitativo) tem a sua aplicabilidade e importância em cada período do curso da infecção pelo HCV, sendo os ensaios qualitativos mais apropriados para a detecção do RNA viral no início da infecção, fase aguda, e a utilização de técnicas quantitativas mais apropriadas quando se planeja avaliar pacientes candidatos ao tratamento antiviral.

Em relação aos testes quantitativos, a PCR-ELISA quantitativa apresentou baixo custo em relação ao bDNA, mesmo em casos de amostras com carga viral acima de 700.000 UI/mL pela PCR-ELISA qualitativa, o custo do bDNA continua sendo superior.

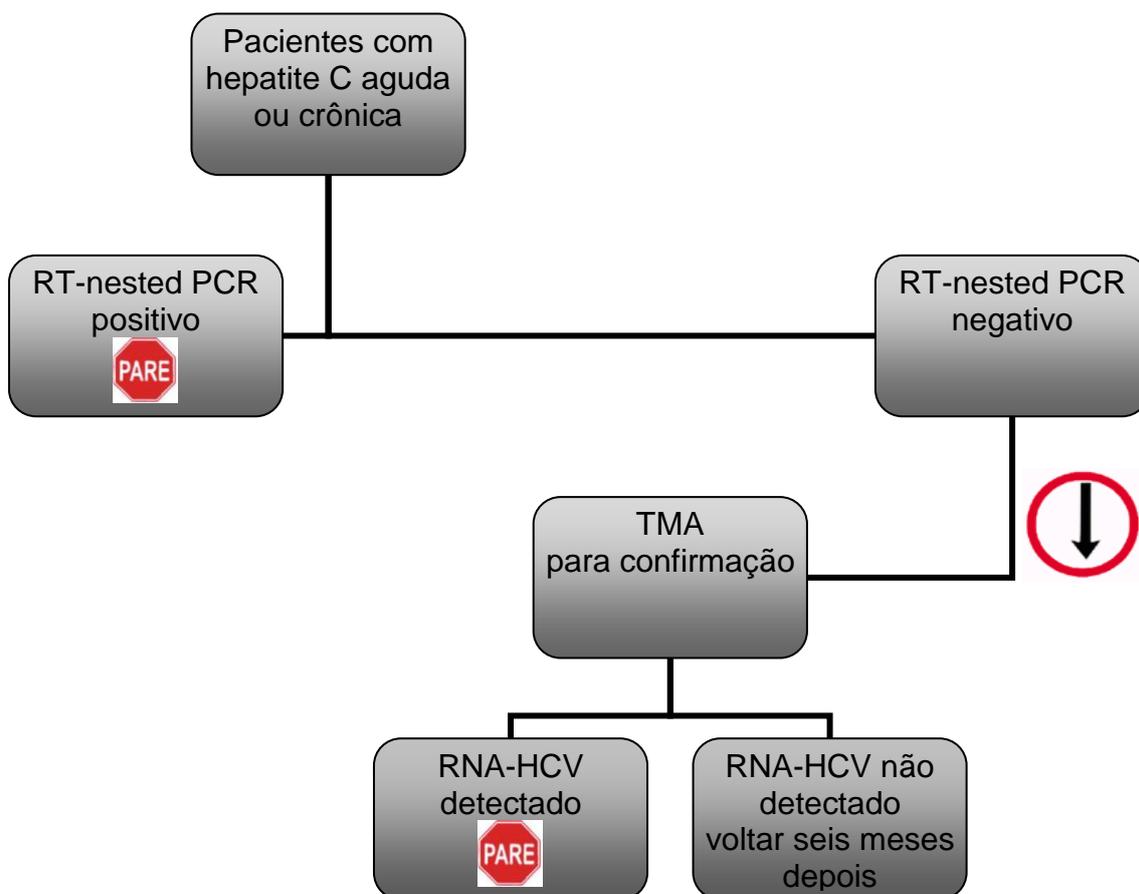


Figura 16. Algoritmo sugerido para a realização da detecção do RNA do HCV

De acordo com os resultados de desempenho das técnicas estudadas e o custo avaliado foi sugerido um algoritmo para o diagnóstico molecular de pacientes com hepatite aguda ou crônica, onde as amostras seriam, primeiramente, testadas pela *RT-nested* PCR, que apresentou boa concordância com a PCR-ELISA qualitativa e é uma técnica de baixo custo. Uma vez sendo detectado o RNA do HCV, o diagnóstico já poderia ser concluído como HCV RNA positivo; porém, caso não seja detectado o RNA do HCV, a técnica de TMA seria indicada para dar prosseguimento ao diagnóstico, uma vez que possui limite mínimo de detecção extremamente baixo (10 UI/mL).

Um painel de referência, que será empregado para o desenvolvimento de testes moleculares quantitativos, foi desenvolvido com a utilização de um grupo de amostras de soro obtidas de indivíduos soropositivos (HCV-RNA positivo) para hepatite C com valores pré-determinados de carga viral pelos distintos testes aqui apresentados.

7. CONCLUSÕES

B. A técnica de RT-*nested* PCR apresentou muito bom desempenho quando comparada com a PCR-ELISA qualitativa, porém inferior em comparação ao TMA, teste este que apresentou melhor desempenho na detecção qualitativa do HCV-RNA.

C. Os testes de detecção qualitativa apresentaram desempenhos similares no diagnóstico da infecção aguda pelo HCV quando consideradas testagens seriadas durante este período.

D. O teste TMA foi o mais eficiente na caracterização da infecção precoce (nas primeiras 12 semanas) pelo HCV e após a 24^a semana da infecção aguda pelo HCV.

E. Apesar da correlação positiva entre os valores de carga viral determinados pela PCR-ELISA quantitativa e pelo bDNA, devido à diferença superior a 2 logs observada em alguns casos, a utilização uniforme de única metodologia em amostras seriadas é mais apropriada.

F. Os testes COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 e bDNA apresentaram desempenhos similares na detecção qualitativa do RNA do HCV, contudo, a determinação repetida de carga viral após diluição de parte das amostras de soro com valores > 700.000 UI/mL no teste COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0 pode contribuir para aumentar o custo de realização dos testes por esta metodologia.

G. Em relação aos testes de detecção quantitativa nas amostras seriadas do grupo de indivíduos com infecção aguda pelo HCV observamos melhor desempenho da técnica COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0.

H. Com base na avaliação de minimização de custos foi possível identificar a técnica RT-*nested* PCR como a técnica de detecção qualitativa de menor custo e a técnica da PCR-ELISA quantitativa (COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR Test v2.0) como a técnica de detecção quantitativa de menor custo.

I. Com o objetivo de otimizar o diagnóstico molecular da infecção pelo HCV, considerando não somente o custo, mas também o desempenho dos testes, foi sugerido um algoritmo no qual a técnica RT-*nested*-PCR constitui o teste de primeira escolha na caracterização das amostras de soro a serem testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Relatório da produção hemoterápica do Estado de Minas Gerais de 2000 a 2002; 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesado em 5 de março, 2006.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº34, de 28 de setembro de 2004. Dispõe sobre o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C. Diário oficial da União 09 out 2007;Seção1.

Ahn J., Cohen S.M. Transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus through liver transplantation. **Liver Transpl** 2008;14:1603-1608.

Alberts B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 5ed. Nova York: GARLAND SCIENCE, 2008; 544-545.

Alter H.J. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. **Hepatology** 1992; 15:350–353.

Alter M.J. Prevention of spread of hepatitis C. **Hepatology** 2002; 36:93-98.

Appel N., Schaller T., Penin F., Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. **J Biol Chem** 2006; 281: 9833-9836.

Arnold L.J., Hammond P.W., Wiese W.A., Nelson N.C. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. **Clin Chem** 1989; 35:1588-1594.

Ballardini G., Manzin A., Giostra F., Francesconi R., Groff P., Grassi A., *et al.* Quantitative liver parameters of HCV infection: relation to HCV genotypes, viremia and response to interferon treatment. **J Hepatology**. 1997;26:779-786.

Barrera J.M., Francis B., Ercilla G., Nelles M., Achord D., Darner J., *et al.* Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. **Vox Sang** 1995;68:15-18.

Bartosch B., Cosset F.L. Cell entry of hepatitis C virus. **Virology** 2006; 348:1-12.

Bukh J., Miller R.H., Purcell R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin Liver Dis** 1995; 15:41-63.

Caliendo, A. M., Valsamakis A., Zhou Y., Yen-Lieberman B., Andersen J., Young S., *et al.* Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. **J Clin Microbiol** 2006; 44:1726-1732.

Campiotto S., Pinho J.R., Carrilho F.J., Silva L.C., Souto F.J., Spinelli V., *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2005; 38: 41-49.

Carneiro M. A.S., Teles S. A., Dias M. A., Ferreira R. C., Naghettine A. V., Silva S. A., *et al.* Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2005;100: 345-349.

Carneiro M.A.S., Teles S.A., Lampe E., Espírito-Santo M. P., Gouveia-Oliveira R., Reis N.R.S., *et al.* Molecular and Epidemiological Study on Nosocomial Transmission of HCV in Hemodialysis Patients in Brazil **J of Med Virol** 2007; 79:1325-1333.

Chevaliez S., Bouvier-Alias M., Brillet R., Pawlotsky J. M. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. **Hepatology** 2007; 46:22–31.

Choo Q-L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M., *et al.* Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis. **Science** 1989; 244: 359-369.

Choo Q.L., Richman K.H., Han J.H., Berger K., Lee C., Dong C., *et al.* Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991 Mar.15; 88:2451-2455.

Cikos S., Koppel J. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. **Analytical Biochemistry** 2009; 384:1–10.

Cocquerel L., Voisset C., Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. **J Gen Virol** 2006; 87:1075-1084.

Comanor, L., Anderson F., Ghany M., Perrillo R., E. Heathcote J., Sherlock C. *et al.* Transcription mediated amplification is more sensitive than conventional PCR-based assays for detecting residual serum RNA do HCV at end of treatment. **Am J Gastroenterol** 2001; 96:2968–2972.

De Almeida A.J., Campos-de-Magalhães M., Brandão-Mello C.E., de Oliveira R.V., Yoshida C.F., Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. **Hepatogastroenterology** 2007; 54:964-968.

De Almeida A.J., Campos-de-Magalhães M., Brandão-Mello C.E., de Oliveira R.V., do Espirito-Santo M.P., Yoshida C.F., *et al.* Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. **Hepatogastroenterology** 2009;56:429-436.

De Oliveira J.M., Rispeter K., Viazov S., Saback F.L., Roggendorf M., Yoshida C.F., *et al.* Differences in HCV antibody patterns in haemodialysis patients infected with the same virus isolate. **J Med Virol** 2001; 63:265-270.

Desombere I., Van Vlierberghe H., Couvent S., Clinckspoor F., Leroux-Roels G. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and

quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. **J Clin Microbiol** 2005;43:2590-2597.

Doglio A., Laffont C., Caroli-Bosc F.X., Rochet P., Lefebvre J. Second generation of the automated Cobas Amplicor HCV assay improves sensitivity of hepatitis C virus RNA detection and yields results that are more clinically relevant. **J Clin Microbiol** 1999; 37:1567–1569.

Diesel G., Wirth D., Stark K., Baumgarten R., Sucker U., Schreier E. Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region. **Arch Virol** 1994;139:379-88.

Erensoy S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. **J Clin Virol** 2001; 21:271-281.

European Association for the Study of the Liver. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. **J Hepatol** 1999; 30:956-961.

Farci P., Alter H.J., Wong D., Miller R.H., Shih J.W., Jett B., Purcell R.H. [A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis.](#) **N Engl J Med.** 1991; 325:98-104.

Flint, M., Quinn, E. R., Levy S. In search of hepatitis C virus receptor(s). **Clin Liver Dis** 2001; 5: 873-893

Fonseca J.C.F. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. **GED Gastroenterol Endosc Dig** 1999;18(1):3-8.

Forns X., Costa J. HCV virological assessment. **J Hepatol** 2006;44(1):35-39.

Friebe P., Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. **J Virol** 2002; 76:5326-5338.

Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçalves F.L., *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med** 2002; 347:975-982.

Garson J.A., Ring C., Tuke P. and Tedder R.S. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet** 1990; 336:878-879.

Germer J.J., Zein N.N. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. **Mayo Clin Proc** 2001; 76:911-920.

Gibson U.E., Heid C.A. and Williams P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res** 1996; 6:995-1001.

Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. **J Clin Pharmacol** 2004; 44:20-29.

Gonçalves Júnior F.L., Boccato R.S., Pedro R.J., Papaiordanou P.M., Souza C.A., Gonçalves N.S., *et al.* Prevalence of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in blood donor candidates at the Campinas hemocenter. **Rev Inst Med Trop de São Paulo** 1993; 35:45-51.

Gretch D.R, Lee W., Corey L. Use of aminotransferase, hepatitis C antibody, and hepatitis C polymerase chain reaction RNA assays to establish the diagnosis of hepatitis C virus infection in a diagnostic virology laboratory. **J Clin Microbiol** 1992; 30:2145-2149.

Gretch D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatol** 1997; 26:43-47.

Gretton S.N., Taylor A.I., McLauchlan J. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. **J Gen Virol** 2005; 86: 1415-1421.

Hagan H. Public health and changes in illicit drug prices. **Am J Public Health** 2001; 91:1350.

Han J.H., Shyamala V., Richman K.H., Brauer M.J., Irvine B., Urdea M.S., *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 U S A** 1991; 88: 1711-1715.

Harris H.J., Farquhar M.J., Mee C.J., Davis C., Reynolds G.M., Jennings A., *et al.* CD81 and claudin 1 co-receptor association: a role in hepatitis C virus entry. **J Virol** 2008; 82:5007-5020.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res** 1996; 6:986-994.

Helle F., Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells. **Cell Mol Life Sci** 2008;65:100-112.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology** 1992 Apr; 10:413-417.

Ho M. Laboratory evaluations of infections in immunosuppressed transplant patients. **Clin Lab Med** 1991; 11:715-731.

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci, U S A**; 1991; 88:7276-7280.

Hsieh M.Y., Lee L.P., Hou N.J., Yang J.F., Huang J.F., Dai C.Y., *et al.* Qualitative application of COBAS AMPLICOR HCV test version 2.0 assays in patients with chronic hepatitis C virus infection and comparison of clinical performance with version 1.0. **Kaohsiung J Med Sci** 2007; 23:332-338.

Hugle T., Fehrmann F., Bieck E., Kohara M., Krausslich H.G., Rice C.M., *et al.* The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. **Virology** 2001; 284: 70-81.

Kacian, D. L., Fultz, T.J. Nucleic acid sequence amplification methods. 1995. U.S.Patent 5,399,491.European Patent EP 0 408 295.

Kenneth E., Sherman, Susan D., Rouster., Horn P.S. Comparison of Methodologies for quantification of Hepatitis C virus (HCV) RNA in patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis** 2002; 35: 482-487.

Kobayashi Y., Watanabe S., Konishi M., Yokoi M., Kakahashi R., Kaito M., *et al.* Quantitation and typing of serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon beta. **Hepatology** 1993; 18:1319-1325.

Konnick E.Q., Williams S.M., Ashwood E.R., Hillyard D.R. Evaluation of the COBAS Hepatitis C Virus (HCV) TaqMan analyte-specific reagent assay and comparison to the COBAS Amplicor HCV Monitor V2.0 and Versant HCV bDNA 3.0 assays. **J Clin Microbiol** 2005; 43:2133-2140.

Lambert N. Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis. **Dev Biol (Basel)** 2007;127:113-121.

Lampe E., de Almeida A.J., Oliveira R.V., Mello C.E.B., Magalhães M.C., Yoshida C.F. Phylogenetic characterization of genotype 4 hepatitis c virus isolate from Brazil. **Virus Rev Res** 2002:108.

Lauer G. M., Walker B. D. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med** 2001; 345:41-52.

Lee S.H. The 3'-5' exonuclease of human DNA polymerase delta (pol delta) is regulated by pol delta accessory factors and deoxyribonucleoside triphosphates. **Nucleic Acids Res** 1993; 21:1935-1939.

Lee S. C., Antony A., Lee N., Leibow J., Yang J. Q., Soviero S., *et al.* Improved version 2.0 qualitative and quantitative Amplicor reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity and performance characteristics. **J Clin Microbiol** 2000; 38:4171-4179.

Leite N.C., Nogueira C.M., Coelho H.S., Perez R., Martins S.J., Soares J.A., *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis C (anti HCV) in blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. Its relation to ALT and anti HBC. **Arq Gastroenterol** 1992; 29:5-11.

Li X., Jeffers L.J., Shao L., Reddy K.R., de Medina M., Scheffel J., *et al.* Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. **J Viral Hepat** 1995; 2:227-234.

Lin C., Lindenbach B.D., Pragai B.M., McCourt D.W., Rice C.M. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. **J Virol** 1994; 68: 5063-5073.

Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wo" I.k.B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science** 2005; 309:623-626.

Lindenbach B.D., Rice C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. **Fields Virology** 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 991-1042.

Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl** 1995;4:357-362.

Lopes C.L., Teles S.A., Espírito-Santo M.P., Lampe E., Rodrigues F.P., Motta-Castro A.R., *et al.* Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Rev Saude Publica**. 2009;43:43-50.

Lundin M., Monne M., Widell A., Von Heijne G., Persson M.A. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. **J Virol** 2003; 77: 5428-5438.

Lyra A.C., Fan X., Di Bisceglie A.M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Braz J Med Biol Res** 2004; 37: 691-695.

Major M.E., Rehermann B., Feinstone S.M. Hepatitis C viruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M.V., Griffin D.E. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:1127-1161.

McHutchison J.G., Gordon S.C., Schiff E.R., *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med** 1998; 339: 1485-1492.

McHutchison, J. G., L. M. Blatt, R. Ponnudurai, K. Goodarzi, J. Russell, A. Conrad. Ultracentrifugation and concentration of a large volume of serum for RNA do HCV during treatment may predict sustained and relapse response in chronic HCV infection. **J Med Virol** 1999; 57:351–355.

Melnick J.M., Howard C.R. Classification and taxonomy of hepatitis viruses. In: **Viral Hepatitis and Liver Disease**, ed. K.Nishioka, H.Suzuki, S.Mishiro, Oda, Springer-Verlag, Tokyo.1994; 47-49.

Melo J.C., Neto M.C. Avaliação de tecnologias da Saúde (ATS) e suas implicações na prática clínica **Einstein: Educ Contin Saúde**. 2008; 6: 132-134.

Ministério da Saúde. Brasil. Portaria n° 1.376 de 19 de Novembro de 1993. Publicado no Diário Oficial da União em 02/12/1993. Disponível em: [http:// e-legis.anvisa.gov.br](http://e-legis.anvisa.gov.br) - acesso em 27 dez 2009.

Ministério da Saúde. Brasil. Portaria n.º 1407/GM em 01 de agosto de 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1407_02.htm - acesso em 23 fev de 2010.

Ministério da Saúde. Brasil. Doenças transmissíveis. Hepatites virais. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21920 – acesso em 22 fev de 2008.

Mizushima H., Hijikata M., Asabe S., Hirota M., Kimura K., Shimotohno K. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. **J Virol** 1994; 68: 6215-6222.

Mondelli M.U., Cerino A., Bono F., Cividini A., Maccabruni A., Aricò M. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) core serotypes in chronic HCV infection. **J Clin Microbiol** 1994;32:2523-2527.

Morishima C., Morgan T.R., Everhart J.E., Wright E.C., Shiffman M.L, Everson G.T., *et al.* HCV RNA detection by TMA during the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (HALT-C) trial. **Hepatology** 2006;44:360-367.

Murphy D., Chamberland J., Dandavino R., Sablon E. A new genotype of hepatitis C virus originating from Central Africa. **Hepatology** 2007; 46: 623.

Nakao T., Enomoto N., Takada N., Takada A., Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. **J Gen Virol**. 1991;72 :2105-2112.

National Institute of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002 June; 10-12. **Hepatology** 2002; 36:3-20.

Nelson N.C., BenCheikh A., Matsuda E., Becker M. Simultaneous detections of multiple nucleic acid target in a homogenous format. **Biochem** 1996; 35: 8429-38.

Okamoto H., Sugiyama Y., Okada S., Kurai K., Akahane Y., Sugai Y. *et al* . Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. **J Gen Virol** 1992;73:673-679.

Oliveira J. M. M. P., Caiaffa W. Guimarães T., M. P., Caetano E. V. C., Carvalho A. R., Leite A. F., *et al*. The seroprevalence of HCV in Patients Submitted to Hemodialysis and Health Professionals in the State of Minas Gerais, Southwest of Brazil **Nefrologia** 2008; 28:178-185.

Paltanin L.F., Reiche E.M. Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. **Rev de Saúde Pública** 2002; 36:393-399.

Pawlotsky J. M. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays? **Hepatology** 1997; 26:1-4.

Pawlotsky J.M., Bouvier-Alias M., Hezode C., Darthuy F., Remire J., Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. **Hepatology** 2000;32:654-659.

Pawlotsky J.M., Gish R.G., **Antivir Ther** 2006;11:397- 408.

Penin F., Brass V., Appel N., Ramboarina S., Montserret R., Ficheux D., *et al*. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem** 2004a;279:40835 - 40843.

Penin F., Dubuisson J., Rey F.A., Moradpour D., Pawlotsky J.M. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology** 2004b; 39: 5 -19.

Perz J.F., Farrington L.A., Pecoraro C., Hutin Y.J.F., Armstrong G.L. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Boston, MA, USA; Sept 30–Oct 3, 2004.

Pisani, G., Cristiano K., Wirz M., Bisso G. M., Gentili G. Overestimation of the hepatitis C virus RNA content of reference preparations by the AMPLICOR HCV Monitor test, version 2.0. **J Clin Microbiol** 2002;40:4765-4767.

Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease. 1998 Oct 16; 47: RR-19.

Rice, C. M., Lindenbach, B.D. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature** 2005; 436:933-938.

Rosen H.R., Gretch D.R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Mol Med Today** 1999; 5:393-399.

Sakai A., Claire M.S., Faulk K., Govindarajan S., Emerson S.U., Purcell R.H.. *et al.* The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:11646-11651.

Saldanha J., Heath A., Aberham C., Albrecht J., Gentili G., Gessner M., *et al.* World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. **Vox Sang** 2005; 88:202-204.

Sandres K., Dubois M., Pasquier C., Puel J., Izopet J. Determination of HCV genotype using two antibody assays and genome typing. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2001;20:666-669.

Sarrazin C., Teuber G., Kokka R., *et al.* Detection of residual Hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. **Hepatol** 2000; 32:818-823.

Sarrazin C., Hendricks D.A., Sedarati F., Zeuzem S. Assessment, by transcription-mediated amplification, of virologic response in patients with chronic hepatitis C virus treated with peginterferon alpha-2a. **J Clin Microbiol** 2001; 39:2850-2855.

Sarrazin, C., Gartner B. C., Sizmann D., Babiak R., Mihm U., Hofmann W. P., *et al.* Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. **J Clin Microbiol** 2006; 44:729 -737.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. Dispõe sobre Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C. <URL:<http://www.sbmt.org.br/arquivos/HCV.pdf> >. Acessado em 27/12/2009.

Seeger C. Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. **Trends Microbiol** 2005; 13: 528-534.

Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. **Hepatol** 1995 Feb;21:570-583.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus — 15 years on. **J Gen Virol** 2004; 85: 3173-3188.

Smith D.B., Davidson F., Yap P.L., Brown H., Kolberg J., Detmer J., Urdea M., *et al.* International HCV Collaborative Study Group. Levels of hepatitis C virus in blood donors infected with different viral genotypes. **J Infect Dis** 1996; 173:727-730.

Smith D.B., Pathirana S., Davidson F., Lawlor E., Power J., Yap P.L., *et al.* The origin of hepatitis C virus genotypes. **J Gen Virol** 1997; 78:321–328.

Strauss E. Hepatite C. **Rev Soc Bras Med Trop** 2001; Jan-Feb;34:69-82.

Sismour A.M., Steven A.B. Synthetic biology. **Expert Opin. Biol. Ther** 2005; 5:1409-1414.

Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Van Heuverswyn H. *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. **J Gen Virol** 1993 Jun;74:1093-1102.

Tellinghusein T.L., Evans M.J., Hahn T., *et al.* Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. **J Virol** 2007; 81:8853-8867.

Trabaud M.A., Bailly F., Si-Ahmed S.N., Chevallier P., Sepetjan M., Colucci G., *et al.* Comparison of HCV RNA assays for the detection and quantification of hepatitis C virus RNA levels in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon. **J Med Virol** 1997;52:105-112.

Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M., Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japan. **J Virol** 1992; 66: 1476-1483.

Tuke P.W., Grant P.R., Waite J., Kitchen A.D., Eglin R.P., Tedder R.S. Hepatitis C virus window-phase infections: closing the window on hepatitis C virus. **Transfusion**. 2008;48:594-600.

Uyttendaele S., Clayes H., Mertens W., Verhaert H., Vermeylen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. **Vox Sang** 1994; 66:122-129.

Valente V.B., Covas D.T., Passos A.D. Hepatitis B and C serologic markers in blood donors of the Ribeirao Preto Blood Center. **Rev Soc Bras Med Trop** 2005; 38:488-492.

Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med** 2005; 11:791-796.

Wang C., Sarnow P., Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. **J Virol** 1993; 67:3338-3344.

Watzinger F., Ebner K., Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Mol Aspects of Med** 2006; 27:254-298.

Widell A., Shev S., Månsson S., Zhang Y.Y., Foberg U., Norkrans G. *et al.* Genotyping of hepatitis C virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological applications. **J Med Virol** 1994;44:272-279.

Williams M. A return to the fundamentals of drug discovery? **Curr Opin Investig Drugs** 2004; 5:29-33.

Wolfe L., Tamatsukuri S., Sayada C., Ryff J. C. Detection of HCV RNA in serum using a single-tube enzyme PCR in combination with a colorimetric microwell assay. *In* Groupe Franc,ais d'Etude Mole'culaire des He'patites (GEMHEP) (ed.), Hepatitis V virus: new diagnostic tools. **John Libbey Eurotext** 1994; 83-94.

Yamakawa Y., Sata M., Suzuki H., Tanaka K., Tanaka E., Noguchi S., *et al.* Monitoring of serum levels of RNA do HCV in early phase of IFN therapy as a predictive marker of subsequent response. **Hepatogastroenterology** 1998; 45:133-136.

Young K. K. Y., Resnick R. M., Myers T. W. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. **J Clin Microbiol** 1993; 31:882-886.

Zaaijer H.L., Cuypers H.T., Reesink H.W., Winkel .IN., Gerken G., Lelie P.N. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet** 1993;341:722-724.

Zeuzem S., Ruster B., Roth W.K. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay (Amplicor HCV) for detection of hepatitis C virus. **Z Gastroenterol** 1994; 32:342-7.

Zignego A.L., Macchia D., Monti M., Thiers V., Mazzetti M., Foschi M., *et al.* Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. **J Hepatol** 1992;15: 382-386.