

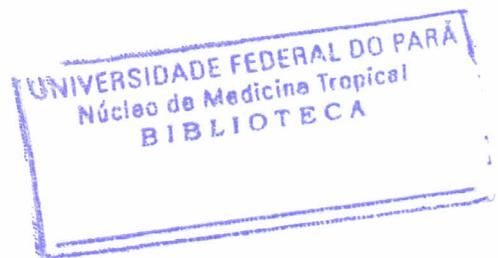
ADRIANA DO SOCORRO COELHO PIMENTA

O USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL EM DOADORES
DE SANGUE SOROPOSITIVOS PARA O ANTI-HCV

BELEM
2003

ADRIANA DO SOCORRO COELHO PIMENTA

**O USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM TEMPO REAL EM DOADORES DE SANGUE
SOROPOSITIVOS PARA O ANTI-HCV**



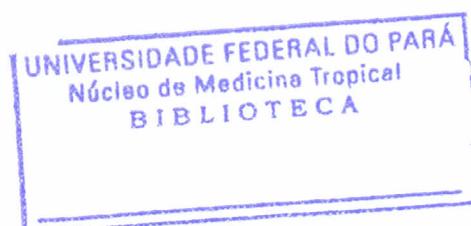
**BELÉM
2003**

616.0194
P644M
DIS

ADRIANA DO SOCORRO COELHO PIMENTA

**O USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM TEMPO REAL EM DOADORES DE SANGUE
SOROPOSITIVOS PARA O ANTI-HCV**

Dissertação apresentada à
coordenação de pós-graduação do
Núcleo de Medicina Tropical da
Universidade Federal do Pará como
requisito para obtenção do grau de
mestre em Doenças Tropicais.



**BELÉM
2003**

616.0194
P644m
DIS

ADRIANA DO SOCORRO COELHO PIMENTA

**O USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM TEMPO REAL EM DOADORES DE SANGUE
SOROPOSITIVOS PARA O ANTI-HCV.**

Dissertação apresentada à coordenação de pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Claudio Sérgio Amorim

Prof^a. Dr^a. Marucia Irene Amorim

Prof. Dr. Lacy Cardoso Brito Junior

Suplente: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Harada

**BELÉM
2003**

Aos meus filhos, razão maior da minha vida.
Ao meu amado Francisco
Aos meus queridos e eternos pais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação **HEMOPA** pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. **José Alexandre Rodrigues de Lemos** pela orientação, incentivo e principalmente pela amizade e paciência.

À Dra. **Luciana Maradei**, pelo crédito e confiança no projeto.

Aos **meus amigos** incansáveis do **Laboratório de Biologia Molecular** da Fundação Hemopa, sem o qual este projeto não seria possível.

À Dra. **Maria do Socorro Cardoso**, pelo incentivo e motivação.

Aos **colegas** do **Laboratório de Sorologia** da Fundação Hemopa, pelo apoio na separação das amostras.

Ao meu esposo **Francisco Pimenta**, pela paciência, apoio aos cuidados com nosso filho e companheirismo.

Ao meu filho **Francisco Pimenta Neto**, por entender minhas inúmeras horas de ausência.

À **minha família**, principalmente aos **meus pais**, que nunca deixaram de acreditar em mim.

À todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto.

RESUMO

O HCV é um vírus esférico, que apresenta um genoma de RNA com polaridade positiva. Atualmente está classificado na família *Flaviviridae* num gênero separado que é o *Hepacivirus*, apresenta cerca de 9,4 Kb constituído por uma única e longa fase de leitura aberta (ORF) que compreende quase todo o genoma. Apresenta duas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' denominadas 5' UTR e 3' UTR. A poliproteína precursora é clivada em dez proteínas, resultando em proteínas virais estruturais e proteínas não-estruturais. É um vírus de transmissão preferencialmente parenteral, com distribuição universal, cujo diagnóstico é feito na grande maioria de maneira acidental, sendo atualmente utilizado os testes sorológico e molecular. Este trabalho tem como objetivo comparar o teste sorológico de imunoenensaio enzimático (ELISA) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) na ocasião da seleção de pré-doadores de sangue. Foram feitos testes de detecção do vírus C por PCR em 290 amostras com resultado positivo ou indeterminado para o teste ELISA. A análise dos resultados revelou que as amostras com testes ELISA positivo/PCR positivo e ELISA positivo/PCR negativo são duas amostras diferentes e independentes ($p=0,0006$). Esta diferença pode ser supostamente devido a resposta imune diferenciada nas amostras que apresentaram resultado no teste PCR positivas. Esperava-se que houvesse correlação entre os resultados do DO/Cutoff (ELISA) e carga viral (PCR) como o que ocorre em outros vírus como o HIV, no entanto os resultados apresentaram-se totalmente dispersos ($R^2=0,025$), confirmando a não correlação entre os dois testes: ELISA e PCR para o vírus C.

ABSTRACT

The HCV is a spherical virus that presents a RNA genome with a positive polarity. Actually classified into the *flaviridae* family, and *Hepacivirus* genre, presenting a 9.4 Kb constituted by a unique and long open reading frame (ORF) which comprises almost all the genome. It presents two untranslated regions (UTR) at the 5' and 3' extremities. The major polyprotein is cleaved in ten minor proteins, resulting in structural and non-structural proteins. This virus shows preferentially the blood transmission and is distributed around the world. The diagnosis has been done accidentally in the most of cases while serological and molecular screening is done. This work has as the main objective, to compare the immunoenzymatic assay (ELISA) with polymerase chain reaction test (PCR) in the occasion of pre-selection of blood donors. Detection screening by PCR was done in 290 samples that were positive or indeterminate for ELISA assay. The result analysis showed that the samples positive-ELISA/positive-PCR and positive-ELISA/negative-PCR are two different and independent samples ($p=0,0006$). This difference is supposed to be due a differential immunologic response of the samples that presented positive PCR result. We attended a correlation between DO/cut-off (ELISA) and viral load in PCR as we see in other virus like HIV, however the results appears totally disperse ($R^2=0,025$), confirming the non-correlation between the two testes, ELISA and PCR for detection of virus C.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Características dos cinco principais vírus causadores de hepatites.	2
Figura 1: Estrutura morfológica do vírus da hepatite C.	6
Figura 2: Genoma do vírus da hepatite C.	7
Figura 3: Árvore filogenética do HCV.	11
Figura 4: Sondas duplamente marcadas com o corante repórter na extremidade 5' e o corante quencher na extremidade 3'.	28
Figura 5: Momento da degradação da sonda pela nuclease, ocorrendo separação dos corantes e resultando em elevada emissão fluorescente do corante repórter.	29
Figura 6: Gráfico demonstrando o CT (cycle threshold) calculado pela determinação do ponto no qual a fluorescência excede o limite threshold.	29
Tabela 2: Seqüência dos “primers” e sonda localizados na região 5' UTR do HCV.	37
Tabela 3: Distribuição de valores absolutos obtidos por teste ELISA e PCR no sexos masculino e feminino.	39
Figura 7: Distribuição das freqüências de resultado do teste ELISA retestados em segunda amostra na ocasião do retorno do doador inapto.	40
Tabela 4: Estatística descritiva de DO/Cut off das amostras com teste ELISA positivo	40
Figura 8: Dispersão de valores DO/Cutoff de testes ELISA positivos em duas amostras: PCR positivos e PCR negativos.	41
Tabela 5: Distribuição dos dados absolutos da combinação de testes ELISA e PCR nos sexos masculino e feminino.	41
Figura 9: Distribuição das Freqüências das combinações de resultado de teste ELISA e PCR na amostra analisada.	42
Figura 10: Amostras com teste ELISA positivo submetidas ao teste de PCR.	42
Figura 11: Distribuição da faixa etária da amostra analisada.	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
1.2	HISTÓRICO	5
1.3	HEPATITE C	6
1.3.1	Estrutura e Genoma Viral	6
1.3.2	Proteínas Virais	8
1.3.2.1	Proteínas Estruturais	8
1.3.2.2	Proteínas Não-Estruturais	9
1.3.2.3	Genótipos Virais	11
1.3.3	Vias de Transmissão	12
1.3.3.1	Formas Específicas de Transmissão	13
1.3.3.2	Transfusão de Sangue e Derivados	13
1.3.3.3	Uso de Drogas Injetáveis	13
1.3.3.4	Hemodiálise	14
1.3.3.5	Exposição Ocupacional	14
1.3.3.6	Transplantes de Órgãos e Tecidos	14
1.3.3.7	Transmissão no Período Perinatal	15
1.3.3.8	Transmissão Pela Via Sexual	16
1.3.3.9	Exposição Percutânea e Outras Situações	17
1.3.4	Epidemiologia	17
1.3.4.1	Soroprevalência em Doadores de Sangue	18
1.3.4.2	Soroprevalência em Hemodializados	19
1.3.4.3	Soroprevalência em Hemofílicos	20
1.3.4.4	Distribuição e Prevalência dos Genótipos	20
1.3.5	Imunopatogênese	21
1.3.5.1	Mecanismo de Lesão da Célula Hepática	22
1.3.6	Diagnóstico	24
1.3.6.1	Sorológico	24
1.3.6.2	Molecular	26
1.3.6.3	RT-PCR em Tempo Real	27
1.3.7	Aspectos Clínicos	30
1.3.8	Tratamento	31
2.	OBJETIVOS	34
2.1	GERAIS	34
2.2	ESPECÍFICOS	34
3.	METODOLOGIA	35
3.1	AMOSTRA	35
3.2	EXTRAÇÃO DO RNA	35
3.3	“PRIMERS” E SONDA	37
3.4	RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	37
4.	RESULTADOS	39
5.	DISCUSSÃO	44
6.	CONCLUSÃO	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS		

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Entre as causas de maior dano hepático, encontram-se a cirrose e as hepatites: A cirrose hepática, caracteriza-se como doença crônica com grande destruição das células do fígado, sendo este dano irreversível, caso não haja tratamento em tempo hábil, onde o processo leva à falência total do órgão e conseqüentemente à morte do paciente . As hepatites são infecções que afetam primariamente o fígado (Jawetz *et al.*, 1998), na qual os fenômenos inflamatórios e necróticos são os sintomas mais freqüentes e característicos (Bensabath *et al.*, 1997). São doenças de transmissibilidades inter-humana, evolução aguda ou crônica, que pela alta morbidade universal, constituem importante problema de saúde pública (Focaccia, 1997). Compreendem um conjunto de infecções causadas por vírus hepatotrópicos que são rotulados por letras do Alfabeto (Zuckerman, 1996), apesar de apresentarem sintomas similares, as hepatites virais são doenças individualizadas, cujos aspectos epidemiológicos, evolutivo e agente etiológicos são distintos (Bensabath *et al.*, 1997). Entre os vírus responsáveis pelo desenvolvimento de hepatites conhecidas, cinco, estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 1: Características dos cinco principais vírus causadores de hepatites.
 Fonte: Jawetz *et al.*, 1998

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV	HGV	TTV
Família	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Viróide	Caliciviridae	Flaviviridae	Parvoviridae?
Tamanho do vírus	27nm	42nm	30-60nm	35nm	27-34nm	-	30-50nm
Forma do vírus	icosaédrico	esférico	esférico	esférico	icosaédrico	Desconhecida	Desconhecida
Envoltório	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Genoma	RNA (fita simples)	DNA (fita dupla)	RNA (fita simples)	RNA (fita simples)	RNA (fita simples)	RNA (fita simples)	DNA (fita simples)
Tamanho do genoma	7,8 kb	3,2 kb	9,4 kb	1,7 kb	7,5 kb	9.4 Kb	3.7 Kb
Transmissão	Orofecal	Parenteral	Parenteral	Parenteral	Orofecal	Parenteral	Parenteral
Prevalência	Alta	Alta	Moderada	Baixa, regional	Regional		
Doença fulminante	Rara	Rara	Rara	Freqüente	Freqüente na gravidez	Desconhecida	Desconhecida
Doença crônica	Nunca	Freqüentement e	Freqüentement e	Freqüentement e	Nunca	Desconhecida	Desconhecida
Oncogênico	Não	Sim	Sim	?	Não	?	?

Alguns vírus recentemente descobertos, foram adicionados à lista de hepatites virais acima citadas durante os últimos dez anos, hoje sabemos que estes vírus também apresentam características bem individualizadas, como os vírus da hepatite G e o vírus transmitido pela transfusão (TTV) (Okamoto *et al*, 1998). Juntamente com esses, outros vírus podem causar hepatites, embora menos freqüente, como: o vírus de Epstein-Barr, do herpes simples, o citomegalovírus, o da febre amarela, o da rubéola e vírus exóticos como: o de Lassa , o Ebola, o Marburg, sendo que nenhum desses ocorrendo no Brasil (Bensabath *et al*, 1997).

1.2 HISTÓRICO

Historicamente, as hepatites virais foram relatadas já nos escritos de Hipócrates, que descrevia doenças com quadros de icterícia profunda, supostamente devido ao excessivo clima frio da época e a desordenada ingestão de bebidas alcoólicas (Focaccia, 1997).

No século XIX, em consequência de batalhas militares, surgiram casos graves de icterícia epidêmica, que posteriormente passou a ser denominada de icterícia catarral e somente na década de 1940, essa patologia foi considerada como uma inflamação do parênquima hepático, o que foi confirmado com o surgimento da biópsia hepática (Bensabath *et al*, 1997).

Alguns casos de icterícia em receptores de sangue e seus derivados levaram pesquisadores a aceitarem uma possível etiologia viral nesta doença, mesmo sem o isolamento dos agentes causadores, porém ainda na década de quarenta, estudos com voluntários, classificaram as hepatites em dois tipos:

hepatites soro-homólogas (transmitidas por sangue e seus derivados) e hepatites infecciosas (transmitidas por alimentos ou líquidos contaminados por fezes de convalescentes), somente após esse período foi demonstrada a natureza virótica do agente etiológico da hepatite A (HAV), conhecida nessa época como hepatite infecciosa (Gonçales Jr., 1998).

Em 1956, ocorreu a primeira descrição da hepatite pós-transfusional não-A não-B em um viciado em drogas endovenosas (Gonçales Jr., 1998).

Em 1965, através de pesquisas com alíquotas de soros provenientes de diferentes regiões, foi encontrado de maneira casual, um antígeno até então desconhecido, em amostras de aborígenes australianos, o qual recebeu o nome de Antígeno Austrália (Blumberg *et al.*, 1965), posteriormente associado especificamente com a hepatite B (Blumberg *et al.*, 1967).

Nas décadas de setenta e oitenta procurou-se exaustivamente, encontrar e caracterizar o vírus causador das hepatites não-A não-B nos receptores de transfusão de sangue e seus derivados, conseguindo-se caracterizar os vírus da hepatite Delta (HDV) e o da hepatite E (HEV) (Khuroo, 1980), que na verdade não eram os responsáveis pela grande freqüência de casos de hepatites não-A não-B pós-transfusionais então observados. Durante várias décadas, esta questão foi motivo de grande interesse entre pesquisadores e estudiosos da história natural das hepatites pós-transfusionais, porém nos primeiros anos da década de oitenta, estudos experimentais com chimpanzés, desenvolvidos no centro de controle de doenças de Atlanta (EUA), revelaram a presença de um agente infectivo com 60nm de diâmetro, classificado inicialmente como pertencente à família *Togaviridae* e transmissível mediante sangue e seus derivados (Bradley *et al.*,

1985). Em 1989, mediante sucessivos estudos de biologia molecular, finalmente foi identificado o genoma do agente viral responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não-A não-B, denominado de vírus da hepatite C (HCV) (Choo *et al.*, 1989).

1.3 HEPATITE C

Após a clonagem do vírus da hepatite C em 1989, uma seqüência de descobertas como: o desenvolvimento de testes imunológicos específicos; a análise de sua seqüência nucleotídica e o conhecimento de sua elevada taxa de mutação, permitiram-nos conhecer em um breve espaço de tempo informações importantíssimas sobre os principais aspectos biológicos do HCV, o perfil epidemiológico da infecção e a história natural da doença (Choo *et al.*, 1989).

Atualmente a hepatite C está sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um importante problema de saúde pública (Brasil. Ministério da Saúde, 2003). No mundo, estima-se que 500 milhões de pessoas estejam contaminadas com o vírus da doença (Paltanin & Reiche, 2002). No Brasil, esse número atinge a casa dos 3,3 milhões, seis vezes mais que a quantidade de pessoas portadoras do vírus da AIDS (Brasil. Ministério da Saúde, 2003).

A hepatite C, é seguramente, a responsável pela maioria dos casos de hepatites pós-transfusionais. Cerca de 90% dessas hepatites, eram consideradas como do tipo não-A não-B, hoje sabemos que o HCV é responsável pela maioria, ou seja, 90% (Hamerschlak & Pasternak, 1991). Entre os indivíduos que adquiriram a infecção pelo HCV, cerca de 85% tornam-se infectados

cronicamente, destes 70% desenvolvem hepatite crônica. Entre os casos de hepatites crônicas, 20% a 25% evoluem para cirrose hepática quando causadas pelo HCV, e dentre os cirróticos 1% a 5% desenvolvem câncer primário de fígado. A mortalidade da hepatite crônica pelo HCV é estimada hoje em 1% a 5% (Focaccia *et al*, 2003).

1.3.1 Estrutura e Genoma Viral

O HCV é um agente esférico, que apresenta um envoltório lipídico com um centro (core) no qual está o genoma do tipo RNA (Bensabath *et al.*, 1997) (Figura 1). A classificação precisa do HCV ainda não é definitiva, mas está atualmente colocado na família Flaviviridae, como um gênero separado dos Flavivirus e Pestivirus, pois, apesar de apresentar uma estrutura genômica geral semelhante a estes, no nível de seqüência, o HCV não se aproxima muito de nenhum deles. Para este novo gênero, foi proposto recentemente o nome de Hepacivirus (Covas, 2001).

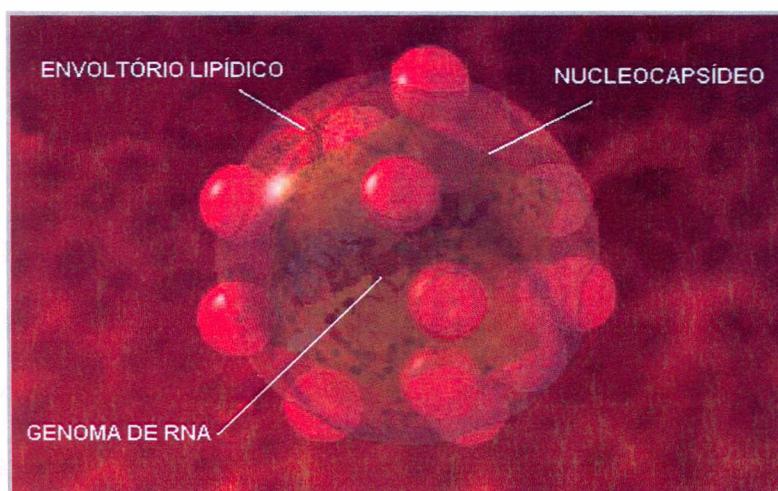


Figura 1: Estrutura morfológica do vírus da hepatite C.
Fonte: www.tecan.de/Newsletter/NL_0101/special/hcv.jpg

Como citado, o HCV apresenta genoma de RNA fita simples de polaridade positiva e 9,4 Kb. Nesta seqüência encontra-se uma única e longa fase de leitura aberta (“open reading frame”) que compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína de pouco mais de 3.000 aminoácidos (Choo *et al*, 1989)(Figura 2).

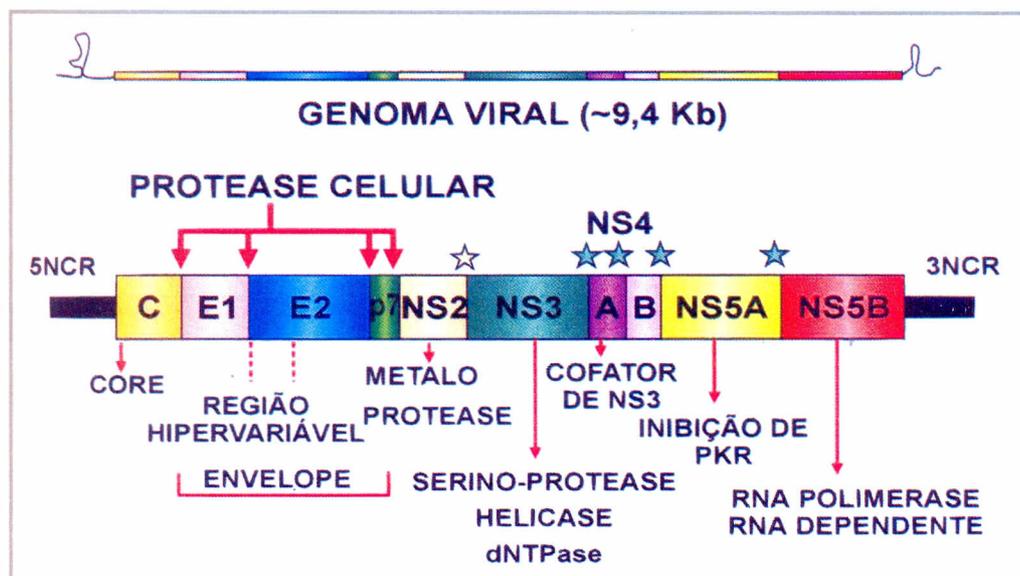


Figura 2: Genoma do vírus da hepatite C.
Fonte: Covas, 2001.

Uma característica importante do HCV é a presença de regiões não traduzidas (UTR – “Untranslated region”) ou não codificante de proteínas (NCR – “Non-coding region”) nas extremidades 5’ e 3’ do genoma viral (Umlauf *et al*, 1996). A região 5’ UTR mostra-se como a mais conservada no genoma, quando comparada as diversas seqüências de nucleotídeos de diferentes cepas de HCV, com uma identidade total da seqüência de 85%, refletindo sua importância funcional na tradução e replicação viral. Seu comprimento é de cerca de 340 nucleotídeos, sendo consideravelmente mais curta que a dos picornavírus, porém

mais longa que a dos flavivírus. A seqüência da região 3' UTR é formada por uma região tipo específica (logo após o códon de terminação), uma seqüência de poli-U-C de comprimento variável, e uma região altamente conservada, denominada cauda 3'X, que forma uma estrutura secundária com papel crítico no início da replicação viral, quando interage com proteínas celulares e virais. Variações de seqüência nesta região podem também estar envolvidas com diferenças na patogenicidade e na sensibilidade ao interferon do HCV (Choo & Pinho, 2003).

1.3.2 Proteínas Virais

A poliproteína precursora do genoma do HCV é "clivada" em 10 proteínas através da ação de proteases virais e celulares. O produto desta "clivagem" é dividido em proteínas virais estruturais, originárias do terço amino, e proteínas virais replicavas ou não-estruturais, do restante da poliproteínas (Choo & Pinho, 2003).

1.3.2.1 Proteínas Estruturais

Core (C) – A região 5' do genoma codifica a proteína do nucleocapsídeo que tem cerca de 19KD (Covas, 2001). Essa proteína é o primeiro domínio expresso durante a síntese do HCV, é a mais conservada de todas as poliproteínas entre as diversas cepas de HCV (Choo & Pinho, 2003).

Envelope (E1 e E2) – Na seqüência encontramos as proteínas do envelope viral, cujas principais são as glicoproteínas E1(gp35), com 33KD e E2(gp70) com 61KD. E2 pode ser encontrada numa forma maior, incluindo em sua extremidade

carboxila, uma proteína menor conhecida como p7, cuja função é desconhecida (Miyamura & Matsuura, 1993).

Em termos antigênicos, como proteínas de envelope, E1 e E2 têm sido bastante estudadas quanto à sua variabilidade e são os principais componentes das vacinas em desenvolvimento. E2 contém em extremidade amino uma região de 34 aminoácidos que apresenta maior variabilidade dentro do HCV, conhecida como região hipervariável 1 (HVR1) (Weiner *et al.*, 1991) esta região parece desempenhar papel fundamental na determinação do curso evolutivo da hepatite C. Outras duas funções foram também associadas à proteína E2: esta proteína contém um sítio de ligação para CD81, que é uma proteína de membrana encontrada em linfócitos e hepatócitos, e parece participar do processo de penetração do HCV nestas células (Pileri *et al.*, 1998). Além dessa função, outra região da proteína E2 possui a capacidade de interagir com a PKR, que é uma das proteínas responsáveis pela mediação dos efeitos antivirais do HCV (Choo & Pinho, 2003).

1.3.2.2 Proteínas Não-Estruturais

NS2- É uma proteína de membrana hidrofóbica de 23KD que é liberada pela proteína precursora por duas clivagens proteolíticas. Sua única função é a de mediar sua própria clivagem, que na junção com o polipeptídeo E2/p7 ocorre mediada por uma peptidase sinalizada pelo hospedeiro, enquanto que na junção NS2/NS3 é mediada por uma proteinase codificada pelo vírus, composta pela NS2 e pelo domínio da proteinase serina de NS3 (De Francesco, 1999). Esta proteína

parece ser uma metaloprotease, pois é estimulada por zinco e inibida por EDTA (Santolini *et al*, 1994).

NS3- Esta proteína tem sido a mais estudada do genoma viral. Tem peso molecular de 70KD e possui diversas funções biológicas: protease, helicase e trinucleotidase (NTPase). Estudos demonstraram ser uma serino-protease, responsável pela proteólise de toda região a jusante do genoma viral (Santorini *et al*, 1994). Exceto a clivagem de NS3 e NS4, que só ocorre dentro de uma mesma molécula de RNA, as outras clivagens mediadas por NS3 podem ocorrer tanto em cis como em trans. Para que a clivagem em trans seja eficiente, é necessária a presença de NS4A, como co-fator, especialmente no sítio NS4B/NS5A, sugerindo que NS3 e NS4A formam um complexo estável (Choo & Pinho, 2003).

Outra função de NS3, seria a presença da atividade nucleotidase (NTPase) na extremidade carboxila, assim como a atividade de helicase (Suzich *et al*, 1993).

Admite-se que a proteína NS3 pode também estar envolvida em outros aspectos da infecção pelo HCV, como a interação com a proteína quinase A, que participa na transdução de sinais intracelulares e deve participar do mecanismo patogênico do HCV, principalmente com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Choo & Pinho, 2003).

NS4- A sequência polinucleotídica NS4 após “clivagem” dá origem há duas proteínas: NS4A com peso molecular de 4KD, cuja função é atuar como co-fator de NS3, e NS4B, com peso molecular de 4KD e cuja função ainda é desconhecida (De Francesco, 1999).

NS5- A sequência polinucleotídica NS5 após “clivagem” dá origem há duas proteínas diferentes que são liberadas pela ação conjunta de NS3 e NS4A, As

proteínas são NS5A, com 56KD e NS5B, com 65KD, ambas possuem sinais para localização nuclear, supondo-se que devem fazer parte de um complexo de replicação ligado à membrana. A função de NS5A está associada a resistência do HCV ao interferon alfa, entretanto este envolvimento não é universalmente aceito pela comunidade científica. Outra função atribuída a NS5A, seria a capacidade de ativar promotores celulares que estariam envolvidos no processo de persistência da infecção, desenvolvimento de cirrose e carcinogênese (Choo & Pinho, 2003).

1.3.2.3 Genótipos Virais

A análise filogenética das seqüências genômicas do HCV (Figura 3) realizada por Simmonds e colaboradores, designou como tipos ou genótipos os ramos maiores da árvore em número de seis, utilizando números arábicos de 1 a 6 (1,2,3...6) e subtipos, as seqüências relacionadas dentro dos grupos maiores, denominando-os por letras minúsculas, na ordem de sua descoberta (1a, 1b,...2a, 2b...3a, 3b, etc.) (Simmonds *et al*, 1994). Dentro de um mesmo genótipo e subtipo pode-se ainda existir variações, chamadas quasispecies. Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações (Strauss, 2001).

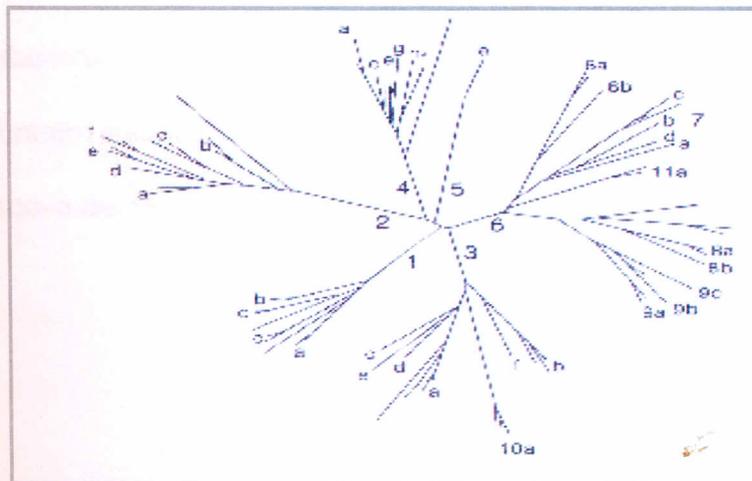


Figura 3: Árvore filogenética do HCV.
Fonte: Cavalheiro, 2003.

1.3.3 Vias de Transmissão

O HCV é um vírus de transmissão primariamente parenteral, ou seja, a contaminação se dá fundamentalmente através de sangue contaminado. Outras secreções orgânicas como saliva, urina, sêmen e líquido ascítico têm sido consideradas como vias de transmissão, porém, bem menos eficazes (Liou *et al*, 1992).

Constituem situações de risco, com variados potenciais de contágio:

- Transfusão de sangue ou derivados
- Uso de drogas ilícitas, através de compartilhamento de seringas
- Hemodiálise
- Exposição a sangue pelos profissionais de saúde
- Receptores de órgãos ou tecidos transplantados
- Recém-nascidos de mães HCV positivas
- Contatos sexuais promíscuos ou com parceiros HCV positivos
- Exposição a sangue por material cortante ou perfurante de uso coletivo não devidamente esterilizado ou descartável utilizados em procedimentos médicos (endoscopia, plasmaférese, acupuntura, etc.), odontológicos, cosméticos (tatuagens, manicure/pedicure, barbeiros, cabeleireiro, etc.)
- Contato social ou familiar com material de uso pessoal (barbeador, escova dental, depiladores, giletes, etc.)

1.3.3.1 Formas Específicas de Transmissão

1.3.3.1.1 Transfusão de Sangue e Derivados

Na década de 1980 com a introdução de programas preventivos contra a infecção pelo HIV e de marcadores alternativos como o anti-HBC e ALT na seleção de doadores de sangue, a prevalência de hepatite não-A não-B pós-transfusional caiu de 5% a 13% para 1,5% a 9% (Focaccia *et al*, 2003).

Nos anos 1990 com a introdução de testes de alta sensibilidade e técnicas de inativação viral, o risco de contágio por transfusão de sangue e seus derivados reduziu de 0,5% para 0,01% a 0,001% por unidade transfundida após 1994 (Murphy *et al.*, 2000).

Com a introdução de testes sorológicos de terceira geração e o uso da PCR em alguns centros de hemoterapia, o risco tem se reduzido ainda mais, não sendo notificada transmissão por albumina humana ou concentrado de fatores de coagulação, sendo hoje o risco estimado de contágio por estes hemoderivados muito pequeno (Steven *et al*, 1999).

1.3.3.1.2 Uso de Drogas Injetáveis

É atualmente, um dos mais importantes dentre os fatores de risco de transmissão do HCV, alcançando até 60% dos casos novos em países desenvolvidos (Focaccia *et al*, 2003).

Em média de 6 a 12 meses após o início do uso compartilhado de drogas ilícitas injetadas por via endovenosa, cerca de 80% dos usuários tornam-se soropositivos para o HCV (Thomas *et al.*, 1995).

A prevalência hoje de HCV positivos entre os usuários de drogas ilícitas no mundo é muito alta, chegando a 85% (Steven *et al*, 1999; Thomas *et al.*, 1995).

1.3.3.1.3 Hemodiálise

Estima-se que a prevalência de anticorpos anti-HCV em pacientes que realizam hemodiálise, varie de 15% a 48% na América do Norte, podendo ser mais alta em outras partes do mundo, como na Arábia Saudita (Pereira & Levey, 1997).

Demonstra-se como fatores de risco de contágio: (A) frasco de heparina de uso coletivo; (B) falta de limpeza e desinfecção de todos os instrumentos e superfícies ambientais (Focaccia *et al*, 2003).

1.3.3.1.4 Exposição Ocupacional

A prevalência do HCV em profissionais da área de saúde, incluindo cirurgiões e dentistas, varia entre 1% a 2%, podendo chegar a 10% (Thomas *et al.*, 1993). O risco de contaminação com agulhas contaminadas com o HCV é dez vezes menor que a contaminação pelo HBV, e discretamente superior em relação ao HIV, entretanto a proporção de soroconversão após acidente com agulhas contaminadas com HCV é de aproximadamente 1,8% (Alter, 1994; Puro *et al.*, 1995).

1.3.3.1.5 Transplantes de Órgãos e Tecidos

O transplante de órgãos sólidos ou tecidos humanos foi até a metade da década de 90 uma importante fonte de contágio do HCV (Pereira *et al.*, 1992; Tesi

et al., 1994). Estudos realizados nos EUA em 1991, detectaram índice de soropositividade de 1,8% em doadores de órgãos (Wreghitt *et al.*, 1994).

É indiscutível o fator de risco de contágio por órgãos transplantados, entretanto, com o emprego de técnicas mais sensíveis de detecção do agente viral e maior cuidado nos procedimentos, a prevalência de transmissão reduziu acentuadamente nos últimos anos (Norol *et al.*, 1994).

1.3.3.1.6 Transmissão no Período Perinatal

Diversos estudos têm reportado que a positividade do anti-HCV em gestantes varia de 0,7% a 4,4% (Conte *et al.*, 2000).

A proporção de transmissão vertical do HCV entre gestantes varia entre 0% a 35,5%, dependendo provavelmente da viremia (supostamente maior que 2.000.000 de cópias/ml) presente durante o parto (Yeung *et al.*, 2001).

Em relação a aquisição do HCV nos partos vaginal e cesariana, a proporção não mostra-se significância estatística, variando entre 4,3% a 3% respectivamente (Yeung *et al.*, 2001).

Em alguns estudos, o aleitamento materno, tem sido avaliado como fator de risco para transmissão do HCV, entretanto, os resultados têm se mostrado conflitantes entre crianças que receberam aleitamento materno e aleitamento artificial, sendo os números percentuais de 1,1% a 0,8% respectivamente, em virtude desses resultados, os autores têm aceitado a possibilidade de risco muito baixo, porém não ausente de contaminação do HCV através do aleitamento materno (Yeung *et al.*, 2001).

1.3.3.1.7 Transmissão Pela Via Sexual

A transmissão por via sexual tem sido muito discutida. Estima-se que o risco de transmissão sexual nos EUA seja de 1% a 6%, enquanto que na Itália este número sobe para 10%, porém a maioria dos parceiros que se tornaram soropositivos apresentavam muitos outros fatores de risco, e dessa maneira, os resultados não evidenciam definitivamente que o contágio tenha ocorrido por via sexual, possivelmente necessitando de fatores adjuvantes para facilitar a transmissão como: DST, promiscuidade sexual, etc. (Yeung *et al.*, 2001).

Dois grandes estudos sobre transmissão sexual realizados por Eyster *et al* e Brettler *et al* em parceiras de hemofílicos HCV-positivos, documentaram baixa relação de transmissão sexual do HCV, sendo que os percentuais encontrados variaram de 2,6% a 2,7% respectivamente (Eyster *et al.*, 1991; Brettler *et al.*, 1992).

A transmissão sexual não tem sido considerada uma via primordial ou eficaz de aquisição do HCV em casais heterossexuais monogâmicos, não havendo recomendações de proteção em relação à atividade sexual entre esses casais (CDC, 1998). A exemplo do que ocorre na infecção pelo HIV, o risco de transmissão do HCV é maior entre homossexuais masculinos do que entre os heterossexuais e, da mesma forma, com maior probabilidade de contágio do homem para a mulher, do que da mulher para o homem, assim como do intercurso anal em relação ao intercurso vaginal (Kingsley *et al.*, 1990; Padian *et al.*, 1991).

Estudos não conseguem documentar os diferentes tipos de atividades sexuais entre os casais hetero e homossexuais, gerando controvérsias com relação a transmissão sexual do HCV, outro ponto que tem gerado controvérsias é

a difícil definição e caracterização do que são condições determinadas de promiscuidade sexual e exposição sexual de risco elevado. A transmissão do HCV através da via sexual coexiste com fatores multivariáveis e difícil caracterização, além disso outras condições podem estar associadas favorecendo a disseminação desse vírus em alguns meios e classes sociais (Focaccia *et al.*, 2003).

1.3.3.1.8 Exposição Percutânea e Outras Situações

Acidentes percutâneos com agulhas contaminadas apresentam um risco de contágio entre 2% e 10% (Mitsui *et al.*, 1992).

Outras prováveis vias de transmissão do HCV estão associadas a rituais e serviços de cosmética como tatuagem, *piercing*, acupuntura, etc. (Murphy *et al.*, 2000). Outros procedimentos como o uso de barbeadores, gilete, navalhas ou qualquer outro material cortante ou perfurante de uso coletivo não descartável, aparelho elétrico de depilação e cortadores de cutículas em salões de beleza assim como instrumentais odontológicos não devidamente esterelizados também apresentam grande risco de contaminação (Mitsui *et al.*, 1992).

1.3.4 Epidemiologia

A infecção pelo HCV tem uma distribuição universal e as suas altas taxas de prevalência estão diretamente relacionadas com os chamados grupos de risco, como: hemofílicos, pacientes hemodialisados, poli-transfundidos e usuários de drogas injetáveis.

No início de 2002, dados conhecidos permitem estimar uma prevalência mundial de portadores da infecção em torno de 500 milhões de indivíduos (Paltanin & Reiche, 2002) com percentuais que variam de 1% a 6% (Who, 2002). A incidência é maior em países em desenvolvimento, chegando a algo em torno de 4% a 6% em alguns grupos populacionais (Al-Faleh *et al.*, 1991). Nos países desenvolvidos a prevalência atinge média percentual entre 1% a 2% da população geral (Focaccia *et al.*, 2003).

Na América do Sul, a prevalência tem sido estimada por estudos realizados em amostras de pré-doadores de sangue, o Brasil apresenta a maior taxa de prevalência neste subcontinente, ficando em torno de 1,60%, sendo dessa maneira considerado um país de alta endemicidade (Grupo de Estudos da Sociedade Brasileira de Hepatologia, 1999)

Como na América do Sul e em todo o Brasil, a soroprevalência na Amazônia Brasileira tem estado relacionada à seleção de doadores de sangue e estudos em hemodializados e hemofílicos.

1.3.4.1 Soroprevalência em Doadores de Sangue

Com a introdução de testes e métodos mais sensíveis na seleção e triagem de doadores de sangue os casos de hepatites pós-transfusionais têm sido reduzidos, embora não se possa prever ainda, a erradicação total desses casos nos próximos anos (Ebeling, 1998).

A soroprevalência mundial é variável, e segue o índice de desenvolvimento humano, desta forma a prevalência de anticorpos anti-HCV entre doadores de sangue segundo análise sócio-econômica tem se mostrado baixa (0% a 2,9%) em

países desenvolvidos, intermediária (0% a 8,6%) a alta (1,5% a 18%) em países sub-desenvolvidos. Segundo a OMS, a taxa de triagem sorológica realizada de maneira adequada dentre os países desenvolvidos, chega a 100% das unidades de sangue coletadas anualmente, enquanto que em países com médio e baixo desenvolvimento apenas 57% das unidades coletadas anualmente são triadas adequadamente (OMS, 2001).

No Brasil, na região Norte, a prevalência tem atingido um percentual de 0,62% para o anti-HCV, enquanto que a média brasileira é de 0,48% (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2002).

Na cidade de Belém-PA, também com estudos realizados na população de doadores de sangue, a taxa detectada de prevalência entre os doadores de sangue é 0,59% (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2002). Segundo dados da Fundação Hemopa, até o mês de outubro de 2003 o percentual de soroprevalência do anti-HCV para o Estado do Pará, na população de doadores de sangue para este ano até o momento é de 0,68%, valor superior ao encontrado em 2002 segundo levantamento da ANVISA (HEMOPA, 2003).

1.3.4.2 Soroprevalência em Hemodializados

Pacientes hemodializados têm alta prevalência, com percentuais que variam de 19% a 47,2% (Sheu *et al.*, 1992; Esteban *et al.*, 1989; Ayola *et al.*, 1991).

Segundo inquérito nacional realizado por um grupo de estudos da Sociedade Brasileira de Hepatologia e publicado em 1999, a prevalência mais elevada para o anti-HCV em hemodializados foi para a região norte com 47,5%

percentual ligeiramente superior ao encontrado para a região sul com 43,6% (Grupo de Estudos da Sociedade Brasileira de Hepatologia, 1999)

1.3.4.3 Soroprevalência em Hemofílicos

Entre os hemofílicos, a prevalência de infecção pelo vírus HCV varia de 53% a 89% entre os vários países do mundo (Bayer & Reuben, 1993) como: EUA (60%), Espanha (75%), Itália (82%), França (71%), Alemanha (78%), Reino Unido (89%) (Brandão-Melo *et al*, 2003).

No Brasil observam-se índices em torno de 87,3% (Brandão-Melo, 1990; Brandão-Melo *et al*, 1993).

1.3.4.4 Distribuição e Prevalência dos Genótipos

As diferenças entre os genótipos do vírus da hepatite C (HCV) têm sido consideradas pelos pesquisadores como importante marcador epidemiológico e de distribuição geográfica, assim como também têm sido utilizadas para traçar o curso da infecção em uma dada população, como o que se observa com o HCV tipo 1, que parece representar o tipo mais agressivo, com prognóstico pouco favorável e que menos responde a terapia quando comparado com os outros tipos (Cavalheiro, 2003).

Alguns genótipos como 1a, 1b, 2a e 2b têm distribuição em todo o mundo, outros como 5a e 6a são somente encontrados em regiões específicas como África do Sul e Hong Kong respectivamente (Focaccia, 1997).

No oeste europeu e nos EUA, os genótipos mais freqüentes são 1a, 1b, 2a,

2b e 3a, embora a frequência possa variar para cada genótipo (McOmish *et al.*, 1994).

No Japão, o genótipo 1a praticamente não existe; quando presente, é encontrado em pacientes hemofílicos que fizeram uso prévio de hemoderivados produzidos nos EUA, tais como fatores de coagulação VIII/XI (Kato *et al.*, 1991).

No Brasil, assim como nas Américas, os genótipos mais prevalentes são 1, 2 e 3, responsáveis por mais de 90% dos casos. Dentro do próprio Brasil, observam-se diferenças na prevalência entre os diferentes tipos, embora o tipo 1 seja o mais freqüente, e responsável por cerca de 60% dos casos de infecção pelo HCV no país. Na região Centro-Oeste observa-se uma maior incidência do tipo 2, ao passo que na região Sul o tipo 3 representa quase metade dos casos de infecção (Medeiros-Filho, 2002).

Nos poucos estudos realizados até o momento na região Norte do Brasil, restritos aos Estados do Amazonas e do Pará, observa-se o predomínio do tipo 1 e subtipo 1b, semelhante ao que ocorre em outras regiões do país (Brasil *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 1998).

1.3.5 Imunopatogênese

Os mecanismos responsáveis pelo dano da célula hepática e infecção crônica pelo HCV não são bem conhecidos, acredita-se que a resposta imune do hospedeiro contra o vírus desempenhe um papel central na patogênese do HCV. Entretanto, indivíduos imunocompetentes quando infectados pelo HCV, desenvolvem infecção persistente que cronificam em 85% dos casos, e em

apenas 15% se observa uma resolução dos casos de hepatite C aguda, é exatamente esta persistência que é problemática na infecção pelo HCV, pois causa cirrose hepática de longa duração, freqüentemente seguida pelo aparecimento de carcinoma hepatocelular. Portanto, a real patogenicidade do HCV é principalmente de dois aspectos: dano à célula hepática e persistência viral (Fukuda & Nakano, 2003).

1.3.5.1 Mecanismo de Lesão da Célula Hepática

A existência de indivíduos saudáveis que albergam o vírus indica que o HCV não é citopático. O desenvolvimento de hepatite aparentemente resulta do reconhecimento imune e da destruição de hepatócitos infectados pelo HCV. O grau de destruição varia entre os indivíduos. A infecção persistente no fígado dispara continuamente uma resposta ativa de células T que induz a destruição de hepatócitos-alvo. Este é provavelmente o principal mecanismo responsável pelo dano hepático (Fukuda & Nakano, 2003).

A imunidade humoral, ou seja, a produção de anticorpos, é fundamental para a neutralização de partículas virais livres e para impedir a entrada de vírus nas células do hospedeiro. A primeira interação entre vírus e a célula do hospedeiro é a ligação da proteína do envelope do HCV à molécula CD81 na superfície da célula alvo, normalmente esta interação é freqüentemente observada no soro de pacientes com hepatite C crônica, entretanto apresentam um potencial de infecção baixo e provavelmente não são responsáveis por dano hepático na infecção pelo HCV (Pileri *et al*, 1998).

A imunidade celular parece ser a principal responsável pelo mecanismo de lesão do hepatócito, que ocorre devido a ativação da célula T “helper”, seguida pela ativação da célula T citotóxica, resultando na lise de células-alvo infectadas pelo HCV (Fukuda & Nakano, 2003).

Acredita-se que o evento inicial da resposta imune ao HCV seja o reconhecimento do HCV pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), estas apresentam peptídeos antigênicos curtos, derivados da clivagem proteolítica de antígenos exógenos no sítio de ligação ao antígeno das moléculas HLA-classe II em sua superfície, esses sítios antigênicos foram identificados nas regiões core, NS3 e NS4 do HCV (Tsai *et al*, 1997). As células T “helper” CD4+ (Th), reconhecem esses peptídeos antigênicos nas APCs por meio do receptor de célula T (TCR) e da molécula CD4, ocorrendo sua ativação. Uma vez ativada as Células Th secretam citocinas, que modulam a atividade de células T citotóxicas CD8+ antígeno-específicas (CTL) ou células B (Fukuda & Nakano, 2003).

Dependendo do perfil de citocinas as células Th são denominadas Th₁ que secreta interleucina 2 e interferon gama estimulando a resposta citotóxica e Th₂ que produzem interleucina 4 e 10, que estimulam a resposta humoral. Os fatores que determinam a prevalência de Th₁ sobre Th₂ são ainda desconhecidos, mas acredita-se que o desequilíbrio entre elas seria o responsável tanto pela incapacidade de eliminação do vírus como pela maior ou menor gravidade da lesão hepática (Strauss, 2001).

As citocinas Th₁ dão suporte aos CTL, que são importantes no mecanismo de defesa em infecções virais, uma vez que são responsáveis por mediar a lise das células infectadas pelo vírus, levando ao clareamento viral. Isso ocorre

quando um sinal apoptótico é iniciado pela interação entre o antígeno Fas presente na célula-alvo e o ligante de Fas (FasL) presente no CTL (FuKuda & Nakano,2003).

1.3.6 Diagnóstico

A grande problemática da infecção pelo HCV, resulta que na maioria das vezes, a doença é assintomática, dificultando ainda mais seu controle e facilitando a disseminação na comunidade. O diagnóstico laboratorial é em geral acidental, feito para avaliação da possível causa de testes de função hepática alterado evidenciado durante exame de rotina ou durante triagem sorológica em doadores de sangue (Ferraz & Oliveira, 2003).

Os testes de função hepática, especialmente os níveis séricos das aminotransferases (transaminases) ALT/TGO e AST/TGP, apesar de serem indicadores sensíveis do dano do parênquima hepático, não são específicos para hepatites. Dessa forma, o diagnóstico, por meio de testes sorológicos ou de métodos moleculares, é fundamental para a definição do agente etiológico da infecção (Brasil. Ministério da Saúde, 2003).

1.3.6.1 Sorológico

A introdução de testes sorológicos para detecção do HCV em bancos de sangue em 1992, foi importante avanço no controle da infecção, evitando a disseminação desenfreada da doença. O primeiro teste imunológico desenvolvido, foi um imunoenensaio enzimático (ELISA) de primeira geração contendo antígenos recombinantes c100-3, codificado pela região NS4 do genoma do HCV. Esse

ensaio permitia detectar anticorpos anti-c100-3 no soro dos portadores de HCV. A alta taxa de resultados falso-positivos e de falso-negativos (superior a 20%), particularmente quando era usado para triagem de indivíduos de baixo risco, como os doadores de sangue, levou a necessidade de desenvolver imunoenaios mais sensíveis e específicos (Rubin, 1994).

Atualmente, os imunoenaios consistem da detecção de anticorpos capazes de reagir com vários antígenos recombinantes HCV-específicos fixados em uma fase sólida, denominados ELISA de segunda e terceira geração, cujos antígenos utilizados são: c100-3 (NS4); c33c (NS3) e c22-3 (núcleo, "core") (McPherson, 1994). A sensibilidade desses imunoenaios para a detecção de anticorpos anti-HCV, tem sido superior a 94% e a especificidade, maior que 97%. Uma das possíveis causas de resultados falso-negativos com os ensaios atualmente disponíveis, tem sido a heterogeneidade viral. Os antígenos são produzidos a partir da clonagem de seqüências de genótipos tipo 1a, que reagem fracamente com anticorpos de infectados com genótipos menos comuns (Gross & Persing, 1995).

Uma das limitações dos ensaios imunológicos está relacionada com a janela imunológica (tempo de soro-conversão). Normalmente a soro-conversão dos anticorpos anti-HCV é tardia, ou seja, ocorre após o início dos sintomas clínicos da doença (ex., icterícia) ou da elevação dos níveis séricos das transaminases, podendo os anticorpos anti-HCV serem detectados entre a oitava e décima segunda semana após o contato com o vírus. Nos pacientes imunossuprimidos, esse período torna-se significativamente prolongado, uma vez que a soro-conversão e a evolução da resposta imunológica ocorrem mais

tardamente. Outra limitação é que embora os imunoenaios possam evidenciar a exposição ao HCV, são incapazes de diferenciar a infecção recente ou passada. Indivíduos na fase inicial da soro-conversão ou recentemente infectados apresentam resultados inconclusivos para esse ensaio que, ocasionalmente, se tornarão positivos na obtenção de amostras posteriores (Gross & Persing, 1995).

1.3.6.2 Molecular

As limitações observadas nos ensaios imunológicos, criaram a necessidade do desenvolvimento de outros testes diagnósticos que proporcionem maior confiabilidade quanto: (i) especificidade e sensibilidade, (ii) definição da infecção passada ou recente, e (iii) avaliação da atividade viral, em relação ao prognóstico da doença hepática, e à eficácia da terapia antiviral (Rubin, 1994). Cada vez mais tem sido demonstrada a aplicação das técnicas moleculares na investigação da infecção pelo HCV, seja no reconhecimento do tipo de vírus infectante e posterior classificação ou na avaliação da carga viral. Outra importante aplicação das técnicas moleculares é o acompanhamento da terapia antiviral em pacientes portadores de hepatite C crônica, em particular no tratamento com o Interferon alfa (Garson & Tedder, 1993).

Dentre os métodos moleculares de detecção e quantificação do RNA-HCV no soro, a amplificação do genoma viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais sensível (Gross & Persing, 1995; Rüster *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1993).

A RT-PCR, é o método de detecção do vírus da hepatite C feito através da transcrição reversa (RT) e subsequente amplificação do genoma viral pela PCR

(Young *et al.*, 1993). Esse método permite que o RNA seja detectado no soro, uma a duas semanas após a infecção, antes mesmo do aparecimento dos primeiros sinais clínicos, outra importante implicação, são os casos em que os imunoenaios fornecem resultados indeterminados ou não-reativos .

Para a detecção do RNA-HCV por RT-PCR, um passo importante é a escolha dos iniciadores (“primers”) para fins diagnósticos, que devem corresponder a seqüência genômica bem conservada para os diferentes genótipos do HCV, de modo a garantir a alta sensibilidade do método. No caso do HCV, a região eleita para amplificação pela PCR é a 5' UTR por ser a mais conservada do genoma viral (Choo & Pinho, 2003). Na etapa de transcrição reversa o RNAm é convertido em DNA complementar (cDNA) pela enzima Transcriptase Reversa (RT), e este funciona como molde para a PCR. As moléculas de cDNA são amplificadas em uma única etapa pela PCR convencional. Os produtos da PCR podem ser analisados por eletroforese (PCR qualitativo) ou por sistemas de hibridização com sondas marcadas (PCR quantitativo). Alguns protocolos utilizam, além da amplificação convencional, uma amplificação adicional com iniciadores internos, denominada dupla PCR (“PCR-Nested”). Essa modificação aumenta significativamente a especificidade e a sensibilidade da técnica convencional (Garson, 1990; Watson *et al.*, 1997).

1.3.6.3 RT-PCR em Tempo Real

É um método cujo desenvolvimento foi possível devido duas grandes descobertas: a existência da atividade 5'-3' exonuclease da taq polimerase e a construção de uma sonda duplamente marcada, que emite sinais fluorescentes

Figura 4: 30
quencher na 5'
Fonte: Mihajlov

quando clivada, baseada na transferência de energia fluorescente ressonante (FRET) (Giulietti *et al.*, 2001).

Neste método a enzima taq polimerase durante a fase de alongamento "cliva" uma sonda interna duplamente marcada que não se alonga, chamada "TaqMan[®]" (Giulietti *et al.*, 2001).

No sistema "TaqMan[®]", a sonda é duplamente marcada com o corante repórter (6-carboxyfluoresceína) na extremidade 5' e o corante quencher (6-carboxytetrametilrodamina) na extremidade 3'. Enquanto esta sonda está intacta há transferência de energia fluorescente emitida pelo corante repórter e que é absorvida pelo corante quencher, no momento da degradação da sonda pela nuclease na PCR, estes corantes, repórter e quencher, são separados, e a emissão do corante repórter não é mais transferida para o corante quencher, resultando em elevada emissão fluorescente do corante repórter (Figuras 4 e 5). Este processo ocorre em todos os ciclos da PCR e o aumento da emissão fluorescente do corante repórter é lido por um detector de seqüências em tempo real durante o curso da reação (Giulietti *et al.*, 2001).

Sistema TaqMan[®]

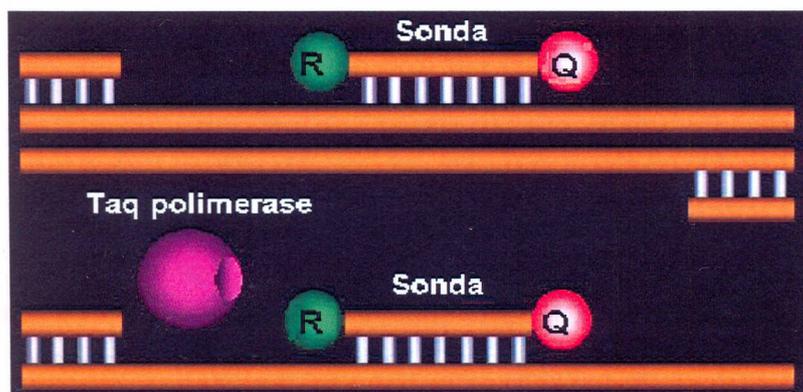


Figura 4: Sondas duplamente marcadas com o corante repórter na extremidade 5' e o corante quencher na extremidade 3'.

Fonte: Mihajlovich, 2002. (Applied Biosystems)TM

Sistema TaqMan[®]

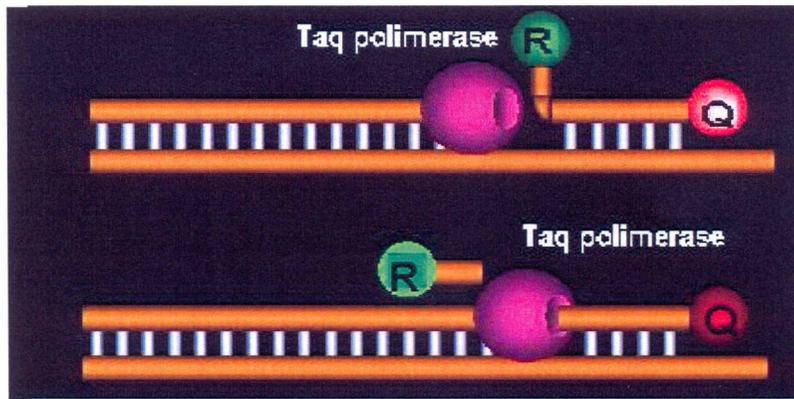


Figura 5: momento da degradação da sonda pela nuclease, ocorrendo separação dos corantes e resultando em elevada emissão fluorescente do corante repórter.

Fonte: Mihajlovich, 2002. (Applied Biosystems)TM

Um “software” calcula o valor que expressa a degradação da sonda durante o processo da PCR e constrói um gráfico a partir de pontos de amplificação denominados CT (“cycle threshold”) usando os dados da emissão fluorescente coletados durante a amplificação quando estes ultrapassam uma linha básica (threshold) escolhida para cada experimento individualmente (Figura 6) (Giulietti et al, 2001).

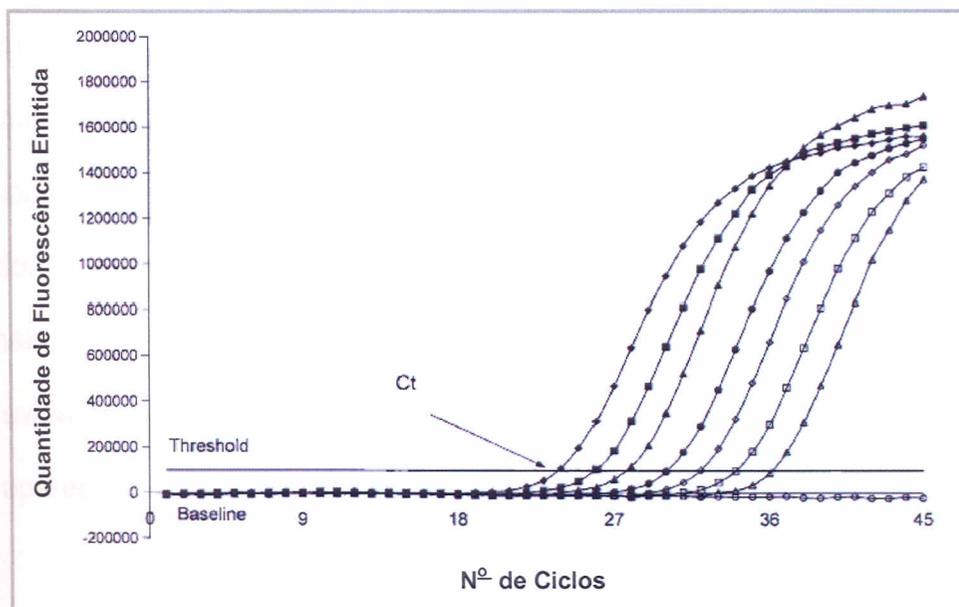


Figura 6: Gráfico demonstrando o CT (cycle threshold) calculado pela determinação do ponto no qual a fluorescência excede o limite threshold.

Fonte:Giulietti, 2001.

1.3.7 Aspectos Clínicos

A história natural da infecção pelo HCV, tem apresentado-se complexa e influenciada por fatores que atuam na sua evolução como: uso de álcool, genótipos, co-infecção com outros vírus, etc. (Strauss, 2001).

As formas leves ou “benígnas” da hepatite C, evoluem lentamente em várias décadas e podem nunca vir a desenvolver cirrose. Cerca de 1,5% desses tipos de infecção, podem regredir, ou seja, ocorrer a soroconversão espontânea com negatificação do RNA-HCV (Fujisawa *et al*, 1997; Guz *et al*, 1999). Clinicamente indistinguível das outras hepatites virais, a forma aguda da hepatite C apresenta um período de incubação em torno de seis semanas. Frequentemente os sintomas são mais leves e se manifestam como: icterícia, colúria, acolia fecal, hipopirexia, astenia e febre, ocorrendo em cerca de 5% a 10% dos casos (Focaccia, 1997).

A infecção crônica, pelo HCV, além de evoluir lentamente em anos ou décadas, costuma ter um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com enzimas séricas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (Strauss, 2003). O cansaço fácil e a adinamia são os sintomas mais encontrados, o exame físico apresenta uma icterícia leve, com fígado aumentado, pouco endurecido e raramente sinais de esplenomegalia.

Sinais e sintomas específicos relacionados à disfunção hepática, como icterícia evidente, ascite, varizes de esôfago e sangramento digestivo alto, somente aparecem em fase avançada da doença (Focaccia, 1997).

Com relação ao prognóstico da hepatite crônica, há uma classificação histológica que divide esta doença em: hepatite crônica lobular (com evolução normalmente benigna), hepatite crônica persistente (cl clinicamente de bom prognóstico) e hepatite crônica ativa (associada a replicação viral em desenvolvimento e fenômenos necróticos, com prognóstico mais reservado) (Bensabath *et al*, 1997).

1.3.8 Tratamento

Considerando-se que 50% das infecções agudas pelo HCV progridem para cronificação, quanto mais precoce for a instituição do tratamento, para frear o risco de evolução à cirrose e ao câncer primário do fígado, melhor será o resultado. Atualmente o tratamento da hepatite C visa interromper a evolução das lesões, eventualmente sua redução; eliminar a replicação viral; melhorar a função hepática e reduzir a probabilidade de evolução para o transplante hepático. Apesar do vírus permanecer em estado latente em algumas células do organismo, é possível erradicá-lo do sangue e do tecido hepático com as medicações disponíveis. A eficácia, entretanto, ainda é reduzida em muitos pacientes, e o tratamento é muito caro, (Strauss, 2001).

A indicação terapêutica se dá para todos os pacientes com forma aguda ou crônica da doença que apresentem infecção ativa indicada pela detecção do RNA viral através da PCR, sendo que nas formas crônicas, se faz necessária a constatação da presença de fibrose no tecido hepático, através da biopsia. Pacientes com contra-indicação para realização deste exame como hemofílicos ou

plaquetopênicos podem ser incluídos sem a evidência histológica da lesão hepática (Focaccia, 1997).

A determinação do genótipo viral, tem se mostrado muito útil para determinar o tempo de tratamento (um ano para o genótipo 1 e seis meses para os genótipos 2 e 3), além de se constituir em fator preditivo da resposta terapêutica, sendo os genótipos 1, 4, 5 e 6 de menor eficácia ao tratamento (Medeiros-Filho, 2002).

A faixa etária com melhor resposta ao tratamento medicamentoso situa-se em adultos jovens, entre 18 e 50 anos. Há pouco conhecimento sobre o tratamento em crianças, apesar de alguns estudos iniciais indicarem resultados semelhantes (Strauss, 2001).

Atualmente o esquema terapêutico utilizado inclui a administração de interferon alfa em associação com a ribavirina. Mais recentemente, o interferon tem sido utilizado em sua formulação peguilada em associação com a ribavirina, o que tem apresentado maior eficácia em várias situações clínicas, em relação ao interferon comum, especialmente em pacientes portadores de infecção pelo genótipo 1; cirróticos; co-infecção HIV-HCV e portadores de insuficiência renal (Focaccia *et al*, 2003).

A utilização do interferon como terapêutica para hepatite C, pode ser contra indicada de maneira absoluta nos casos de distúrbios psiquiátricos, doença hepática descompensada, gravidez, neoplasias, diabetes melito, transplantados (exceto fígado), plaquetopênicos (inferior a $60.000/\text{mm}^3$), neutropênicos (inferior a $1.000/\text{mm}^3$) e hipertireoidismo, ou relativa como nos casos de doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes em atividade, doença convulsiva crônica,

distúrbios hematológicos (anemias, hemólises, hemoglobinopatias), uso de álcool ou drogas ilícitas, insuficiência renal crônica, co-infecção HCV-HIV e HCV-HBV.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Comparar os testes sorológico de imunoenensaio enzimático (ELISA) e molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) quando da seleção de pré-doadores de sangue na Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - Hemopa

2.2 ESPECÍFICOS

Correlacionar a relação entre densidade óptica e Cut Off (DO/Cut off) do teste ELISA com os resultados da PCR.

Avaliar a existência de correlação entre carga viral e DO/Cut off.

Avaliar se existe preferência da prevalência do sexo e da faixa etária nos portadores do HCV.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRA

Foram coletadas 290 amostras de candidatos a doação de sangue da Fundação HEMOPA, selecionadas na divisão de sorologia cujo resultado do teste ELISA estavam positivo ou indeterminado para o anti-HCV, utilizando-se o kit Murex anti-HCV (versão 4.0) da Abbott Murex. Do total de amostras analisadas, 210 (72%) eram do sexo masculino e 80 (28%) do sexo feminino. Todas as amostras foram submetidas a uma segunda coleta de sangue, onde foram retestadas para o teste ELISA utilizando-se o mesmo kit sorológico anterior e posteriormente estas amostras foram submetidas ao teste confirmatório da PCR em tempo Real.

Os doadores selecionados com teste ELISA positivo ou indeterminado, receberam uma carta em suas residências solicitando o comparecimento em dia e hora marcados ao ambulatório de inápto da fundação, no qual foram atendidos e orientados por médicos do setor a respeito do resultado da sorologia e da necessidade de se coletar uma nova amostra de sangue para a realização do exame confirmatório (PCR), esses doadores selecionados foram informados sobre a pesquisa, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) autorizando a utilização de suas amostras, e ainda receberam os resultados dos exames (sorologia e PCR) realizados em suas residências. Os que apresentaram resultados positivos no exame de PCR para o vírus da hepatite C, foram encaminhados para o núcleo de Medicina Tropical (local de referência para

tratamento hepatológico) a fim de receberem tratamento por médicos especializados no assunto.

3.2 EXTRAÇÃO DO RNA

Inicialmente, a segunda amostra coletada (5 mL com anticoagulante EDTA – etil-enediaminetetra-ácido acético em tubo estéril) foi submetida a extração do RNA viral a partir do plasma do doador, obtido por punção venosa seguida por centrifugação durante 4 minutos a 2500 rpm.

A extração foi realizada utilizando-se trizol LSTM (Gibco – BRL), reagente responsável pela lise celular, na quantidade de 375 µL em tubos ependorff de 1,5 mL com adição de 125 µL do plasma a ser testado, homogeneizando-se por inversão e incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 100 µL de clorofórmio para auxílio na lise celular, sendo as amostras vigorosamente agitadas no vórtex por 15 segundos e posteriormente incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após incubação as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000g. Finalizada esta etapa de centrifugação a fase aquosa resultante foi transferida para outro tubo ependorff estéril de 1,5 mL, com auxílio de pipeta automática e ponteira com barreira, sendo o restante desprezado. Em seguida foi adicionada a fase aquosa 250 µL de isopropanol para precipitação do RNA, sendo a amostra homogeneizada por inversão e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida por nova centrifugação de 10 minutos a 12.000g, sendo o sobrenadante totalmente desprezado por inversão do tubo. Em seguida foram realizadas duas lavagens consecutivas do RNA precipitado, com a adição de 500µL de etanol a

75%, com posterior agitação do material no vórtex e centrifugação por 5 minutos à 7.400g. Finalizada a centrifugação o sobrenadante foi totalmente desprezado, sendo o tubo invertido sobre papel toalha por 15 minutos para esgotamento total da parte líquida contida no tubo.

A etapa final da extração consistiu na hidratação do RNA, adicionando-se 25µL de água ultra pura livre de RNase, sendo esta amostra conservada a 4°C “overnight” para total solubilização do RNA a ser testado no dia seguinte. Caso a amostra não seja utilizada imediatamente, a mesma poderá ser estável por uma semana quando conservada a 4°C.

3.3 “PRIMERS” E SONDA

Tabela 2: Seqüência dos “primers” e sonda localizados na região 5’ UTR do HCV.

“Primers” e sonda	Seqüência
HCV NC5NCR54F	5’ – CGC TCA ATG CCT GGA GAT TT – 3’
HCV NC5NCR121R	5’ – TTT CGC GAC CCA ACA CTA CTC – 3’
HCV NC5NCRtxt79T	5’ – FAM TGC CCC CGC GAG ACT GCT AGC TAMRA – 3’

3.4 RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Para amplificação do RNA viral extraído, foi utilizada a técnica da PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se a plataforma ABI PRISMA® 7000 (Applied Biosystems), incorporada a um ciclador térmico, um detector de fluorescência e um software para análise do produto amplificado. O software Primer Express (PE

Applied Biosystems, Foster City, USA) foi utilizado para o desenho da sonda de hibridização fluorescente apropriada, bem como os “primers” para amplificação.

A sonda com corante reporter 5' FAM e o corante quencher 3' TAMRA, e os “primers” foram sintetizados pela PE Applied Biosystems.

A reação de RT-PCR foi executada com a preparação de um mix utilizando-se o kit TacMan[®] EZ RT-PCR core Reagents Applied Biosystems, constituído por: TacMan Ez Buffer 5x; acetato de manganês (Mn(Oac))(25mM); bases nitrogenadas dATP, dCTP, dGTP(10mM) e dUTP(20mM); rTth DNA Polimerase (2,5 U/μL) e UNG (1U/μL).

Este mix foi realizado em tubos de 0,2 mL utilizando-se as seguintes quantidades: 10μL Ez Buffer; 6μL Mn(Oac); 1,5μL de cada base nitrogenada; 2μL rTth DNA; 0,5μL UNG; 8,5 μL de água ultra pura; 1,5μL de cada “primer” e 1,5 μL de sonda e 2 μL de RNA a ser testado, totalizando um volume final de reação de 25μL. Em seguida este tubo foi fechado com tampa óptica MicroAmp (Applied Biosystems) e colocado no ciclador utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo a 50° C (2 minutos), 1 ciclo 60° C (30 minutos), 1 ciclo a 95° C (5 minutos), 50 ciclos a 94° C (20 segundos) e 1 ciclo 60° C (1 minuto).

A análise do produto amplificado foi realizada pelo software da plataforma ABI 7000 Applied Biosystems, Foster City, USA) já citado.

Os resultados foram organizados em banco de dados em forma de tabelas e gráficos e analisados estatisticamente utilizando-se métodos de estatística descritiva e o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação de amostras, e ainda utilizado o teste do qui-quadrado para análise comparativa de resultados de PCR por faixa etária.

4 RESULTADOS

Do total de amostras analisadas (290) entre os doadores de sangue da Fundação Hemopa, a distribuição absoluta dos valores obtidos por teste ELISA e PCR nos sexos masculino e feminino, apresentou-se da seguinte maneira: 80 amostras eram do sexo feminino, quando submetidas ao teste ELISA, 49 amostras apresentaram resultado positivo, 12 amostras resultado indeterminado e 19 amostras resultado negativo, em seguida essas amostras foram submetidas ao teste confirmatório da PCR, mostrando como resultado 8 amostras positivas e 72 amostras negativas. As amostras do sexo masculino, no total de 210, também foram submetidas aos dois testes (ELISA e PCR) apresentando os seguintes resultados: teste ELISA, 91 amostras positivas, 50 amostras indeterminadas e 69 amostras negativas, quando submetidas ao PCR, 24 amostras apresentaram-se positivas e 186 amostras apresentaram-se negativas (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição de valores absolutos obtidos por teste ELISA e PCR no sexos masculino e feminino.

Sexo	n	ELISA			PCR	
		POS	IND	NEG	POS	NEG
F	80	49	12	19	8	72
M	210	91	50	69	24	186
Total	290	140	62	88	32	258

Todas as 290 amostras inicialmente selecionadas e testadas pelo teste ELISA, foram submetidas a uma segunda coleta de sangue, após convocação do doador. Essas amostras foram retestadas para o teste ELISA utilizando-se o mesmo kit sorológico anterior, após a repetição do teste ELISA, as amostras apresentaram a seguinte distribuição: 49%, mostraram-se positivas para o anti-HCV, 21% indeterminadas e 30% negativas (Figura 7).

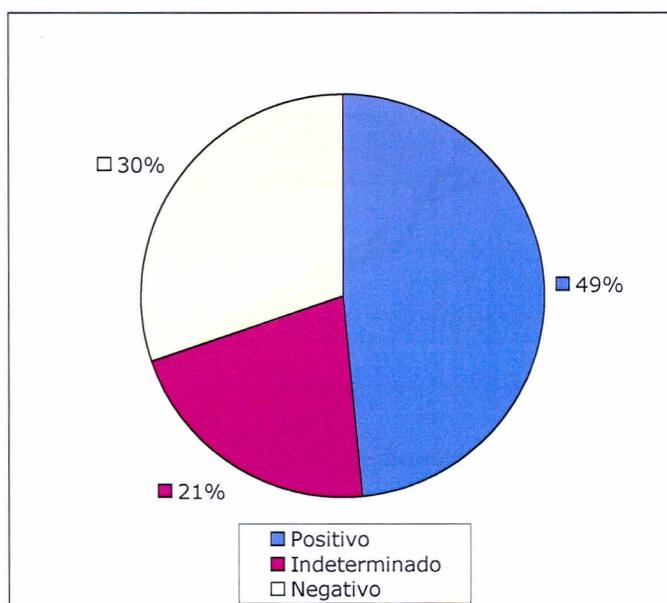


Figura 7: Distribuição das freqüências de resultado do teste ELISA retestados em segunda amostra na ocasião do retorno do doador inapto.

Após organização dos dados em tabelas, a análise estatística foi realizada utilizando-se métodos de estatística descritiva (Tabela 4). Em seguida utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p= 0,0006$) para comparação das amostras, onde obteve-se duas amostras independentes: ELISA pos/PCR pos e ELISA pos/PCR neg, as quais apresentaram resultado estatisticamente significativo, tratando-se de duas amostras diferentes (Figura 8).

Tabela 4: Estatística descritiva de DO/Cut off das amostras com teste ELISA positivo

PCR	n	ELISA POSITIVO (DO/Cutoff)		
		Média \pm Desvio Padrão	Mínima	Máxima
NEG	110	3,53 \pm 1,79	1,2	11,44
POS	30	4,69 \pm 1,02	1,79	5,85

DO/Cut off: razão entre a Densidade óptica e Cut off

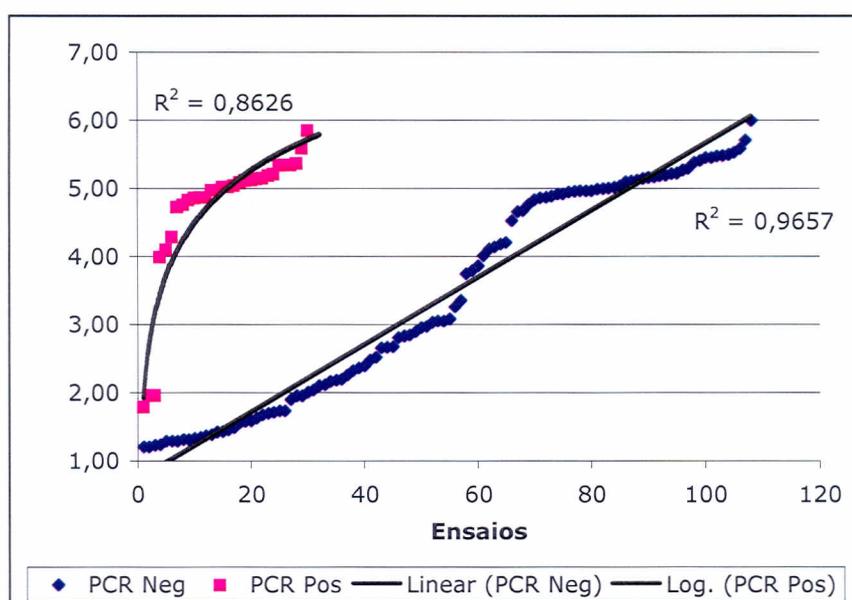


Figura 8: Dispersão de valores DO/Cutoff de testes ELISA positivos em duas amostras: PCR positivos e PCR negativos.

Após a realização do teste ELISA as amostras foram submetidas ao teste da PCR, onde foi possível obter-se combinações diferentes entre os resultados dos dois testes utilizados (ELISA e PCR) e observar sua distribuição nos sexos. Do total de 80 amostras do sexo feminino, 49 apresentaram ELISA positivo, quando submetidas a PCR 8 foram positivas e 41 negativas; 12 apresentaram-se indeterminadas para o ELISA e quando submetidas a PCR as 12 foram negativas; 19 apresentaram-se negativas no ELISA e quando submetidas a PCR

continuaram negativas. Entre as 210 amostras do sexo masculino, 91 apresentaram ELISA positivo, quando submetidas a PCR 22 foram positivas e 69 negativas; 50 amostras apresentaram-se indeterminadas para o ELISA e quando submetidas a PCR 2 foram positivas e 48 negativas; 69 apresentaram-se negativas no ELISA e quando submetidas a PCR continuaram negativas (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição dos dados absolutos da combinação de testes ELISA e PCR nos sexos masculino e feminino.

Sexo	n	ELISA					
		POS		IND		NEG	
		PCR+	PCR-	PCR+	PCR-	PCR+	PCR-
F	80	8	41	0	12	0	19
M	210	22	69	2	48	0	69
Total	290	30	110	2	60	0	88

Após a análise da distribuição dos dados absolutos da combinação de testes ELISA e PCR em ambos os sexos, obteve-se a seguinte distribuição das freqüências na amostragem estudada: 10% das amostras apresentaram ELISA positivo/PCR positivo; 38% ELISA positivo/PCR negativo; 1% ELISA indeterminado/PCR positivo; 21% ELISA indeterminado/PCR negativo e 30% ELISA negativo/PCR negativo (Figura 9).

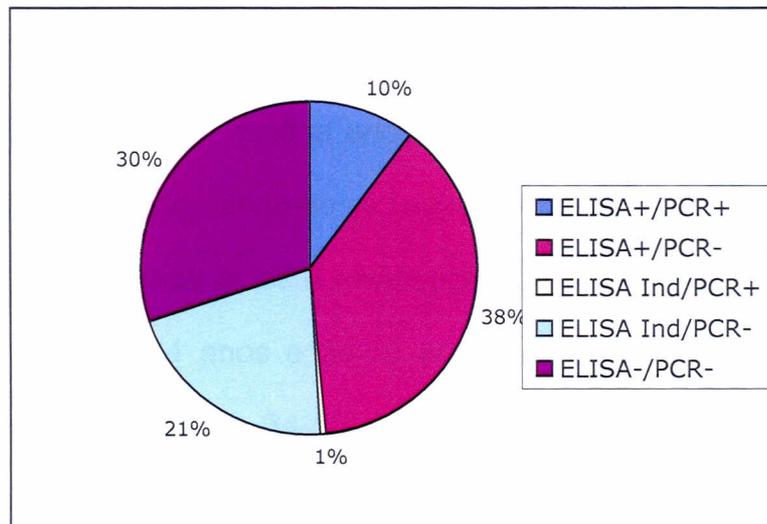


Figura 9: Distribuição das Frequências das combinações de resultado de teste ELISA e PCR na amostra analisada.

Todas as amostras que apresentaram resultado positivo no teste ELISA (140) quando submetidas ao teste da PCR, apresentaram a seguinte distribuição: 21% apresentaram resultado positivo e 79% resultado negativo (Figura 10).

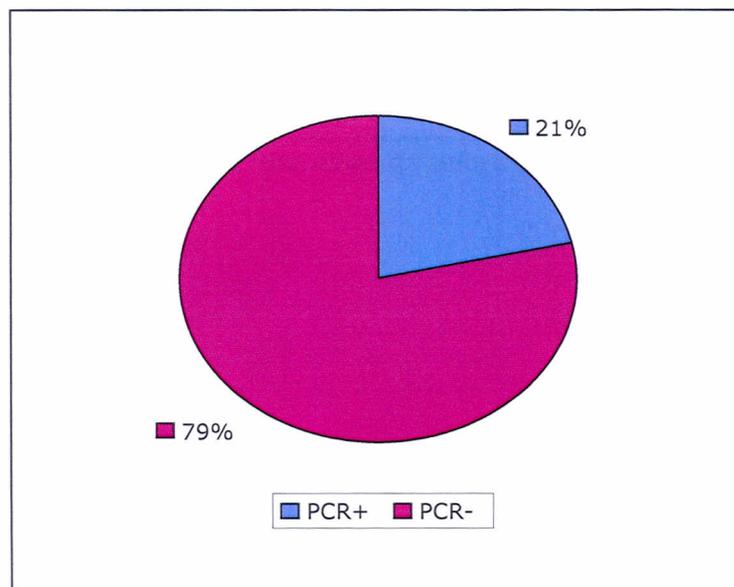


Figura 10: Amostras com teste ELISA positivo submetidas ao teste de PCR.

Com relação à faixa etária da amostra estudada entre os doadores de sangue, observou-se que a maioria encontra-se na faixa entre 18-34 anos como mostra a figura 11. Considerando-se as faixas etárias de 18-34 anos, 34-50 anos e 50-65 anos e utilizando-se o teste estatístico do qui-quadrado, observou-se que entre as faixas de 18-34 anos e 34-50 anos ($p=0,014$) o resultado mostrou-se significativo e entre as faixas 34-50 anos e 50-65 anos ($p=0,8021$) o resultado mostrou-se não significativo.

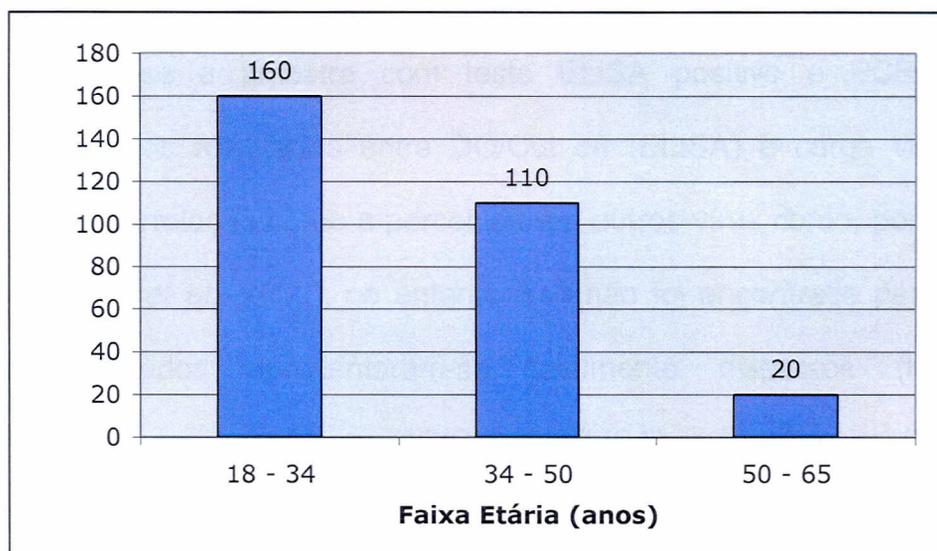


Figura 11: Distribuição da faixa etária da amostra analisada.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra que as duas amostras encontradas ELISA positivo/PCR positivo e ELISA positivo/PCR negativo, quando analisadas separadamente mostraram-se independentes e estatisticamente significativas ($p=0,0006$), tratando-se de duas amostras diferentes como mostra a figura 8. Esta diferença pode ser supostamente devido a resposta imune diferenciada nas amostras que apresentaram resultado no teste PCR positivas.

Analisando-se a amostra com teste ELISA positivo e PCR positivo, esperava-se que os resultados entre DO/Cut off (ELISA) e carga viral (PCR) apresentassem correlação como a percebida em outros vírus como, por exemplo, no HIV (Rezende *et al.*, 2002), no entanto isso não foi encontrado para o HCV, onde os resultados apresentaram-se totalmente dispersos ($R^2=0,025$), confirmando a não correlação entre DO/Cut off (ELISA) com carga viral (PCR).

Estes resultados mostram que o teste ELISA utilizado para triagem sorológica de doadores de sangue no HEMOPA – PA, apresenta-se eficiente, entretanto pouco específico para o agente viral estudado, uma vez que anualmente são coletadas cerca de 60.000 bolsas de sangue neste hemocentro, onde 0,59% destas bolsas são descartadas com resultados do teste sorológico (ELISA) positivo ou indeterminado para o anti-HCV, sendo que 90% destas bolsas apresentam-se com resultado falso-positivo, quando confirmadas pelo teste molecular da PCR. Assim, apenas 10% dessas bolsas são verdadeiramente positivas (Figura 9), o que resulta em descarte indevido, em média, de 320 bolsas

anualmente. É importante ressaltar que não são apenas 320 bolsas descartadas indevidamente, uma vez que cada bolsa após processada atende em média quatro pacientes, são mais de mil pacientes que deixam de ser beneficiados, sem contar o dano social de se considerar cerca de 320 doadores sadios como inaptos sorologicamente.

Outra hipótese para a pouca especificidade do teste ELISA atualmente utilizado para triagem sorológica no Brasil, seria que a especificidade dos kits não representam a realidade Brasileira, uma vez que a fabricação dos mesmos é feita na grande maioria fora do Brasil. Apesar do padrão dos genótipos do HCV no Brasil ser semelhante ao encontrado nos EUA e Europa (Medeiros-Filho,2002) as variações entre um mesmo genótipo (quasispécies) podem ser responsáveis por esta diferença.

Outro ponto a ser discutido, seria o número de repetições dos testes ELISA que poderiam ser evitados com a adequação dos kits à realidade Brasileira uma vez que no presente estudo obtivemos 30% de resultados de ELISA inicialmente positivos ou indeterminados que quando retestados apresentaram-se negativos resultando em custo desnecessário para realização das retestagens (Figura 7).

Com relação à distribuição entre os sexos dos candidatos à doação de sangue no HEMOPA, os resultados encontrados, revelaram 72% do sexo masculino e 28% do sexo feminino (Tabela 3), muito semelhante ao que ocorre na maioria dos hemocentros do Brasil , onde a grande maioria dos doadores são do sexo masculino (ANVISA, 2002). No que se refere à preferência do sexo em relação à infecção pelo HCV, não foi encontrado nenhum resultado significativo ($p=0,89$), sendo 11% de indivíduos do sexo masculino positivos e 10% do sexo

feminino, mostrando que a infecção por este vírus não tem preferência por sexo (Tabela 3).

No que se refere à faixa etária, os resultados obtidos no HEMOPA estão de acordo com os encontrados em muitos hemocentros do Brasil, onde a faixa etária mais regularmente encontrada foi a de 18 – 34 anos (55%), seguida pela de 34 – 50 anos (38%) e a menos freqüente de 50 – 65 anos (7%) (Figura 11). No que diz respeito à preferência do vírus por determinada faixa etária, os resultados com PCR positivo foram mais prevalentes nas faixas etárias de 34-50 anos (16,2%) e 50-65 anos (16,7%) do que na faixa de 18-34 anos (6,2%) ($p=0,014$). Estes resultados são esperados, uma vez que o indivíduo com o passar dos anos, ou seja, com tempo de vida maior, aumenta o tempo de exposição ao agente infeccioso. Outro ponto interessante, é que a frequência de doadores na faixa etária entre 18-34 anos (55%) representam a maioria do universo de doadores de sangue da Fundação Hemopa, o que garante uma maior segurança transfusional, uma vez que o vírus C é menos prevalente nesta faixa etária.

6 CONCLUSÃO

As principais conclusões do presente trabalho são:

- As duas amostras encontradas (PCR negativo e PCR positivo) são independentes, tratando-se de duas amostras com comportamento diferentes: uma linear e a outra logarítmica respectivamente.
- Não existe correlação entre carga viral do HCV na PCR com DO/Cut off do ELISA.
- Os testes de imunoensaio enzimático (ELISA) utilizados para triagem sorológica em hemocentros são eficientes, porém pouco específicos tratando-se da realidade Brasileira para o HCV.
- O teste da PCR utilizado como confirmatório tem se mostrado bem eficiente para o HCV.
- Não existe preferência da prevalência do sexo nos portadores do HCV.
- Com relação a faixa etária, o HCV tem certa preferência por faixas mais altas, o que é perfeitamente esperado, uma vez que aumentando o tempo de vida, aumenta-se o tempo de exposição ao agente infeccioso.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária – ANVISA. Hemoprode (2002).

Disponível em: www.anvisa.gov.br .Acesso em: 05 Dez. 2003.

AI-FALEH, F. Z.; AYOOLA, E. A *et al.* Prevalence of antibody to hepatitis C virus among Saudi Arabian children: a community-based study. **Hepatology**, 14: 215-218, 1991

ALTER, M. J. Occupational exposure to hepatitis C virus: a dilemma. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 15(12): 742-744, 1994.

AYOLA, E. A.; HURAIB, S.; ARIF, M *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis C virus; among saudi haemodialysis patients. **Journal of medical virology**, 35: 155-159, 1991.

AYRES, M *et al.* Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Bio Estat 3,0. Belém, Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq. 272p.2003.

BAYER, J. L & REUBEN, A. in: SHIFF1, SHIFF, E.R. Eds. **Diseases** of (he liver. 7th ed, Philadelphia, Lippincott Co.: 586-637, 1993.

BENSABATH, Gilberta *et al*, Hepatites por vírus in: Leão, RNQ. **Doenças Infecciosas e Parasitárias enfoque Amazônico**. Belém: CEJUP, p.303-343, 1997.

BLUMBERG, B. S. *et al*. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrom, leukemia and hepatitis. **Annals os internal Medicine**. Philadelphia, v.66, p.924-931, May, 1967.

BLUMBERG, B. S; ALTER, H. J. ; VISNICH, A. S. "New" antigen in leukemia sera. **Journal of the American Medical Association**. Chicago, v.191, p.541-546, Feb.1965.

BRADLEY, D. W.; McCAUSTLAND, K. A.; COOK, E. H *et al*. Pos-transfuston non-A non-B hepatitis in chimpanzees: psystcochemical evidence that the tubule forming agent is a smoli, enveloped virus. **Gastroenterology** 88: 773-779, 1985.

BRANDÃO-MELLO, C. E. **Contribuição ao estudo da hepatite viral C em hemofílicos**. Rio de Janeiro. 92F...(Tese livre docência)-Escola de Medicina e cirurgia, Universidade do Rio de Janeiro, 1990.

BRANDÃO-MELO, C. E. *et al*. HCV E Hemofilia in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.13, p. 281-289, 2003.

BRANDÃO-MELO, C. E.; BASÍLIO DE OLIVEIRA, C. A & GONZAGA, A. L.
Hepatitis C and Liver Disease in Hemophilia. **Hepatology**, 19(4): 441, 1993.

BRASIL, L.; BRAGA, W *et al.* Prevalência dos genótipos do vírus da hepatite C (HCV) entre diferentes populações de risco no Estado do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop**, 31(supl.I): 32(resumo t-039), 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Programa Nacional de Hepatites Virais. **Hepatites Virais: O Brasil está atento**/Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, Programa Nacional de Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRETTLER, D. B *et al.* The low risk of hepatitis C virus transmission among sexual partners of hepatitis C-infected hemophilic males: na international, multicenter study. **Blood**, 80(2): 540-543, 1992.

CAVALHEIRO, N. P. Prevalência Global de Genótipos in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.13, p. 301-305, 2003.

CDC. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 47(RR-19): 1-39, 1998.

Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará – **HEMOPA**. 2003.

CHOO, Q. L & PINHO, J. R. R. Virologia Molecular. Variabilidade viral in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.1, p. 195-204, 2003.

CHOO, Q. L.; KOU, G *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science** 244: 359-362, Apr. 1989.

CONTE, D *et al.* Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. **Hepatology**, 31(3): 751-755, 2000.

COVAS, D. T. Doenças Infecciosas Transmissíveis por Transfusões Sangüíneas in: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P & PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**, São Paulo: Atheneu, c. 84, p. 977-990, 2001.

De FRANCESCO, R. Molecular virology of the hepatitis C virus. **Hepatology**, 31: 47-53, 1999.

EBELING, F. Epidemiology of the hepatitis C virus. **Vox Sang**, 74: 143-146, 1998.

ESTEBAN, F.L.; ESTEBAN, R.; VILADOMIU, L *et al.* Hepatitis C virus antibodies among risk group in Spain. **Lancet**, 2: 294-297, 1989.

EYSTER, M. E *et al.* Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). **Ann Intern Med**, 115(10): 764-768, 1991.

FERRAZ, M. L. G & OLIVEIRA, P. M. Diagnóstico laboratorial específico in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.3, p. 209-214, 2003.

FOCACCIA, R. Hepatites virais in: Veronesi, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia**. Ateneu, São Paulo, p. 286-383, 1997.

FOCACCIA, R.; BARALDO, D. C. O. M. & SOUZA, F. V. Epidemiologia in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.5, p. 221-229, 2003.

FOCACCIA, R.; BARBOSA, V. A & GALANTE, V. C. Tratamento da hepatite C- Abordagem atual in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 11.4, p. 573-578, 2003.

FUJISAWA, T.; KOMATSU, H.; INUI, A. *et al.* Spontaneous remission of chronic hepatitis C in children. **Eur. J. Pediatr**, 156: 773-776, 1997.

FUKUDA, Y & NAKANO, I. Imunopatogênese in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.2, p. 205-208, 2003.

GARSON, J. A & TEDDER, R. S. The detection of hepatitis C infection. **Rev. Med. Virol.**, 3: 75-83, 1993.

GARSON, J. A *et al.* Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. **Lancet**, 335: 1419-1422, 1990.

GIULIETTI, A.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, B. **Methods** 25, 386-401, 2001.

GONÇALES JR, F. L. Prevenção das Hepatites Pós-Transfusionais. **Rev. Hematologia**, 5: 107-120, 1998.

GROSS Jr., J. B & PERSING, D. H. Hepatitis C: advances in diagnosis. **Mayo Clin. Prod.**, 70: 296-297, 1995.

GRUPO DE ESTUDOS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. **Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil**. Disponível em: www.sbhepatologia.org.br. Acesso em: 12 set. 2003.

GUZ, B.; STRAUSS, E *et al.* Spontaneous disappearance of serum HCV-RNA in chronic hepatitis. **Hepatology**, 30: 203 a, 1999.

HAMERSCHLAK, N. & PASTERNAK, J. **Doenças Transmissíveis por Transfusão**. São Paulo: Andrei, p.23-28, 1991.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG *et al.* **Medical Microbiology**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, p.308-323, 1998.

KATO, N.; OTSUYAMA, Y.; OHKOSHI, S *et al.* Distribution of plural HCV types in japan. **Biochem Biophys Res Commun**, 181: 279-285,1991.

KHUROO, M. H. Study of na epidemic of non-A non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-tranfusion non-A non-B type. **Am. J. Med.** 68: 818-824, 1980.

KINGSLEY, L. A *et al.* Sexual transmission efficiency of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus among homosexual men. **JAMA**, 264(2): 230-234, 1990.

LIU, T. C.; CHANG, T. T *et al.* Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, end ascites. **J Med Virol**, 37: 197-202, 1992.

McOMISH, F.; YAP, P. L.; DOW, B. C *et al.* Geographical distribution of different hepatitis C virus genotypes in blood donors: na international collaborative survey. **J Clin Microbiol**, 32: 884-892,1994.

MEDEIROS-FILHO, J. E. M. Epidemiologia da hepatite pelo vírus C. **Rev. de Gastroenterologia da Fugesp** 19 OUT/NOV/DEZ. 2002. Disponível em: www.fugesp.org.br/Revistas/gastro/gastro19. Acesso em: 12 set. 2003.

Ministério da Saúde. **Relatório Anual da Gerência Geral de Sangue e Hemoderivados (GGSH)**, 1999.

MITSUI, T.; IWANO, K.; MASUKO, K. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. **Hepatology**, 16:1109-1114, 1992.

MIYAMURA, T. & MATSUURA, Y. Structural proteins of hepatitis C virus. **Trends Microbiol**, 1: 229-231, 1993.

MURPHY, E. L *et al.* Risk Factors for Hepatitis C Virus Infection in United States Blood Donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). **Hepatology**, 31(3): 756-762, 2000.

NOROL, F.; ROCHE, B *et al.* Hepatitis C virus infection and allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation**, 57: 393-397, 1994.

OKAMOTO, M.; NISHIZAWA, T.; KATO, N.; UKITA, M.; IKEDA, H.; IZUKA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Molecular cloning characterization of a novel DNA

vírus (TTV) associated with transfusion hepatitis of unknown etiology. **Hepatology** 10:1-16, 1998.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Blood Safety and Clinical Technology Strategy 2000-2003. **WHO/BCT/01.01**, 2001.

PADIAN, N. S.; SHIBOSKI, S. C *et al.* Female-to-male transmission of human immunodeficiency virus. **JAMA**, 266(12): 1664-1667, 1991.

PALTANIN, L. F & REICHE, E. M. V. Soroprevalência de anticorpos antivírus da hepatite C em doadores de sangue, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 36(4): 393-399, 2002.

PEREIRA, B. J. G.; LEVEY, A. S. Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. **Kidney Int**, 51: 981-999, 1997.

PEREIRA, B. J.; MILFORD, E. L *et al.* Prevalence of C Antibody and in the Recipients of Their Organs. **N ENGL J MED**, 327: 910-915, 1992.

PILERI, P.; UEMATSU, Y *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science** 282: 938-941, 1998.

PURO, V.; PETROSILLO, N *et al.* Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and other Bloodborne Infection. **Am J Infect Control**, 23(5): 273-277, 1995.

REZENDE, P. R. *et al.* Sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase para HIV – 1 em relação à técnica de ensaio imunoenzimático. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 24(1): 25-28, 2002.

RUBIN, R. A. Chronic hepatitis C advances in diagnostic testing and therapy. **Arch. Intern. Med.**, 154: 387-392, 1994.

RÜSTER, B *et al.* Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcripti. **Anal. Biochem.**, 224: 597-600, 1995.

SANTORINI, E.; MIGLIACCIO, G. *et al.* Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. **J. Virol**, 68: 3631-3641, 1994.

SHEU, J. C.; LEE, S. H.; WANG, J. J *et al.* Prevalence of anti-HCV and HCV viremia in hemodialysis patients in Taiwan. **Journal of medical virology**, 37: 108-112, 1992.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A. ; ALTER, H. J. A proposed system for the nomenclatura of hepatitis C viral genotypes. **Hepatol** 19: 1321-24, 1994.

STEVEN, K.; HERRINE, M. D *et al.* Epidemiology of hepatitis C viral infection. MSc, Jefferson Medical College, Philadelphia, Pa. **Infect Med**, 16(2): 111-117, 1999.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Med. Trop.** 34(1): 68-82,2001.

STRAUSS, E. História Natural. Fatores de Progressão. Avaliação Prognóstica da HCV crônica in: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**, São Paulo: Atheneu, c. 4.6, p. 231-245, 2003.

SUZICH, J. A.; TAMURA, J. K *et al.* Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside thiphosphated and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. **J. Virol**, 67: 6152-6158, 1993.

TESI, R. J.; WALTER, K *et al.* Transmission of hepatitis C by kidney transplantation: the risks. **Transplantation**, 57: 826-831, 1994.

THOMAS, D. L *et al.* Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. The seroprevalence of and risk factors for hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Arch Intern Med** 153(14): 1705-1712, 1993.

THOMAS, D. L.; VLAHOY, D *et al.* Correlates of hepatitis C virus infection among injection drug users. **Medicine**, 74: 212-220, 1995.

TSAI, S. L.; LIAW, Y. F *et al.* Detection of type 2- like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C chronicity. **Hepatology**, 25: 449-458, 1997.

UMLAUFT, F.; WONG, D. T *et al.* Hepatitis C virus detection by single-round PCR specific for the terminal 3' noncoding region. **J Clin Microbiol**, 34: 2552-2558, 1996.

WATSON, J.D *ET AL.* **O DNA Recombinante**. Tradução de Élio Hideo Babá. Ouro Preto: UFOP, 1997. 646P. Título Original: Recombinant DNA.

WEINER, A. J.; BRAUER, M. J.; ROSENBLATT, J *et al.* Variable and hipervariable domains are founds is the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glicoproteins. **Virology**, 180: 842-848, 1991.

WHO. Hepatitis C-Global Prevalence (update). **Wkly Epidemiol Rec**, 75: 18-19, 2002.

WREGHITT, T. G.; GRAY ALLAIN, J. P *et al.* Transmission of Hepatitis C Virus by Organ Transplantation in the United Kingdom. **J HEPATOL**, 20: 768-772, 1994.

YEUNG, L. T.; KING, S. M *et al.* Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. **Hepatology**, 34(2): 223-229, 2001.

YOUNG, K. K *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polimerase chain reaction assay. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 882-886, 1993.

ZUCKERMAN, A. J. Alphabet of hepatitis viruses. **Lancet** 341: 558-559, 1996.

ANEXOS

ANEXO 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROCESSO Nº 14/2001/CEP/CONEP

Data de entrada 24/09/2001

Data do parecer 13/11/2001

Projeto: O uso da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em doadores de sangue da Fundação HEMOPA, soropositivos para o anti-HCV

Pesquisa Pesquisador responsável: Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos

Instituição responsável UFPA

Patrocinador Fundação HEMOPA

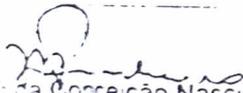
Parecer PROJETO APROVADO

O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical - CEP/NMT, reunido em 26/10/2001 analisou o Protocolo nº 14/2001 do Projeto de Pesquisa denominado "O uso da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em doadores de sangue da Fundação HEMOPA, soropositivos para o anti-HCV, de responsabilidade do pesquisador, professor da UFPA. Dr. Alexandre Lemos verificou que o autor procura cumprir as exigências normativas da CONEP. Entretanto, este Comitê observou a necessidade de haver melhores esclarecimentos sobre a propriedade intelectual do produto, de acordo o item 16.2 da Resolução 196/95 - esclarecer a questão da propriedade intelectual do resultado da pesquisa e recomendamos, de acordo com a Resolução 196/95, que verifique a possibilidade do patenteamento.

O Projeto de Pesquisa denominado "O uso da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em doadores de sangue da Fundação HEMOPA, soropositivos para o anti-HCV, foi examinado por este Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos e observado que o estudo encontrava-se bem estruturado nos seus aspectos metodológicos e éticos. A pesquisa está fundamentada na justificativa de existência de um teste imunológico para a rotina de detecção direta do antígeno HCV que é utilizado atualmente como teste de *screening* para a identificação de anticorpo, não ocorrendo assim um diagnóstico precoce.

A pesquisa deverá gerar com seus resultados a melhora na qualidade dos produtos hemoderivados oferecidos pela Fundação, a partir da verificação da eficácia do uso do teste de PCR em exames confirmatórios do Hepatite C.

Também observou-se que o autor seguiu todas as exigências normativas da Resolução 196 da CNS. Assim sendo, esta Comissão decidiu pela Aprovação Ética do Estudo


Prof.ª M. da Conceição Nascimento Pinheiro
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA

ANEXOS 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: O USO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) EM DOADORES DE SANGUE SOROPOSITIVOS PARA O ANTI-HCV.

ESCLARECIMENTOS DA PESQUISA:

As hepatites são doenças que afetam o fígado de maneira grave, podendo levar a morte. Existem vários tipos de hepatites, as mais encontradas são causadas por vírus (micróbios) como as hepatites A, B e C. A hepatite C afeta no mundo cerca de 200 milhões de pessoas, e uma das maneiras como pode ser passada de uma pessoa para outra é através do sangue contaminado com o vírus HCV (vírus da hepatite C). Muitas pessoas com hepatite C não sabem que estão doente, dessa maneira, não procuram orientação médica e ainda podem passar para outras pessoas. O vírus leva um tempo longo (20 a 30 anos) para dar início a doença que pode ser cirrose (“doença que causa a barriga d’água”) e/ou câncer de fígado.

O **objetivo** deste estudo é comparar dois exames de laboratório (Anti-HCV e PCR) para saber qual deles é melhor para ser usado na seleção de candidatos a doadores de sangue, visando melhorar os níveis de qualidade do sangue fornecido pela Fundação Hemopa. O Anti-HCV e o PCR são exames realizados no sangue do doador, capazes de perceber a presença ou não do vírus da hepatite C. Para a realização do estudo será coletada uma pequena quantidade de sangue (4 ml) no momento da doação. Os **riscos** à saúde do doador são considerados mínimos, quase nulos, uma vez que serão utilizados na ocasião da coleta materiais descartáveis, provenientes de laboratórios com grande controle de qualidade

Em contrapartida, os **benefícios** a saúde serão muitos, uma vez que os resultados desse estudo poderão modificar a rotina da Fundação, aumentando os níveis de segurança da qualidade do sangue por ela fornecido à população. O doador também será beneficiado pelos resultados dos exames laboratoriais realizados durante a pesquisa e caso seja confirmado a presença do vírus no sangue do doador, este será encaminhado ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará para acompanhamento médico gratuito.

Asseguramos que as informações geradas pela entrevista com o doador e os resultados de seus exames serão mantidos em **sigilo**, não permitindo a sua identificação quando da publicação do estudo.

Se porventura, houver algum dano à saúde do doador comprovadamente proveniente desta pesquisa, garantimos o amparo.

Caso haja algum problema ou dúvida quanto a participação na pesquisa os pesquisadores poderão ser contactados através dos seguintes endereços e telefones:

- Dr. Alexandre Lemos – Biomédico
- Dra. Adriana Coelho Pimenta – Farmacêutica-Bioquímica

Fundação Hemopa – Trav. Padre Eutíquio,2109 Laboratório de Biologia Molecular.

Telefones: (91) 242-9100 ramal 244 / 9621-1584 / 226-0943

Informamos ainda que o doador é livre para participar ou não do presente estudo, podendo retirar-se da pesquisa a qualquer momento, sem que haja nenhuma represália por parte dos membros do projeto.

.....
Médica responsável pela triagem

.....
Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Eu,.....

- Declaro que li este termo e concordo em participar deste estudo, permitindo que minha amostra de sangue coletada seja utilizada para esta pesquisa científica;
- Autorizo que meus dados sejam utilizados para publicações científicas assegurando sigilo de dados pessoais;
- Sei que assinarei duas vias deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo que ficarei com uma via e a outra ficará arquivada sob a guarda dos pesquisadores responsáveis.

.....
Doador

Belém/PA...../...../.....

