Marcos Montanha Ramos

***Resultado reagente próximo ao limiar de reatividade:* uma dificuldade no diagnóstico laboratorial da hepatite C**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Programa de Pós-Graduação Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ramos, Marcos Montanha.

Resultado reagente próximo ao limiar de reatividade: uma dificuldade no diagnóstico laboratorial da hepatite C / Marcos Montanha Ramos. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade Medicina de Botucatu, 2010

Orientadora Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientadora: Rejane Maria Tommasini Grotto

Assunto CAPES: 20804008

1. Hepatite C - Diagnóstico

Palavras-chave: CMIA; Resultados Fracamente Reagentes; RT-PCR; Hepatite C; Testes Imunológicos

*Este trabalho é dedicado a todos os
pacientes do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina de Botucatu.*

É com grande satisfação que escrevo esse item de meu trabalho, no qual poderei demonstrar uma pequena parte da gratidão que sinto pelas pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte deste estudo e dos caminhos que me levaram a ele.

- ✓ *Acima de tudo, agradeço a Deus, pelo dom da vida, renovado a cada dia, pela força nos momentos de fraqueza, amor nos momentos de rancor e pela luz que ilumina meus caminhos a cada dia.*
- ✓ *Aos meus pais Idnei e Maria Aparecida pelo incondicional apoio, carinho, dedicação e presença em todas as fases de minha vida.*
- ✓ *À orientadora deste trabalho, Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela dedicação e responsabilidade em nortear este trabalho, um agradecimento especial.*
- ✓ *À co-orientadora deste trabalho, Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, pela presença em horas difíceis e pelo empenho no desenvolvimento deste estudo.*
- ✓ *À Dra. Adriana Polachini do Vale, responsável pela Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas HC-FMB, pelo comprometimento e interesse pelo estudo.*
- ✓ *À Dra Nádia dos Reis Carvalho, responsável pelo Laboratório de Sorologia da Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas HC-FMB e acima de tudo amiga, pela plena e inigualável simpatia, com a qual sempre me ajudou em todos os momentos.*
- ✓ *À Dra Rita Maria Sacomanno Henriques, responsável pelo Laboratório de Sorologia da Divisão Hemocentro de Botucatu, pela disposição e dedicação em todas as horas necessárias.*
- ✓ *À Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.*
- ✓ *À Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas HC-FMB, representada por Dra. Adriana Polachini do Vale, pela estrutura e equipamentos que sempre me foram disponibilizados.*
- ✓ *À Divisão Hemocentro de Botucatu, representada pelos diretores Dr. Paulo Machado e Dr. José Mauro Zanini pelo suporte acadêmico e científico sempre prestado.*
- ✓ *Ao Programa de Pós-Graduação Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica, docentes e amigos, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.*

- ✓ *Ao Laboratório de Sorologia da Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas HC-FMB, representado por Dra. Nádia dos Reis Carvalho.*
- ✓ *Ao Laboratório de Sorologia da Divisão Hemocentro de Botucatu, representado por Dra. Rita Maria Sacomanno Henriques.*
- ✓ *Ao Laboratório de Biologia Molecular da Divisão Hemocentro de Botucatu, representado por Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini.*
- ✓ *À empresa Aimara – Comércio e Representações Ltda, pelas doações oferecidas, pelo suporte comercial e científico e pela amizade.*
- ✓ *À amiga Vera Lúcia Rodrigues João, pelo bom humor diário, pelas palavras de otimismo e pelas técnicas realizadas neste trabalho.*
- ✓ *À amiga Angela A. Dorini, pela paciência com a qual sempre atendeu minhas necessidades e pelas técnicas realizadas neste trabalho.*
- ✓ *À amiga Juliana Lara Padovani, pelo comprometimento e dedicação em realizar e ensinar-me as técnicas de Biologia Molecular.*
- ✓ *Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas, em especial, Nelmara, Talita(Manu), Nádia, Vera, Marina, Adriana, Érika, Paulinha, Regina, Rita e Katia, pelo convívio diário e horas de fundamental apoio.*
- ✓ *Aos amigos da Divisão Hemocentro de Botucatu, em especial, Cléo e Janisse pela inigualável simpatia e a todos dos laboratórios de Sorologia e Biologia Molecular, em particular, Maercio, Lilian, Silvia, Regina e Rô.*
- ✓ *Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação FMB, pelo profissionalismo e simpatia com os quais sempre fui atendido.*
- ✓ *Às bibliotecárias Rose, Meire, Luciana e Selma pelo auxílio na revisão das referências bem como elaboração da ficha catalográfica.*
- ✓ *À Juliana Borges pelo auxílio em informática e compreensão em todos (ou quase todos) os momentos difíceis e de ausência, um agradecimento especial.*
- ✓ *A todos os pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, em especial aos que fizeram parte deste estudo.*

- ✓ *Aos meus irmãos Fábio Montanha e Marcelo Montanha, minhas cunhadas Dirlene e Melissa, minha Tia "Tia Inês" e todos de minha família, pelos momentos de carinho.*
- ✓ *Aos amigos Bruno Mulotto, Renan Leandro, Michelle Vais, Juliana Catarino, Lucas Mioni, Fernando Cunha, Juliana Firmino, Camila Pizoni, Karina Castilho, Aline Santana, Tatiana Zuaresma, Cledja Amorim, Ariany Bolonhezi, Flávia Vacari, Glaucia Cezário, Ludmila, Suzana, Katty, Marcelo, Rita, Carlos, Jackson, Priscila, Natália, Clarice, Bernadete, Julianas, Cristina, Kamila... Pessoas que contribuíram de maneira indireta para a realização deste trabalho, porém, contribuem diretamente com amor e amizade em minha vida.*
- ✓ *A todos que de maneira direta ou indireta, participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.*

Marcos Montanha Ramos

*"Quando achamos que temos todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas."*
Luis Fernando Verissimo

*"A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais volta ao seu tamanho original."*
Albert Einstein

Lista de Figuras

- FIGURA 1** Estrutura esquemática do vírus da hepatite C, evidenciando RNA viral, capsídeo e envelope viral----- 13
- FIGURA 2** Estrutura esquemática da organização do genoma do VHC, evidenciando (a) genoma viral com uma única ORF, (b) a qual é traduzida em uma única poliproteína, que posteriormente é processada originando (c) proteínas estruturais e não estruturais ----- 14
- FIGURA 3** Fluxograma de investigação laboratorial da hepatite C ----- 19
- FIGURA 4** Gráfico da distribuição de frequência dos valores da razão S/CO das 100 amostras reagentes pela metodologia CMIA ----- 25
- FIGURA 5** Gráfico da distribuição de frequência dos resultados detectados e não detectados da RT-PCR pela razão S/CO obtida na CMIA ----- 26

Lista de Tabelas

- TABELA 1** Seqüência de *primers* utilizados para amplificação da região 5'UTR do genoma do VHC. ----- 24
- TABELA 2** Resultados obtidos nos testes imunológicos (CMIA, MEIA e ELISA) para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C em amostras com S/CO entre 1,11 e 6,99 pela CMIA. ----- 27
- TABELA 3** Comparação entre os métodos imunológicos e molecular no diagnóstico da hepatite C, em amostras fracamente reagentes pela metodologia de CMIA. ----- 28

Resumo

O fluxograma de investigação laboratorial da hepatite C, proposto pelo Ministério da Saúde, envolve a utilização de metodologias que pesquisam anticorpos anti-VHC como testes de triagem para a infecção, sendo que os testes moleculares vêm sendo utilizados como confirmatórios mediante sorologia positiva. Neste fluxo, algumas amostras podem apresentar, nos testes de triagem, resultados reagentes próximos ao limiar de reatividade e estes resultados muitas vezes não se confirmam quando se utilizam outras metodologias. Estes resultados falso-positivos podem gerar descarte de bolsas de sangue e consequências psicológicas negativas para doadores e pacientes. Assim, o objetivo deste estudo foi estabelecer valores de corte entre resultados reagentes e fracamente reagentes no diagnóstico laboratorial da hepatite C pelo Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas (CMIA), e avaliar estes resultados com outras metodologias. Foram analisados 2535 resultados anti-VHC por CMIA para a seleção das amostras reagentes independente do valor da razão S/CO. Destas, apenas as amostras com a razão S/CO entre 1,11 e 6,99 por CMIA foram testadas por MEIA, ELISA e RT-PCR. Das 2535 amostras, 100 (3,95%) foram reagentes pela CMIA e destas, a menor frequência foi observada em amostras com a razão S/CO entre 6,00 e 6,99. No mesmo sentido, a detecção do RNA do VHC foi crescente a partir da razão S/CO 7,00 sugerindo uma maior ocorrência de resultados falso-positivos em amostras com valor de S/CO inferior a 7,00. No período do estudo, 56 amostras apresentaram-se reagentes por CMIA com razão S/CO entre 1,11 e 6,99 e 49 (87,5%) delas foram reagentes por MEIA, das quais 25 (44,6%) também foram reagentes por ELISA. Apenas uma amostra apresentou RNA do VHC detectável por RT-PCR. Esses resultados sugerem que os resultados reagentes pelos métodos de triagem com valores próximos ao limiar de reatividade, devem ser avaliados de maneira distinta dos resultados reagentes com maiores valores em relação ao limiar.

PALAVRAS-CHAVE: CMIA, Resultados Fracamente Reagentes; RT-PCR; Hepatite C; Testes imunológicos.

Abstract

Hepatitis C laboratorial investigation, proposed by Ministry of Health, includes anti-HCV tests for screening and molecular methodologies for confirmation of the positive results. Some time the samples can present reagents results near to the cut off and, these results, a lot of times, are not confirmed by other methodologies. False positives results can lead blood units discard and negative psychological consequences for donors and patients. The goal of this study was establish a threshold among resulted reagents and weakly reagents in the hepatitis C laboratorial diagnosis by CMIA, and to evaluate these results with other methodologies. In this study were analyzed 2535 resulted anti-VHC by CMIA for the selection of the reagents samples independent of the S/CO obtained. The samples with S/CO between 1.11 and 6.99 by CMIA were tested by MEIA, ELISA and RT-PCR. From 2535 samples, 100 (3.95%) were reagents for CMIA and the lower frequency it was observed in samples with S/CO between 6.00 and 6.99. In the same sense, the HCV RNA detection was confirmed in samples with S/CO upper than 7.00; suggesting an occurrence of false-positive results in samples with S/CO lower to 7.00. In study period 56 samples were reagents by CMIA with S/CO between 1.11 and 6.99 and 49 (87.5%) were reagents by MEIA, which 25 (44.6%) were also reagents by ELISA. One sample presented HCV RNA detected by RT-PCR. Those results suggest that the reagents results by the screening tests, with S/CO near to cut off should be analyzed with precaution and different of the reagents results with upper S/CO.

KEY-WORDS: CMIA; Results Weakly Reagents; RT-PCR; Hepatitis C; Immunological Tests.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	21
3 Casuística e Métodos	22
3.1 Casuística.....	22
3.2 Delineamento e Metodologias	22
3.2.1 Extração do RNA Viral	23
3.2.2 RT-PCR qualitativo	23
3.2.3 Visualização do produto da RT-PCR	24
4 Resultados e Discussão.....	25
4.1 Definição do valor da razão S/CO de corte entre resultados reagentes e fracamente reagentes para a metodologia CMIA.....	25
4.2 Avaliação dos resultados com S/CO entre 1,11 e 6,99 pela CMIA utilizando outros testes imunológicos e molecular.....	26
Referências	32

1 Introdução

O termo hepatite refere-se a uma inflamação hepática, muitas vezes de etiologia viral. Os sintomas da doença incluem icterícia, urina escura, fadiga, náuseas, vômitos e dores abdominais. Há cinco principais tipos de hepatites virais, denominadas hepatites A, B, C, D e E (WHO, 2009).

Hepatites A e E são causadas tipicamente por ingestão de alimentos ou água contaminada, as do tipo B, C e D geralmente são resultado do contato parenteral com fluidos biológicos infectados (WHO, 2009).

Durante quase duas décadas, todas as hepatites que não puderam ser diagnosticadas por meio de marcadores sorológicos para as hepatites A e B foram designadas hepatites não-A e não-B (NANB). De modo geral, evoluíam em mais de 50% dos casos para formas crônicas sem que se pudesse estabelecer o agente etiológico das mesmas. As formas mais comuns de aparecimento destes quadros de hepatite eram pós-transfusional ou esporádica (Ferreira e Ávila, 1996; Conte, 2000; Gonçalves Jr. et al., 2000).

A grande maioria destas hepatites, aproximadamente 90%, foi posteriormente definida como hepatite C, cujo agente etiológico é o vírus da hepatite C (VHC) (Choo et al., 1989; Ferreira e Ávila, 1996; Conte, 2000; Paltanin e Reiche, 2002), o qual somente foi identificado por Choo e colaboradores em 1989.

Embora a difusão dos testes sorológicos de triagem de bolsas de sangue tenha liderado um declínio significativo na incidência da infecção pelo VHC nos últimos anos, a hepatite C ainda é um dos principais problemas de Saúde Pública no Brasil e no mundo, por ser causa importante de doença hepática em adultos, com elevada taxa de cronificação, evolução para a cirrose e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Uriz e Briz, 2004; Zarife et al., 2006; Oliveira, 2007).

Aproximadamente 170 milhões de pessoas (3% da população mundial) estão infectadas com o VHC. Na maioria dos países a prevalência da infecção é menor que 3%, sendo que, uma alta prevalência, até 15%, é encontrada em países da África e Ásia e superior a 15% no Egito. No Brasil, estima-se que 3,3 milhões de pessoas estejam infectadas

(Campiotto, 2005; Diago, 2007; Diament, 2007; Brasil, 2008a; Centers for Disease Control and Prevention, 2008).

O VHC é um vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, com diâmetro de 55 a 65nm e genoma constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 9.400 nucleotídeos. Por analogia com outros flavivírus, o VHC possui a estrutura clássica icosaédrica na qual se destacam o envelope e o capsídeo que envolve seu genoma (Penin et al., 2004).

Figura 1: Estrutura esquemática do vírus da hepatite C, evidenciando RNA viral, capsídeo e envelope viral (Fonte: Perkins, 2001).

No genoma viral existe uma única fase aberta de leitura (*open reading frame-ORF*), responsável pela codificação de uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, a qual é posteriormente clivada em proteínas estruturais (core, E1 e E2) e não estruturais (NS2, NS3, NS4 e NS5), sendo estas últimas, responsáveis pela replicação viral. A ORF é flanqueada por duas regiões não traduzidas (*Untranslated Region-UTR*) de aproximadamente 341 e 230 nucleotídeos, denominadas 5'UTR e 3'UTR, sendo essas, seqüências de RNA altamente conservadas (Pinho et al., 1995; Bassit et al., 1999; Strauss, 2001; Penin et al., 2004; Cavalheiro et al., 2007).

Figura 2: Estrutura esquemática da organização do genoma do VHC, evidenciando (a) genoma viral com uma única ORF, (b) a qual é traduzida em uma única poliproteína, que posteriormente é processada originando (c) proteínas estruturais e não estruturais (Fonte: Adaptado de Tellinghuissen, 2007).

A proteína core é constituinte do nucleocapsídeo viral e tem sido associada com o desenvolvimento da esteatose por interferir no metabolismo intracelular de lipídios e proteínas (Moradpour et al., 2007). Além disso, têm-se demonstrado que esta proteína interage com várias proteínas celulares, sugerindo-se que esteja envolvida na modulação de vários processos, tais como proliferação, morte e sinalização celular. Tem sido proposto que esta proteína suprime a resposta imunológica do hospedeiro, incluindo a atividade dos linfócitos T citotóxicos por meio da interação com receptores específicos (Penin, 2003).

As glicoproteínas E1 e E2, que são clivadas por proteases do próprio hospedeiro, são componentes do envelope do VHC. Estudos sugerem que estas proteínas seriam responsáveis pela ligação e fusão do vírus aos receptores nas células hospedeiras (Penin, 2003).

Embora a função do peptídeo p7 não esteja completamente definida, sugere-se que este esteja envolvido com a atividade de canal iônico, necessária para a replicação viral (Penin, 2003).

A proteína NS2, em associação com NS3, acelera a própria clivagem em NS2 e NS3. A primeira possui importantes funções, como a inibição da apoptose enquanto NS3 é responsável por eventos de clivagem na região não estrutural da poliproteína. NS4A funciona como um cofator do domínio serino-protease de NS3. NS4B ainda não tem função estabelecida. NS5A tem se destacado devido a seu potencial de resistência ao interferon (INF) enquanto NS5B tem importante participação na replicação viral (Liu et al., 1999, Dumuolin et al., 2003; Erdtmann et al., 2003; Penin, 2003; Penin et al., 2004; Lindenbach et al., 2005; Appel et al., 2006; Moradpour et al., 2007).

A variabilidade genética viral distingue vários genótipos. A classificação utilizada atualmente é a de seis genótipos (1 a 6) e vários subtipos e *quasispecies* (Simmonds et al., 2005). No Brasil, os genótipos 1, 2 e 3 são os mais frequentes, com predominância do genótipo 1 na maioria dos estados (Brasil, 2000).

As principais vias de transmissão são parenteral, transfusão de sangue e hemocomponentes, principalmente em indivíduos transfundidos antes da introdução de testes de triagem para o VHC, utilização de agulhas e seringas contaminadas e transplante de órgãos e tecidos. A transmissão por contato sexual tem sido objeto de estudo de alguns grupos de pesquisa, porém, ainda constitui um assunto controverso que necessita de maiores conhecimentos. Este tipo de transmissão é documentada, mas pouco frequente (Ferreira e Ávila, 1996; Purcell, 1997; Rosemberg, 1999; Strauss, 2001; Ferreira e Silveira, 2004; Valente et al., 2005).

O diagnóstico da hepatite C é realizado pela pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-VHC) ou do próprio RNA viral. A detecção do anti-VHC é o teste de triagem mediante suspeita de hepatite C, evidenciando contato do indivíduo com o vírus, quando reagente. O anti-VHC é detectável no sangue do indivíduo infectado pelos métodos sorológicos utilizados na rotina diagnóstica após 4 a 8 semanas da infecção (Fortes e Ohkawara, 2009). Várias metodologias sorológicas estão disponíveis no mercado para a triagem do anti-VHC no soro ou plasma de indivíduos infectados, entre as quais estão os ensaios imunoenzimáticos, o ensaio imunoenzimático de micropartículas e o imunoensaio quimioluminescente de micropartículas (CMIA).

Os imunoensaios enzimáticos do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) são amplamente utilizados em todo o mundo devido à facilidade metodológica, custo

reduzido e potencial de automação (Pawlosky, 1999). A reação antígeno-anticorpo realizada em placas de poliestireno é revelada com a utilização de anticorpos secundários marcados com uma enzima. A presença de anticorpos no material biológico é revelada pela ação da enzima sobre seu substrato específico, o qual é adicionado à placa, gerando uma reação de oxidação que modifica a cor do sobrenadante. A leitura é realizada utilizando espectrofotômetro ou leitoras automáticas em absorbância no comprimento de onda entre 340 e 650 nm. A absorbância detectada é proporcional a quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra testada (Caron e Flores, 2008).

A tecnologia MEIA (*Microparticle Enzyme Immunoassay*) tem princípio similar ao do ELISA, no entanto, utiliza micropartículas sensibilizadas com antígenos como fase sólida. O número de sítios de ligações de um teste por micropartículas é de 4.000 a 10.000 vezes superior ao do ELISA, o que eleva a sensibilidade e a especificidade do método e reduz o tempo de incubação (Moron et al., 2005).

O imunoensaio quimioluminescente de micropartículas (CMIA), utiliza micropartículas paramagnéticas revestidas com antígeno recombinante de VHC como fase sólida e reação antígeno-anticorpo revelada por quimioluminescência, a qual é mensurada em unidades relativas de luz (RLU). Existe uma relação direta entre a quantidade de anti-VHC presente na amostra e as RLUs detectadas pelo sistema óptico do analisador (Abbott Laboratórios, 2009a).

Os primeiros métodos para a detecção de anticorpos contra o VHC, de 1ª geração, utilizavam a fração antigênica c100-3 da região não-estrutural NS4 do genoma viral, os quais foram rapidamente abandonados devido à falta de sensibilidade e especificidade. Os de 2ª geração, além da fração c100-3, incorporavam as frações c33c (NS3) e c22-3 (core). A partir do início de 1993, surgiram os métodos de 3ª geração contendo frações antigênicas das regiões não-estruturais NS3, NS4 e NS5 e da região estrutural (core). Além disso, a maioria dos testes de 3ª geração substitui algumas frações antigênicas tais como c100-3 e c33c por peptídeos sintéticos correspondendo aos epítomos imunodominantes dessas frações, elevando assim a especificidade do teste (Ferreira e Ávila, 1996; Souto et al., 2002, Alquezar, 2009).

Apesar da grande evolução obtida em relação ao aprimoramento metodológico e sensibilidade dos testes de 1ª geração aos testes de 3ª geração, resultados falso-negativos ainda constituem um problema, principalmente devido à janela imunológica. Por outro lado,

em populações de baixo risco, estes testes possuem baixo valor preditivo positivo, gerando significativa porcentagem de resultados falso-positivos em indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus (Souto et al., 2002; Gonçalves Jr, 2007).

Assim, as tecnologias baseadas em ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Testing-NAT*) permitiram a detecção direta do RNA do VHC, possibilitando a identificação de indivíduos infectados com níveis, até então, indetectáveis de anticorpos contra o vírus e tornando, desta forma, o resultado mais seguro e confiável. A efetividade dos testes NAT foi observada em vários países, como os Estados Unidos, Canadá, Austrália, Alemanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça, nos quais foi possível a detecção de ácidos nucleicos virais em amostras de doadores de sangue negativas nos testes sorológicos convencionais (Stramer et al., 2004). Além disso, tecnologias baseadas em ácidos nucleicos vêm sendo extremamente úteis no diagnóstico da infecção e monitoramento clínico da hepatite C crônica (Dhumeaux et al., 1997; NIH, 1997).

Um dos testes qualitativos mais utilizados para detecção do RNA do VHC é a Reação em Cadeia da Polimerase, precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) a qual pode detectar amostras positivas com até, aproximadamente, 50 cópias de RNA/mL, revelando uma sensibilidade analítica altamente superior aos ensaios imunológicos (Brandão-Mello et al., 2001).

Quando consideradas as metodologias baseadas em ácidos nucleicos, a região genômica 5'UTR vem sendo largamente utilizada em testes diagnósticos, principalmente por ser altamente conservada quanto a sequência de nucleotídeos, uma vez que é essencial na replicação viral (Corbet et al., 2003, Lindebach et al., 2005, Simmonds et al., 2005). Mais recentemente, foi proposta a tecnologia que tem como alvo a região *X-tail* do HCV, com sensibilidade e especificidade semelhantes às aquelas que utilizam a região 5'UTR como alvo molecular (Drexler et al., 2009).

Mesmo depois do advento dos testes moleculares no Brasil, os exames imunológicos de detecção do anti-VHC são considerados testes de escolha na triagem e, quando reagentes, indicam infecção pelo VHC. No entanto, estes testes não definem se a infecção é aguda, crônica ou se ocorreu o clareamento viral (Brasil, 2008b). Alguns pacientes podem sofrer o processo chamado de *clareamento do vírus*, no qual o vírus se limita aos hepatócitos ou a viremia é inferior ao limite de detecção dos testes utilizados. Nestes casos, o

RNA viral circulante torna-se não detectável, enquanto testes imunológicos são capazes de detectar anticorpos circulantes devido ao processo chamado de *cicatriz sorológica* (Ferreira e Ávila, 1996).

Dessa forma, os testes moleculares se inserem no contexto complementar aos sorológicos, ou seja, quando o exame de triagem apresenta-se não reagente e a clínica do paciente indica infecção, pode ser realizada a pesquisa do RNA viral por técnicas moleculares (Brasil, 2008b).

Além disso, pesquisa qualitativa de RNA do VHC deve ser realizada depois do diagnóstico de infecção, resultado que indicará se o paciente apresenta cura espontânea, e nesse caso não deverá ser tratado, ou infecção crônica, estando indicado o tratamento em serviço especializado (Brasil, 2008b).

Para pacientes que apresentam resultado do teste imunológico anti-VHC reagente com resultado do teste molecular RNA-VHC não detectado, é recomendada a realização de novo exame RNA-VHC após o período de 6 meses, para que se confirme a ausência da viremia (Brasil, 2005).

Por outro lado, a hepatite C aguda é confirmada pelo exame sorológico anti-VHC reagente com intervalo mínimo de 90 dias após o início dos sintomas, data da exposição ou anti-VHC não reagente, e, quando o VHC-RNA é detectado, também está indicado tratamento (Brasil, 2008b).

Desta forma, a investigação laboratorial do VHC, segundo protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde, deve ser efetuada de acordo com o fluxograma abaixo:

Figura 3: Fluxograma de investigação laboratorial da hepatite C (Fonte: Brasil, 2008b).

Assim, o fluxograma proposto para diagnóstico e avaliação de tratamento em portadores da hepatite C deve considerar a definição de resultados reagentes e não reagentes. No diagnóstico laboratorial de rotina, existem alguns parâmetros utilizados na validação dos ensaios sorológicos que envolvem validação intrínseca (sensibilidade, especificidade e eficiência) e extrínseca (reprodutibilidade, acurácia e precisão). O resultado de um teste imunológico reflete uma probabilidade de uma situação clínica do paciente no momento em que a amostra foi coletada (Ferreira e Moraes e Beck, 2007).

Todo teste imunológico apresenta um limiar de reatividade (*cut off*), ou seja, um valor acima do qual os resultados são considerados reagentes e abaixo do qual são considerados não reagentes (Ferreira e Ávila, 1996).

Neste contexto, na rotina laboratorial algumas amostras podem apresentar resultados reagentes próximos ao limiar de reatividade. Estudos anteriores já demonstraram discordância entre testes de triagem para detecção de anticorpos anti-VHC, por diferentes metodologias como CMIA, MEIA e ELISA (Gonçales et al., 2000, Souto et al., 2002, Vogler et al., 2004, Venturim, 2007).

Resultados falso-positivos podem gerar descarte de bolsas de sangue e consequências psicológicas para doadores. O mesmo desconforto psicológico pode ser vivido

pelo paciente até que se confirme ou não, o resultado da presença do VHC (Garcia et al., 2008).

Dentro desta realidade laboratorial, a proposta deste estudo é estabelecer valores de corte entre resultados reagentes e fracamente reagentes no diagnóstico laboratorial da hepatite C, realizado através do Imunoensaio Quimioluminescente por Micropartículas (CMIA), bem como, avaliar estes resultados com outras metodologias imunológicas e molecular.

2 Objetivos

- Determinar um valor de corte da razão S/CO para resultados reagentes e fracamente reagentes pela metodologia CMIA.

- Avaliar resultados fracamente reagentes pela CMIA com outras metodologias imunológicas para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C (MEIA e ELISA), bem como com os obtidos pela pesquisa do RNA do VHC pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR).

3 Casuística e Métodos

3.1 Casuística

Para se definir a casuística deste estudo, foram analisados 2535 resultados do exame anti-VHC por CMIA, de amostras provenientes de pacientes com solicitação médica para o referido teste no período de 07 de abril a 04 de agosto de 2009, obtidos no Banco de Dados da Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas, do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Deste universo amostral, foram selecionados os resultados reagentes, independente do valor da razão S/CO obtida, com a finalidade de definir um valor de corte entre os resultados reagentes e fracamente reagentes.

Dos resultados reagentes foram selecionados para a inclusão no estudo apenas aqueles que apresentavam solicitação médica para a pesquisa do RNA do VHC no mesmo período, resultados obtidos no Banco de Dados do Laboratório de Biologia Molecular, Divisão Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, ponto executor da Rede Estadual de Hepatites Virais.

A partir dos resultados obtidos nesta primeira fase, para a execução deste estudo foram incluídas 56 amostras de pacientes com solicitação médica para a realização do exame anti-VHC para fins diagnósticos. Destas, 31 do período já referido e 25 de um período anterior, seguindo os mesmos padrões de triagem. Foi considerado critério de inclusão: índice de leitura da sorologia anti-VHC entre 1,11 e 6,99 S/CO, pelo método de CMIA. Os valores de referência para a CMIA de S/CO são: resultados inferiores a 0,9 são considerados não reagentes, entre 0,9 e 1,1 indeterminados e superiores a 1,1 reagentes.

Este Projeto recebeu parecer favorável pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP em 06 de abril de 2009 (Ofício nº 102/09-CEP).

3.2 Delineamento e Metodologias

Depois da triagem do anti-VHC por CMIA, o material excedente da coleta realizada no paciente foi fracionado em três alíquotas. Duas delas foram destinadas à realização da triagem do VHC pelas metodologias MEIA e ELISA, sendo armazenadas em

freezer -20°C e a terceira alíquota destinada à pesquisa do RNA do VHC por RT-PCR, sendo adequadamente armazenada em freezer -70°C.

Os testes MEIA e CMIA foram realizados na Seção Técnica de Laboratórios e Análises Clínicas (SLAC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, enquanto que o ELISA foi realizado no Laboratório de Sorologia e, a RT-PCR no Laboratório de Biologia Molecular, ambos na Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

A triagem do anti-VHC por MEIA, CMIA e ELISA foi realizada utilizando os kits comerciais *AxSYM HCV 3.0* (Abbott Diagnostics), *Architect Anti-HCV* (Abbott Diagnostics) e *Murex anti-HCV versão 4.0* (Abbott Diagnostics), respectivamente. Todas as metodologias foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante.

A detecção do RNA do VHC por RT-PCR utilizou o Kit comercial *AMPLICOR Hepatitis C Virus (HCV) Test*, versão 2.0 (ROCHE Diagnostics®), de acordo com as especificações do fabricante e/ou a tecnologia *in house* descrita a seguir.

3.2.1 Extração do RNA Viral

A extração do RNA viral a partir do soro, foi realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

3.2.2 RT-PCR qualitativo

A retrotranscrição foi realizada utilizando *High Capacity kit* (Applied Biosystems®) segundo as especificações do fabricante.

A região genômica do VHC 5'UTR foi amplificada por Nested-PCR utilizando uma mistura de reação contendo 1X *Buffer* (LGC Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂ (LGC Biotecnologia), 0,4mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 0,2μM de cada *primer*, 2,5U de *Easy Taq DNA polimerase* (LGC Biotecnologia – 5U/μL) num volume total de reação de 50μL. Na primeira reação utilizou-se 100ng de cDNA e na segunda reação (*Nested-PCR*) 5μL do produto amplificado na primeira PCR. As condições de ciclagem foram 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1minuto, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos. A tabela 1 mostra as seqüências dos *primers* utilizados,

bem como a fase de amplificação em que cada *primer* foi utilizado (Primeira PCR ou *Nested-PCR*). Em todas as reações de RT-PCR foram realizados controles negativos (mistura de reação com água no lugar de RNA) e positivos (mistura de reação com RNA do VHC).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados para amplificação da região 5'UTR do genoma do VHC.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Reação	Posição*	Referência
PTC1	CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC	1ªPCR	81-100	Garson <i>et al.</i> , 1990
NCR2	ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT	1ªPCR	323-351	Garson <i>et al.</i> , 1990
PTC3	AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG	<i>Nested-PCR</i>	99-118	Garson <i>et al.</i> , 1990
NCR4	CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT	<i>Nested-PCR</i>	288-313	Garson <i>et al.</i> , 1990

* Posição de acordo com a sequência VHC-1 (nº de acesso no *GenBank*: M62321)

3.2.3 Visualização do produto da RT-PCR

Os resultados das reações de *Nested-PCR* foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%, com 0,25ng/μL de brometo de etídio, a 100V por 40 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A revelação foi realizada mediante exposição do gel à luz UV, sendo consideradas positivas, amostras que exibiram bandas de aproximadamente 214pb, correspondendo a região amplificada da região 5'UTR, com base no marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100pb (LGC Biotecnologia®).

4 Resultados e Discussão

4.1 Definição do valor da razão S/CO de corte entre resultados reagentes e fracamente reagentes para a metodologia CMIA.

Na primeira fase do estudo, dos 2535 resultados, 100 (3,95%) foram reagentes por CMIA. A figura 4 mostra a distribuição de frequências dos valores S/CO destas amostras reagentes.

Figura 4: Gráfico da distribuição de frequência dos valores da razão S/CO das 100 amostras reagentes pela metodologia CMIA

Pela análise da figura 4, nota-se uma menor frequência no valor da razão S/CO entre 6,00 e 6,99, sugerindo que este intervalo possa ser considerado um valor de corte entre resultados reagentes e fracamente reagentes.

Destas amostras, 79 apresentavam solicitação médica para a pesquisa do RNA do VHC por RT-PCR, das quais 28 (35,5%) foram RT-PCR não detectadas e 51 (64,5%) detectadas. A figura 5 mostra os resultados obtidos na RT-PCR pelo valor da razão S/CO obtido na CMIA.

Figura 5: Gráfico da distribuição de frequência dos resultados detectados e não detectados da RT-PCR pela razão S/CO obtida na CMIA

D: Detectado; ND: Não detectado

Pela análise da figura 5, percebe-se que a detecção por Biologia Molecular do RNA do VHC é crescente a partir do valor de S/CO entre 7 e 8, sugerindo uma maior ocorrência de resultados falso-positivos em amostras com valores S/CO inferiores a 7.

Desta forma, como não existem estudos anteriores que estabeleçam este valor de corte de S/CO por CMIA entre amostras reagentes e fracamente reagentes, os resultados aqui obtidos, sugerem que para esta metodologia podem ser considerados resultados fracamente reagentes, amostras com a razão S/CO inferior a 7.

4.2 Avaliação dos resultados com S/CO entre 1,11 e 6,99 pela CMIA utilizando outros testes imunológicos e molecular.

Depois de estabelecido o valor de S/CO de corte entre os resultados reagentes e fracamente reagentes, das 56 amostras analisadas com S/CO entre 1,11 e 6,99 por CMIA, 49 (87,5%) foram também reagentes por MEIA e 25 (44,6%) por ELISA. As 25 amostras reagentes por ELISA estão incluídas entre as 49 reagentes por MEIA. A concordância entre as metodologias imunológicas utilizadas estão representadas na tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos nos testes imunológicos (CMIA, MEIA e ELISA) para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C em amostras com S/CO entre 1,11 e 6,99 pela CMIA.

CMIA	MEIA	ELISA	TOTAL
R	R	R	25 (44,64%)
R	R	NR	24 (42,86%)
R	NR	NR	7 (12,50%)
R	NR	R	0 (0%)

CMIA: Ensaio Quimioluminescente de Micropartículas; MEIA: Ensaio Imunoenzimático de Micropartículas; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; R: Reagente; NR: Não Reagente.

Pela análise da tabela 2, nota-se que houve discordância entre os resultados obtidos pelas metodologias imunológicas, o que define uma modificação na classificação de amostras reagentes para não reagentes, na dependência da metodologia empregada.

O resultado aqui obtido é corroborado por outros estudos. Em um estudo envolvendo 8942 doadores de sangue, triados pela metodologia de CMIA, 62 apresentaram resultados reagentes e, após repetição do teste, 59 mantiveram a reatividade. Destes, apenas 28 (47,46%) confirmaram a reatividade por teste confirmatório (*imunoblot*). O mesmo estudo mostra que em um total de 1500 pacientes hospitalares, 100 apresentaram resultados reagentes, dos quais 99 mantiveram a reatividade após repetição e 88 (88,99%) foram confirmados por teste confirmatório (Abbott Laboratórios, 2009a).

No mesmo sentido, outro estudo, utilizando a metodologia MEIA, analisou amostras com substâncias interferentes na pesquisa anti-VHC (presença de Epstein-Barr vírus, vírus da hepatite B, HIV, citomegalovírus, vírus herpes simples, rubéola, toxoplasmose, sífilis, entre outros) e amostras de pacientes com risco elevado para infecções transmissíveis pelo sangue (hemofílicos, drogas intravenosas, homossexuais e pacientes em diálise). Do primeiro grupo, das 230 amostras testadas, 24 apresentaram resultado reagente, dos quais 21 (87,50%) foram confirmados por métodos suplementares (*Imunoblot*). Do segundo grupo, das 298 amostras, 162 foram reativas e 152 confirmadas como reativas por método confirmatório (Abbott Laboratórios, 2009b).

Outro estudo, utilizando a metodologia ELISA, também mostrou resultado similar aos aqui descritos. Das 8835 amostras triadas, 16 foram consideradas reativas, 11 foram repetidamente reativas e nenhuma foi confirmada por métodos suplementares. O mesmo

estudo mostra que de um total de 69 amostras reativas por métodos complementares, todas foram também reativas pelo método ELISA (Abbott Laboratórios, 2009c).

Vogler e colaboradores, em 2004, analisaram 183 amostras reativas pelo MEIA, das quais 78,7% foram também reativas pelo ELISA. No presente estudo, resultados semelhantes foram observados, o número de resultados reagentes por MEIA foi maior do que por ELISA.

Quando os resultados obtidos pela RT-PCR foram incluídos na análise, das 56 amostras (inicialmente reativas, com valores próximos ao limiar de reatividade) apenas uma (1,79%) apresentou RNA do VHC detectável no soro. A análise comparativa das metodologias imunológicas e moleculares está apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre os métodos imunológicos e molecular no diagnóstico da hepatite C, em amostras fracamente reagentes pela metodologia de CMIA.

		RT-PCR			
		ND		D	
MEIA \ ELISA					
	R	NR	R	NR	
	R	NR	R	NR	
R	25	23	0	1	
NR	0	7	0	0	

R-reagente; NR-não reagente; D- detectado; ND- não detectado.

Em relação aos métodos moleculares, das 22 amostras que foram realizadas pelo método comercial de detecção do RNA viral (*AMPLICOR Hepatitis C Virus (VHC) Test*, versão 2.0 - ROCHE) e *in house*, já descrito, não houve discordância entre os resultados.

Echevarria e colaboradores em 2005 mostraram que os ensaios imunológicos por CMIA, automatizados pelo analisador ARCHITECT®, apresentam uma considerável melhoria de sensibilidade em relação a outros testes, inclusive para amostras com resultados próximos ao limiar de reatividade. No presente estudo, das 56 amostras com resultados próximos ao limiar de reatividade, utilizando esse mesmo teste, apenas uma apresentou RNA detectável, sugerindo que o aumento da sensibilidade do teste pode ter ocorrido em detrimento da especificidade.

Quando se considera a RT-PCR como metodologia padrão ouro para amostras fracamente reagentes, os testes imunoenzimáticos superestimam os resultados, gerando um grande número de falso-positivos (Carneiro et al., 2001; Vogler et al., 2004; Garcia et al., 2008; Kesli et al, 2009).

De maneira semelhante, no presente trabalho também foi observado que os testes imunológicos superestimaram os resultados, gerando grande número de resultados falso-positivos, o que acaba resultando em descarte de bolsas de sangue não contaminadas e em consequências psicológicas para esses doadores. O mesmo desconforto psicológico pode ser vivido pelo paciente até que se confirme, ou não, a presença do VHC.

Discordâncias entre os resultados obtidos por métodos imunológicos e moleculares já foram relatadas por outros autores. No entanto, estes estudos encontraram uma discordância entre os dois métodos inferior ao observado neste estudo (Carneiro et al., 2001; Vogler et al., 2004; Garcia et al., 2008; Kesli et al, 2009).

Kesli e colaboradores relataram que 47,79% das amostras estudadas foram detectadas por RT-PCR e reagentes por métodos imunológicos. Do mesmo modo, Garcia e colaboradores, encontraram 34,70% das amostras nesta situação, Vogler e colaboradores 67,30% e Carneiro e colaboradores 57,30%. Neste trabalho a porcentagem encontrada foi 1,79%. No entanto, é importante lembrar que o critério de inclusão foi amostras reativas com valores próximos ao limiar de reatividade, nas quais, a probabilidade de resultados falso-positivos é maior.

No mesmo contexto, quando resultados obtidos por métodos moleculares são considerados padrão ouro, um estudo mostrou que entre os métodos CMIA, MEIA e ELISA, a melhor correlação foi obtida quando se utilizou MEIA (Venturim, 2007). Em contraposição, os resultados apresentados por este trabalho mostram que entre os três métodos imunológicos avaliados, o que apresentou menor porcentagem de resultados falso-positivos, para esse tipo de amostra, seguindo como padrão os resultados moleculares, foi o ELISA.

Os resultados apresentados devem ser observados com cautela, uma vez que o método molecular foi considerado o padrão ouro. É importante lembrar que algumas vezes o resultado não detectado na RT-PCR não significa ausência do vírus. Os pacientes com anti-VHC reagente e RNA-VHC não detectado podem ter apresentado o denominado clareamento

do vírus (Corrao e Aricoo, 1998) ou, após tratamento adequado, ter demonstrado uma resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, ausência de RNA viral circulante no sangue após 6 meses de tratamento (Marcellin, 1997).

Outros fatores também devem ser considerados na observação dos resultados obtidos neste estudo. Atualmente, segundo o fluxograma de investigação laboratorial da hepatite C no Brasil, as amostras com resultado reagente para o teste de triagem anti-VHC devem ser encaminhadas a serviços especializados para a pesquisa do RNA viral (Brasil, 2008b). De acordo com o consenso da sociedade brasileira de hepatologia, sobre condutas nas hepatites virais B e C, os pacientes que apresentam resultado do teste imunológico anti-VHC reagente e resultado do teste molecular RNA-VHC não detectado, devem realizar novo exame RNA-VHC após o período de 6 meses, para que se confirme a ausência da viremia.

Desta forma, para a resolução das amostras com resultados de S/CO entre 1,11 e 6,99 por CMIA, seguindo o preconizado no Brasil pelo Ministério da Saúde e Sociedade Brasileira de Hepatologia, seria necessário um maior investimento financeiro e uma maior demanda de tempo para a obtenção do diagnóstico laboratorial final.

No atual contexto nacional e mundial, em que a hepatite C se apresenta como grave problema de saúde pública, sabendo do grande número de resultados falso-positivos gerados pelos métodos de triagem, bem como do alto custo dos testes moleculares confirmatórios, os dados apresentados por este trabalho sugerem que, frente ao algoritmo apresentado pelo Ministério da Saúde para a investigação laboratorial da doença, os resultados reagentes pelos métodos de triagem, com valores próximos ao limiar de reatividade, deveriam ser avaliados de maneira distinta dos resultados reagentes com maiores valores em relação ao limiar, já que no presente estudo, apenas 1,79% dessas amostras teve sua reatividade confirmada por método molecular. Esse fato mostra que 98,21% dessas amostras apresentaram resultados falso-positivos pelo método imunológico de triagem ou clareamento do vírus, tornando o RNA indetectável na circulação, portanto, pode-se dizer que houve um gasto elevado e desnecessário com o acompanhamento destes pacientes através de métodos moleculares.

Desta forma, alternativas na investigação laboratorial deste tipo de amostra devem ser propostas a fim de acelerar o processo diagnóstico, minimizando a expectativa do

paciente, ou doador, bem como reduzindo o investimento financeiro para a resolução destes casos.

Neste sentido, este estudo pode ser ampliado testando as referidas amostras com a metodologia *imunoblot* com a finalidade de verificar sua eficiência como exame complementar aos ensaios imunológicos de triagem, antecedendo os testes moleculares.

Imunoblots são técnicas para detecção de anticorpos contra diferentes proteínas codificadas pelo VHC e têm sido amplamente utilizadas nos últimos anos, pela sua boa sensibilidade e especificidade (Chiron Corporation, 1993 e Flores, 2009).

Estudos mostraram que este método foi capaz de identificar grande porcentagem dos resultados falso-positivos pelos métodos imunológicos de triagem, reduzindo o número de amostras encaminhadas a serviço especializado para a realização do teste molecular, conduzindo a um diagnóstico mais rápido e menos dispendioso financeiramente (Dufour et al., 2003; Barreto et al., 2008).

A utilização deste teste também possibilitaria a distinção entre resultados falso-positivos e pacientes com clareamento viral, pois, por ter como alvo regiões protéicas virais, este teste também se mostra positivo mesmo quando o RNA do VHC é não detectado.

Referências

ABBOTT LABORATÓRIOS. ARCHITECT Anti-HCV, 6C37XXR04R03, *Tabela II- Reatividade do Ensaio ARCHITECT ANTI-HCV em Amostras de Doadores de Sangue Total, Doadores de Plasmaferese, Pacientes Hospitalares, Indivíduos em Condições Médicas Não Relacionadas à Infecção por HCV e em Amostras Contendo Substâncias Potencialmente Interferentes*. p.8 (Manual de Instrução de Uso), 2009a.

ABBOTT LABORATÓRIOS b. AxSYM HCV 3.0 , BR 3B44XXR09R03, *Tabela 2- Detecção de Anticorpo para HCV em Amostras de Soro e Plasma Humano de Doadores Aleatórios de Sangue e Pacientes Hospitalizados (Frescas e Congeladas)*. p.6 (Manual de Instrução de Uso), 2009b.

ABBOTT LABORATÓRIOS c. Murex anti-HCV (versão 4.0), D07VK47GB, *Características Específicas de Desempenho*. p.6 (Manual de Instrução de Uso), 2009c.

ALQUEZAR, A.S. *Triagens sorológicas em unidades hemoterápicas*. Boletim COSAH, Coordenação de Sangue e Hemoderivados. Disponível em: <http://www.hemonline.com.br/artigos_publicacao.php?id=2> Acesso em 14/Dez/2009

APPEL, N. et al. From structure to function: New insights into hepatitis C virus RNA replication. *J. Bio. Chem.*, v.281, n.98, p. 33-36, 2006.

BARRETO, A.M.E.C. et al. Cost-effective analysis of different algorithms for the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.41, n.2, p.126-134, 2008.

BASSIT, L. et al. Chronic hepatitis C virus infections in Brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.41, n.3, p.183-189, 1999.

BRANDÃO-MELLO, C.E. et al. Hepatitis C and liver disease in Hemophilia. *Hepatology*. p. 441-3, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância Epidemiológica: Hepatites Virais, Normas e Instruções*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde São Paulo, 2000.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Hepatologia. *Consenso sobre conduta nas hepatites virais B e C*, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Hepatite C é tema de Palestra*. Bahia, 2008. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/noticias/noticia.asp?NOTICIA=4786>>.

Acesso em: 29/Ago/2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Hepatites Virais: o Brasil está atento*. Brasília: Ministério da Saúde, 2008b.

CAMPIOTTO, D. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.38, n.1, p.41-49, 2005.

CARNEIRO, M.A.S. et al. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patient in central Brazil: a survey by polimerase chain reaction and serological methods. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.6, p.765-769, 2001.

CARON, L.; FLORES, E. *DNA Diagnóstico Viroológico*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2008. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/sv/tecnicas.html>>. Acesso em: 24 out. 2008.

CAVALHEIRO, N.P. et al. Detection of HCV by PCR in serum and PBMC of patients with hepatitis C after treatment. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.11, n.5, p.471-474, 2007.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Travelers' Health Topics*. Atlanta, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/travel/yellowBookCh4-HepC.aspx>> Acesso em: 29 ago. 2008.

CHIRON CORPORATION. *Chiron RIBA HCV 3.0 SAI* – Ficha Técnica do Fabricante Chiron. São Paulo, 1993.

CHOO, Q.L. et al. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v.244, n.4902, p.359-362, 1989.

CONTE, V.P. Hepatite Crônica por Vírus C – Parte 1.Considerações gerais. *Arq. Gastroenterol.*, v.37, n.3, p. 187-193, 2000.

CORBET, S. et al. Hepatitis C Virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use determining subtype distribution among Danish patients. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.3, p.1091-100, 2003.

CORRAO, G. e ARICOO, S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and consumption on the risk of symptomatic liver-cirrhosis. *Hepatology*. p.27: 914, 1998.

DHUMEAUX, D.; DOFFOEL, M.; GALMICHE, J.P. A French consensus conference on hepatitis C: screening and treatment. *J. Hepatol.*, v.27, n.5, p.941-944, 1997.

DIAGO, M. Transmisión de la hepatitis C. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, v.99, n.6, p.309-314, 2007.

DIAMENT, D. Epidemiological aspects of hepatitis C in Brazil. *Braz. J. Infec. Dis.*, v.11, n.1, p.6-7, 2007.

DREXLER, J.F. et al. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. *Journal Plos Medecine* v.6. fev.2009.

DUFOUR, D. R. et al. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: An important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin. Chem.*, v.49, n.3, p.479-486, 2003.

DUMMUOLIN, F. L. et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*, v.305, n.2, p.260-266, 2003.

ECHEVARRIA, J. M. et al. Sensitivity of a modified version of the ARCHITECT anti-HCV test in detecting samples with immunoblot-confirmed, low-level antibody to hepatitis C virus. *J. Clin. Virol.*, v.35, n.4, p.368-372, 2005.

ERDTMANN, L. et al. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor for CIDE- β -induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.20, p.18256-18264, 2003.

FERREIRA, A.W.; ÀVILA, S.L.M. *Diagnóstico Laboratorial*. Avaliação de Métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias autoimunes. Correlação clínico-laboratorial. Ver. Inst. Med. Trop. São. Paulo, v.38, n. 4, p. 264, 1996.

FERREIRA, A.W.; MORAES, S.L.; BECK, S.T. *Imunoensaios: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

FERREIRA, C.T.; SILVEIRA, T.R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, n.4, p.473-487, 2004.

FLORES, E.F. Diagnóstico Viroológico: *Imunoblots*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/sv/tecnicas.html>> Acesso em: 16 Fev. 2009.

FORTES, E.M.; OHKAWARA, L.E. *Hepatites*. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dmed/gastro/hepatite/hep_c.htm> Acesso em: 12 Out.2009.

GARCIA, F.B. et al. Importância dos testes sorológicos de triagem e confirmatórios na detecção de doadores de sangue infectados pelo vírus da hepatite C. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.30, n.3, p.218-222, 2008.

GARSON, J.A. et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *The Lancet*. v.335, n.8703, p.1419-1422, 1990.

GONÇALES Jr. F.L. et al. Hepatitis C Virus in Monozygotic twins. *Rev. Inst. Med. Trop. São. Paulo*, v.42, n.3, p163-165, 2000.

GONÇALES Jr., F.L. Laboratory testing for Hepatitis C. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.11, n.1, p.22-24, 2007

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

KESLI, R. et al. Evaluation and comparison of three different anti-hepatitis C virus antibody tests based on chemiluminescence and enzyme-linked immunosorbent assay methods used in the diagnosis of hepatitis C infections in Turkey. *J. Int. Med. Res.*, v.37, n.5, p.1420-1429, 2009.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, v.436, p.933-938, 2005.

LIU, Q. et al. The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biophys. Res. Commun.*, v.254, n.3, p.572-577, 1999.

MARCELLIN, P. et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann. Intern. Med.*, v.127, n.10, p.875-881, 1997.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.5, p.453-463, 2007.

MORON, A.F. et al. Efeitos dos contraceptivos hormonais orais de baixa dosagem estrogênica nas taxas de folato intra-eritrocitário. Rio de Janeiro: *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, ago. 2005.

NIH-National Institutes of Health. *Management of Hepatitis C*. Bethesda: National Institute of Health - Consensus Statement Online, 1997. Disponível em:<
(http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/105/105_statement.htm)> Acesso em: 14 mar. 2009.

OLIVEIRA, U.B. Hepatitis C virus perinatal transmission. *Braz. J. Infec. Dis.* v.11, n.1, p.10-11, 2007.

PALTANIN, L.F.; REICHE, E.M.V. Soroprevalência de anticorpos antivírus da hepatite C em doadores de sangue, Brasil. *Rev. Saúde. Pública*, v.32, n.4, p.393-399, 2002.

PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C. *J. Hepatol.*, v.31, n.1, p.71-79, 1999.

PENIN, F. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin. Liver. Dis.*, v.7, n.1, p.1-21, 2003.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, v.39, p.5-19, 2004.

PERKINS, J.A. Estrutura esquemática do vírus da hepatite C. Disponível em: <<http://faculty.ksu.edu.sa/5115/Pictures%20Library/HCV%20model.jpg>> Acesso em 04.fev.2010.

PINHO, J.R et al. Estrutura dos vírus das hepatites. In: DA SILVA L.C., (Ed.). *Hepatites agudas e crônicas*. 2. ed. São Paulo: Sarvier. p.9-25, 1995.

PURCELL, R.H. The hepatitis C virus: overview. *J. Hepatol.* v.26, n.3, p.11S-4S, 1997.

ROCHE DIAGNOSTICS. AMPLICOR Hepatitis C Vírus (HCV) Test. version 2.0 São Paulo: Roche, 2008.(Ficha Técnica do Fabricante)

ROCHE DIAGNOSTICS. *Manual Amplicor PCR*: Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. São Paulo: Roche, 1999.71p.(Ficha Técnica do Fabricante)

ROSEMBERG, W. Sex and drugs and HCV? GUT- International Journal of Gastroenterology and Hepatology. *Gutt*, v.45, p.7-8, 1999.

SIMMONDS, P. et al. Consensus Proposals for a Unied System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*, v.42, n.4, p.962-973, 2005.

SOUTO, F.J.D. et. al. *Imunoblot* como teste suplementar para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C em doadores de sangue. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, n.1, p.69-71, 2002.

STRAMER, S.L. et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid amplification testing. *N. Engl. J. Med.* v.351, n.8, p.760-768, 2004.

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

TELLINGHUISSEN, T.L. et al. Studying Hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J. Virol.*, v.81, n.17, p.8853-8867, 2007.

URIZ, J.; BRIZ, R. Historia natural de la infección por el VHC. *An. Sist. Sanit Navar.* v,27, n.2, p-51-58, 2004.

VALENTE, V.B. et. al. Marcadores sorológicos das hepatites B e C em doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.6, p.488-492, 2005.

VENTURIM, J.R. *Análise da reatividade sorológica e molecular para hepatite C em pacientes de hemodiálise da região metropolitana de Vitória – ES*. Disponível em <<http://portais.ufes.br/PRPPG/ext/0>> Acesso em: 17 out. 2008.

VOGLER, I.H. et al. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.46, n.6, p.303-308, 2004.

ZARIFE, M.A.S.A. et al. Detecção do genótipo 4 do vírus da hepatite C em Salvador, BA. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, n.6, p.567-569, 2006.

WHO- World Health Organization. *Hepatitis*. Geneva: 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/hepatitis/en/>> Acesso em: 15 Out. 2009.