

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

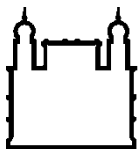
Mestrado em Biologia Parasitária

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE TESTES
MOLECULARES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO
VÍRUS DA HEPATITE C EM SANGUE COLETADO EM PAPEL
DE FILTRO

BRUNNA LEMOS CRESPO MARQUES

Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BRUNNA LEMOS CRESPO MARQUES

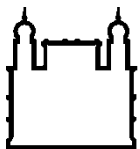
Otimização de protocolos de testes moleculares para detecção e
quantificação do Vírus da Hepatite C em Sangue Coletado em Papel de Filtro

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador(a): Dra. Livia Melo Villar

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BRUNNA LEMOS CRESPO MARQUES

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE TESTES MOLECULARES PARA
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C EM SANGUE
COLETADO EM PAPEL DE FILTRO

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Livia Melo Villar

Examinadores:

Prof^o Dra. Ana Maria Bispo de Filippis / Presidente

Prof^o Dra. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho / Membro Efetivo

Prof^o Dr. Davis Ferreira / Membro Efetivo

Prof^o Dra. Flavia Barreto dos Santos / Membro Suplente

Prof^o Dr. Adilson José de Almeida / Membro Suplente

**Rio de Janeiro, 15 de Abril de
2013**

AGRADECIMENTO

- ❖ À Dra. Livia Melo Villar pelo incentivo, paciência e dedicação ao me orientar durante os dois anos de realização desse projeto de mestrado. E pelo enorme apoio e ajuda na finalização desse trabalho.

- ❖ À Dra. Elisabeth Lampe, pela oportunidade e apoio ao projeto.

- ❖ À equipe da Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz (PDTIS) pela realização do sequenciamento nucleotídico das amostras incluídas neste estudo.

- ❖ À Dra. Ana Bispo e equipe do Laboratório de Flavivirus pela disponibilização do equipamento de PCR em tempo real.

- ❖ À Dra. Lia Lewis e Dra. Cristiane Alves Villela-Nogueira pela colaboração na seleção dos pacientes neste estudo.

- ❖ Aos médicos, profissionais de saúde e pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais (IOC/Fiocruz), Ambulatório de Hepatologia do Hospital Clementino Fraga Filho – UFRJ que colaboraram neste estudo sendo fundamentais para a realização do mesmo.

- ❖ Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite de participação na avaliação deste trabalho, assim como pelas sugestões e revisão do mesmo.

- ❖ Aos amigos do Laboratório de Hepatites Virais que de alguma forma contribuíram para o andamento e realização desse trabalho, em especial à Lucy Almeida, Vanessa Marques e Messias da Silva que colaboraram na realização dos

testes moleculares; e a Dra. Marcia Paschoal que participou da construção da curva padrão utilizada na PCR quantitativa desenvolvida neste estudo.

❖ Aos meus pais e irmão, que sempre me apoiaram, ajudaram e acreditaram no meu futuro. Obrigada por todo o esforço, carinho e por torcerem por mim.

❖ À minha madrinha, Cristina, e a minha avó, Valdivia, por torcerem pelo meu futuro.

❖ À minha prima-irmã, Nina, e minha afilhada, Sofia, por trazerem momentos de alegria, orgulho e felicidade a minha vida. Que Deus as abençoe e ilumine a cada dia de suas vidas.

❖ Às amigas, Juliana Custódio, Elisângela Ferreira, Jaqueline Correia, Helena Medina, pelos ótimos momentos que vivenciamos juntos nessa jornada de 4 anos. Obrigada pela boa vontade e paciência em me ajudar, ouvir e apoiar nos momentos mais turbulentos desta estrada.

❖ Às minhas amigas Amanda Cotias, Vivian Escobar e Mariana Aguiar por essa amizade duradoura e sincera desde a faculdade.

❖ À Pós Graduação em Biologia Parasitária.

❖ Ao CNPq e IOC/Fiocruz pela concessão da bolsa e fomento concedido para realização deste projeto

❖ À Deus, antes de todas as coisas, por me proteger e abençoar. Por me guiar nessa curta jornada chamada vida, tentando me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

*"Pensamento é vida. Vida é criação. Criação
vem do desejo. Desejo é semente. Semente
plantada no terreno da ação traz o fruto
Que lhe corresponde. Toda semente
produz. A escolha é nossa."*

Emmanuel.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	IX
RESUMO	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Estrutura e organização Genômica do Vírus	2
1.3 Proteínas virais.....	4
1.3.1 Proteínas Estruturais.....	4
1.3.2 Proteínas não estruturais.....	5
1.4 Entrada na Célula e Replicação Viral	6
1.5 Diversidade Genética	9
1.6 Epidemiologia	11
1.7 Transmissão e Prevenção	14
1.9 Tratamento	16
1.10 Diagnóstico	19
1.10.1 Testes Sorológicos.....	21
1.10.2 Testes Moleculares	22
1.11. Uso de amostras de sangue coletado em papel de filtro	28
2.0 JUSTIFICATIVA.....	30
3.0 OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4.0 METODOLOGIA	33
4.1. Amostra Populacional	33
4.2. Coleta e preparo das amostras biológicas	34
4.3 Ensaio imunoenzimático	35
4.3.2 Pesquisa de anti-HCV em SPF	36
4.4. Extração do RNA do HCV.....	36
4.4.1 Extração do RNA do HCV em amostras de Soro	36
4.4.2 Extração do RNA do HCV em amostras de SPF.....	37
4.5. Detecção quantitativa do HCV	43
4.5.1 - Detecção quantitativa do HCV em amostras de soro utilizando a técnica comercial.	43
4.5.2 - Transcrição do RNA do HCV em amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro para detecção quantitativa do HCV “in house”	45
4.5.3 Construção da Curva Padrão.....	46
4.5.3.1 Ligação do amplicon ao vetor de clonagem	47
4.5.3.2 Transformação bacteriana e purificação do DNA plasmidial contendo o inserto do HCV	47
4.5.4 – Detecção quantitativa por PCR em Tempo Real <i>in house</i>	49
4.6 Parâmetros de qualidade do qRT-PCR	52
4.8 Detecção qualitativa do HCV em amostras de soro e SPF	53
RNasin®.....	53

4.9 Sequenciamento nucleotídico do HCV obtido das amostras de soro e SPF.....	55
4.9.1 Purificação do DNA em gel de agarose.....	55
4.9.2 Reação de Sequenciamento.....	56
4.10. Análise dos dados.....	57
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Características da População de Estudo	58
5.2 Detecção de anti-HCV em soro e SCF	59
5.3 – Determinação do método de extração do RNA do HCV em SPF	59
5.4. Desenvolvimento da PCR quantitativa in house	60
5.4.1. Desenho dos Oligonucleotídeos	60
5.4.2. Amplificação, clonagem e obtenção de plasmídeos recombinantes para quantificação do vírus da hepatite C	60
5.4.3. Padronização da RT-PCR quantitativa para Hepatite C.....	62
5.5. Detecção quantitativa do RNA HCV.....	63
5.5.1. Detecção quantitativa do HCV em amostras de soro pelo método comercial.....	63
5.5.2. Detecção do HCV RNA pela PCR quantitativa <i>in house</i> em amostras de soro	63
5.5.3. Detecção quantitativa <i>in house</i> em amostras de SPF.....	65
5.4. Avaliação dos Parâmetros de Qualidade da PCR quantitativa <i>in house</i>.....	69
5.4.1. Determinação da sensibilidade e especificidade da PCR quantitativa <i>in house</i>	69
5.4.2 Avaliação da Reprodutibilidade	70
5.4.3 Avaliação da Presença de Inibidores.....	72
5.5 – Detecção Qualitativa do RNA HCV	73
5.6.- Sequenciamento das amostras de soro e SPF.....	74
6. DISCUSSÃO	780
7. CONCLUSÕES	84
REFERENCIAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag – Antígeno

Ac - anticorpo

ALT – Alaninaminotransferase

Anti-HCV – Anticorpo contra o vírus da hepatite C.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCLIN – Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos

AST – Aspartato aminotransferase

BSA – *Bovine sera albumin* ou soro de albumina bovina

C – Capsídeo

C – Citosina

°C – Grau celsius

CLDN-1 - Claudina

CD – *Cluster of differentiation* ou diferenciação de grupo

cDNA – DNA complementar

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* ou Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CNX – Média do controle negativo

CPX – Média do controle positivo

CO – *Cut off*

CORE / C - proteínas que envolvem o genoma viral, também chamadas de capsídeo

Ct - *Cycle Threshold*

CV – Coeficiente de variação

DBS – *Dried blood spot*

DNA - *Deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico

D.O. – Densidade ótica ou absorbância

DP – Desvio padrão

E – Envelope

EIA - *Enzyme immunoassays*

EIE – Ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

FAPERJ – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FS – Fator de significância
g – Força gravitacional
GAG - Glicosaminoglicano
GBD – *Global Burden of Disease* ou Carga Global de Doenças
γ-GT – Gama-glutamil transpeptidase
h - Hora
HA – Hepatite A
HAV – *Hepatitis A virus* ou vírus da hepatite A
HB – Hepatite B
HBV – *Hepatitis B virus* ou vírus da hepatite B
HBsAg – *Hepatitis B surface antigen* ou Antígeno de superfície da hepatite B
HCV – *Hepatitis C virus* ou Vírus da hepatite C.
HIV – *Human immunodeficiency virus* ou vírus da imunodeficiência humana
HRP – *Horseradish peroxidase* ou peroxidase de rábano
IC – Intervalo de confiança
ICTV – *International Committee on Taxonomy of Virus* ou Comissão Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN – Interferon
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IRES – *Internal ribosome entry site* ou sítio interno de entrada de ribossomo
ISDR – *Interferon sensitivity determining region* ou região determinante da sensibilidade ao interferon
Kb – Kilobase
Kg - Kilograma
LAHEP – Laboratório de Hepatites Virais
LD – Limite de detecção
LDL - *Low-density lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade
LRNHV - Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais
M – Molar
mg – miligrama
min - Minuto

mL – Mililitro
μL – Microlitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MPTI – Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos
MS – Ministério da Saúde
MUI – mili unidades internacionais
N – Normal
NaCl – Cloreto de sódio
NANB – não-A, não-B
NCR – *non codificant regions* ou região não codificante
nm – Nanômetro
nM – Nano molar
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – *Open reading frame* ou região aberta de leitura
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
PBS – Tampão salino-fosfato
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PEG INF – Interferon peguilhado
PC – Ponto de Corte
% - Porcentagem
pH – Potencial de hidrogênio
RBV – Ribavirina
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RdRp – *RNA-dependent RNA polymerase* ou RNA polimerase dependente de RNA
RE – Retículo endoplasmático
RE – Resolução
RJ – Rio de Janeiro
RNA – *Ribonucleic acid* ou ácido ribonucléico
rpm – Rotação por minuto
RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polimerase chain reaction* ou Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
RVS – Resposta virológica sustentada

SC – Subcutâneo

SPF – Sangue coletado em papel de filtro

SR-BI - *scavenger* classe B tipo I

TFA – *Tubule forming agent* ou agente formador de túbulo

TM - Transmembrana

TMB – Tetrametilbenzidina

TRIS - hidroximetilaminometano

U - Uracila

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VLDL – *Very-low-density lipoprotein* ou lipoproteína de muito baixa densidade

VO – Via oral

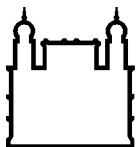
LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 4.1. Conjuntos de extração de material genético empregados neste estudo para obtenção do RNA viral em sangue em papel de filtro (SPF)	43
Quadro 4.2. Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa.....	46
Tabela 4.1. Concentração dos reagentes e cDNA utilizados na RT-PCR em tempo real <i>in house</i>	49
Tabela 4.2. Iniciadores de reação utilizados no One-Step RT-PCR e PCR II.....	50
Quadro 4.3. Reagentes utilizados na reação de RT-PCR qualitativa para amostras de soro.....	53
Tabela 4.3. Reagentes e volumes utilizados na reação de seqüenciamento.....	54
Quadro 4.4. Reagentes utilizados na reação de nested-PCR para amostras de soro.....	54
Tabela 4.4. Reagentes e volumes utilizados na reação de sequenciamento.....	56
Tabela 5.1. Determinação da carga viral do HCV (cópias/mL) e threshold cycle (Ct) das amostras de SPF avaliadas pela PCR quantitativa <i>in house</i> com diferentes concentrações de transcriptase reversa, cDNA e número de ciclos da reação.....	65
Quadro 5.1. Carga viral de HCV em cópias/mL e log ₁₀ em soro e SPF utilizando a metodologia comercial e <i>in house</i>	66
Tabela 5.2. Valores de Sensibilidade, especificidade, Valores preditivos positivo e negativo e Concordância entre a PCR quantitativa <i>in house</i> e a PCR quantitativa comercial para detecção do HCV.....	70
Quadro 5.2. Valores de Ct da curva padrão avaliados em 5 dias distintos para a avaliação da reprodutibilidade.....	71
Tabela 5.3. Reprodutibilidade da PCR em tempo real na detecção do HCV em amostras de soro e de SPF avaliando três amostras HCV RNA positivas e duas amostras negativa.....	72
Tabela 5.4. Avaliação da presença de substâncias inibidoras em amostras de soro e SPF através de controles exógenos internos <i>GAPDH</i>	73
Quadro 5.3. Distância entre as sequencias nucleotidicas dos 12 isolados de HCV provenientes de 6 amostras pareadas de soro e SPF utilizando pairwise deletion e o modelo Kimura 2 parâmetros.....	76
Quadro 5.4. Distância entre as sequencias peptídicas dos 12 isolados de HCV provenientes de 6 amostras pareadas de soro e SPF utilizando pairwise deletion e o modelo de correção de Poisson.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura viral do HCV (Adaptado de Perkins, J.A., 2002).....	2
Figura 1.2. Organização do Genoma do Vírus da Hepatite C (Lemon et al. 2007).....	3
Figura 1.3. Mecanismo de entrada e saída do HCV na célula (Zeisel, 2011).....	8
Figura 1.4. Distribuição Mundial dos Genótipos do HCV (WHO, 2009).....	10
Figura 1.5. Prevalência Global de Hepatite C (Lavanchy, 2011).....	12
Figura 1.6. Taxa de detecção dos casos de HCV (por 100.000 habitantes) segundo região de residência por ano de notificação: Brasil 1999-2011. (MS, 2012).....	13
Figura 1.7. Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 hab.) segundo faixa etária e sexo. (MS/SVS/ Departamento de DST, Aids, Hepatites Virais e IBGE, 2011).....	14
Figura 1.8. Distribuição percentual dos casos de HCV segundo provável fonte/ mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 199 a 2011 (MS/SVS/ Departamento de DST, Aids, Hepatites Virais e IBGE, 2011)	15
Figura 1.9 Fluxograma de tratamento da hepatite crônica C em pacientes portadores do genótipo I do HCV.....	17
Figura 1.10 Fluxograma de tratamento da hepatite crônica C em pacientes portadores do genótipo II/III do HCV e fatores preditores de má resposta.....	18
Figura 1.11. Evolução dos marcadores bioquímicos e sorológicos durante o curso da infecção pelo vírus da hepatite C (MS, 2011).....	20
Figura 1.12. Esquematização do ensaio qualitativo aplicando a metodologia de TMA.....	24
Figura 1.13. Curva de Amplificação da PCR em tempo real demonstrando 3 fases distintas: (1)Linha Basal: não há produto da PCR suficiente para ser detectado pela fluorescência, (2) Fase log: a quantidade do produto da PCR dobra a cada ciclo, (3) Fase Platô: não há mais aumento no número de produtos.....	25
Figura 1.14 PCR em tempo real com sonda TaqMan. (Q). Quencher, (R). Repórter	27
Figura 1.15. PCR em tempo real com o princípio da metodologia de SYBR Green, demonstrando que durante a polimerização as moléculas de SYBR Green se ligam ao DNA dupla fita gerando uma excitação e emitindo fluorescência (QIAGEN, Hilden, Germany, 2013).....	28
Figura 4.1. Procedimento de eluição do SPF (Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais - LRNHV).....	35
Figura 5.1. Fatores de risco a infecção pelo HCV entre os 59 indivíduos infectados pelo HCV incluídos no estudo	58
Figura 5.2. Alinhamento realizado com as sequências de HCV de diferentes genótipos obtidas no GenBank para construção dos iniciadores e sondas utilizados na PCR quantitativa.....	60
Figura 5.3. Resultado da amplificação da região 5' NC do protótipo de HCV em gel de agarose 1,5%.	61

Figura 5.4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% apresentando o inserto do HCV genótipo 1 após a reação do produto purificado com a enzima de restrição Eco RI.....	62
Figura 5.5. Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na PCR quantitativa obtida de diluições seriadas do plasmídeo recombinante contendo o inserto do HCV.....	63
Figura 5.6. Diagrama de caixas da carga viral no soro de 44 pacientes positivos para HCV-RNA no soro e SPF.....	64
Figura 5.7. Diagrama de caixas da carga viral no soro de 29 pacientes positivos para HCV-RNA no soro e SPF.....	68
Figura 5.8. Diagrama de caixas da carga viral no soro de 35 pacientes positivos para HCV-RNA no soro e SPF.....	69
Figura 5.9. Perfil eletroforético dos resultados encontrados no RT- <i>nested</i> PCR no gel de agarose 1,5% utilizando amostras de sangue em papel de filtro	74
Figura 5.10. Perfil eletroforético dos resultados encontrados no RT- <i>nested</i> PCR no gel de agarose 1,5% utilizando amostras de soro.....	74
Figura 5.11. Árvore Filogenética compostas por 43 sequencias de HCV oriundas de soro e 6 sequencias de HCV oriundas de SPF provenientes deste estudo e 19 sequencias de HCV provenientes dos genótipos 1 a 6 obtidas do <i>GeneBank</i>	79



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Desenvolvimento de Testes Moleculares para detecção e quantificação do Vírus da Hepatite C em Sangue Coletado em Papel de Filtro

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARQUES, B. L. C.

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é feito pela detecção de marcadores sorológicos e moleculares, porém o custo destas metodologias é bastante elevado e a coleta de sangue para a realização destes ensaios além de requerer pessoal treinado, é difícil em áreas remotas ou com poucos recursos. O objetivo deste estudo foi otimizar protocolos e padronizar métodos de diagnóstico molecular para infecção pelo HCV em amostras de sangue coletado em papel de filtro (SPF) para facilitar o acesso ao diagnóstico em áreas remotas ou com recursos limitados. Para isto, 99 indivíduos forneceram amostras pareadas de soro e SPF, dentre os quais 59 eram anti-HCV reagente e 40 eram não reagentes em suas amostras de soro. As amostras anti-HCV reagentes foram submetidas à técnica de quantificação comercial. Para o desenvolvimento da RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) *in house*, uma curva padrão interna foi construída utilizando um plasmídeo contendo o inserto do HCV e iniciadores e sonda foram desenhados para a região 5'NC do HCV. Para otimização da técnica, a concentração de cDNA, transcriptase reversa e números de ciclos de reação foram avaliados. Para a extração de RNA de HCV em amostras de SPF, sete métodos foram avaliados. A sensibilidade, especificidade, correlação, reprodutibilidade e presença de inibidores da RT-PCR quantitativa também foram determinados. O conjunto de QIAamp DNA Mini Kit foi o método mais eficiente para extração do RNA do HCV em SPF. A RT-qPCR *in house* desenvolvida foi capaz de quantificar o HCV no soro de 44 amostras onde a mediana de carga viral foi inferior aquela observada na técnica comercial (\log_{10} 4,94 e \log_{10} 6 cópias de HCV/mL, respectivamente). A faixa de detecção do método *in house* foi de 10 a 10^9 cópias de HCV por reação. Para a detecção de HCV em SPF foi necessário o aumento da transcriptase reversa e de cDNA, permitindo que 35 amostras fossem detectadas com um limite mínimo de detecção igual a 58,5 cópias/mL e a mediana de carga viral foi semelhante à observada nas respectivas amostras de soro avaliadas pela técnica comercial (\log_{10} 5,38 e \log_{10} 5,89 cópias de HCV/mL, respectivamente). Obteve-se boa reprodutibilidade da RT-qPCR *in house* através da análise da curva padrão e de amostras de soro e SPF. Não foi observada a presença de inibidores de reação utilizando o GAPDH como controle interno. Quando comparado com a metodologia comercial, a RT-qPCR apresentou sensibilidade de 74,58% (IC95% 61,5-85,0) em soro e 59,3% (IC95% 45,7-71,9) em SPF, e a especificidade foi igual a 100% para ambos espécimes. Quando a RT-qPCR foi avaliada entre os dois espécimes clínicos, a sensibilidade da técnica em SPF foi igual a 65,9% (IC95% 50,0-79,5) e a especificidade foi igual a 100%. Quarenta e cinco amostras de soro e quinze amostras de SPF foram amplificadas na RT-PCR qualitativa, onde 43 amostras de soro e 11 amostras de SPF foram sequenciadas. Entre as amostras de soro, 29 foram classificadas como subgenótipo 1b, 13 como subgenótipo 1a, 1 como genótipo 3. Entre as amostras de SPF, 9 foram classificadas como subgenótipo 1b e 2 como subgenótipo 1a. Foi observada alta homologia nucleotídica entre as sequências de HCV das amostras pareadas de soro e SPF onde todas foram classificadas como genótipo 1. Conclui-se que o sangue em papel de filtro pode ser utilizado para detecção, quantificação e análise filogenética do HCV, sendo uma ferramenta promissora para estudos de epidemiologia da hepatite C.

Palavras Chaves: Hepatite C, PCR em tempo real, Sangue coletado em Papel de Filtro, genotipagem.

ABSTRACT

The diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection is made by detection of molecular and serological markers, but the cost of these methodologies is quite high and blood sample collection requires trained personnel what it is difficult in remote areas or presenting few resources. The aim of this study was to optimize protocols and standardize molecular diagnostic methods for HCV infection in dried blood samples (DBS) to facilitate access to diagnosis in remote areas or with limited resources. For this, 99 individuals provided paired serum and DBS samples, where 59 of them were anti-HCV reactive and 40 were non-reactive in their serum samples. Anti-HCV positive samples were subjected to commercial quantification technique. For the development of quantitative RT-PCR (RT-qPCR) in house, an internal standard curve was constructed using a plasmid containing the insert and HCV primers and probe designed for the 5' non coding (NC) region of HCV. For optimization of these techniques, the concentration of cDNA, reverse transcriptase and numbers of cycles of reaction were evaluated. For the extraction of HCV RNA in DBS samples, seven methods were evaluated. The sensitivity, specificity, correlation, reproducibility and presence of inhibitors in quantitative RT-PCR were also determined. QIAamp DNA Mini Kit was the most efficient method for HCV RNA extraction among DBS samples. The in house RT-qPCR was able to quantify HCV among 44 serum samples where the median viral load was lower than that observed in commercial technique (4.94 log₁₀ and 6 log₁₀ copies of HCV / mL, respectively). The range of HCV detection using in house RT-qPCR was 10¹-10⁹ copies of HCV per reaction. For HCV detection in DBS, it was necessary to increase reverse transcriptase and cDNA concentration giving 35 HCV RNA reactive samples with a limit of detection equal to 58.5 copies of HCV/ mL and the median viral load was similar to that observed in their sera evaluated by commercial technique (5.38 log₁₀ and 5.89 log₁₀ copies of HCV / mL, respectively). In house RT-qPCR presented good reproducibility using standard curve and paired DBS and sera samples. It was not observed the presence of inhibitors of the reaction using GAPDH as internal control. In house RT-qPCR showed a sensitivity of 74.58% (95% CI 61.5 to 85.0) in serum and 59.3% (95% CI 45.7 to 71.9) in DBS, and the specificity was 100% for both specimens compared to the commercial methodology. When the RT-qPCR was evaluated in two clinical specimens, the sensitivity of the technique in DBS was equal to 65.9% (95% CI 50.0 to 79.5) and specificity was 100%. Forty-five serum samples and 15 DBS samples were amplified in qualitative RT-PCR, where 43 serum samples and 11 DBS samples were sequenced. Among the serum samples, 29 were classified as HCV subgenotype 1b, 13 as subgenotype 1a, genotype 1 and 3. Among DBS samples, 9 were 9 classified as HCV subgenotype 1b and 2 as HCV subgenotype 1a. HCV nucleotide sequences presented high homology between paired DBS and sera samples and all of them were classified as genotype 1. It is conclude that dried blood spot may be used for detection, quantification and phylogenetic analysis of HCV and it is a promising tool for studying the epidemiology of hepatitis C.

Keywords: Hepatitis C, Real time PCR, dried blood spot, genotyping

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Hepatite refere-se a uma inflamação no fígado que pode ser causada por vírus, bactérias, medicamentos, entre outros. As hepatites virais podem ser causadas por um dos cinco diferentes vírus que são: o vírus da hepatite A (HAV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV), o vírus da hepatite Delta (HDV) e o vírus da hepatite E (HEV) (Melnick; Howard, 1994), e atualmente estas infecções representam grave problema de saúde pública mundial. Os vírus das hepatites A, B e C são os responsáveis pela maior parte das infecções agudas.

Na década de 70, dois tipos de hepatites virais haviam sido identificados: o HBV, membro protótipo de uma nova família de vírus de DNA, *Hepadnaviridae*; seguido do HAV, um picornavírus designado para um novo gênero: Hepatovirus. Com o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico observou-se que diversos casos de infecções por transfusionais não eram causados por HBV ou HAV, surgindo, então, o termo hepatites não-A não-B (NANB) para classificar esse novo agente. (Lemon et al., 2007)

Soro de pacientes com hepatite NANB com níveis persistentes elevados de alanina aminotransferases (ALT) foram inoculados em chimpanzés (*Pan troglodytes*) como modelo de estudo experimental da hepatite aguda e crônica. A utilização desse modelo indicou a existência de dois possíveis agentes das hepatites NANB, e em um deles foram observados túbulos membranosos dentro do citoplasma dos hepatócitos de chimpanzés infectados, também chamado de agente formador de túbulo (Tubule forming agent ou TFA). A partir de tais estudos identificou-se que o agente NANB era suscetível a agentes lipídicos e capaz de passar por filtros de 50 a 80nm, sugerindo um vírus pequeno e envelopado. (Shimizu et al. 1979)

A partir de 1980, foi possível a detecção e identificação de diversos patógenos infecciosos através das técnicas de biologia molecular, tal como a identificação e caracterização viral em clones de DNA complementar (cDNA). Em 1989, um clone de cDNA, 5-1-1 provenientes de amostras de plasma e fígado derivados de chimpanzés infectados, foi isolado por Choo e colaboradores

através do uso do método de triagem imunológica randômica (blind immunoscreen) e através de comparação em biblioteca de cDNA, onde os anticorpos provenientes de pacientes com diagnóstico de hepatite NANB foram usados, foi possível identificar um clone de cDNA codificando um epítipo imunodominante dentro da proteína não-estrutural 4 do vírus. Após seis meses de análises extensas o clone 5-1-1 foi identificado e recebeu o nome de vírus da hepatite C. (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989, Lemon et al., 2007).

1.2 Estrutura e organização Genômica do Vírus

O vírus da hepatite C (HCV) é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (Simmonds, 2004) e um dos principais agentes etiológicos de doença crônica do fígado, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular no mundo, sendo mais de 22% dos novos casos anuais de câncer hepático atribuídos à infecção pelo vírus (Hartwell et al., 2011).

O HCV é um vírus envelopado, seu nucleocapsídeo contém uma única fita de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 9,6 kb. A partícula viral tem formato esférico e mede aproximadamente 50 nm de diâmetro (ICTVdB, 2006). O nucleocapsídeo é icosaédrico e tem diâmetro de aproximadamente 30 nm (Figura 1.1).

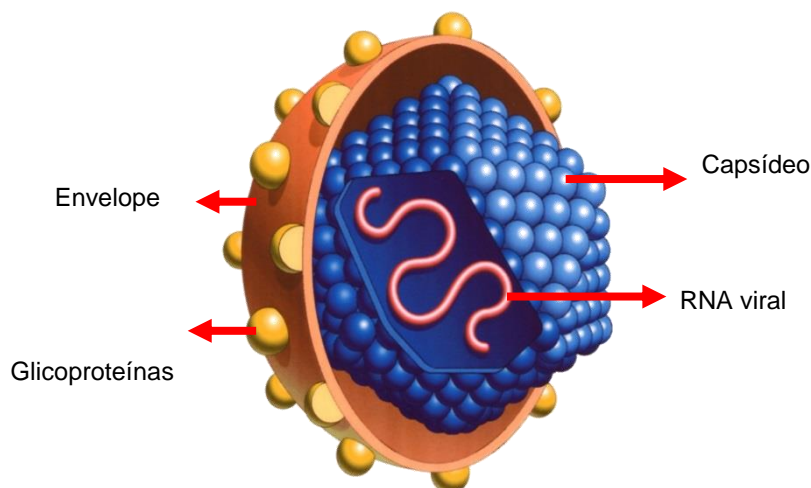


Figura 1.1. Estrutura viral do HCV (Adaptado de Perkins, J.A., 2002)

O RNA viral funciona como RNA mensageiro para a tradução das proteínas virais. A molécula linear é composta por uma região 5'-não-codificante (NC), que

inclui um sítio interno de entrada do ribossomo (*Internal ribosome entry site* ou “IRES”), uma única fase de leitura aberta (*open reading frame* ou “ORF”) que codifica uma poliproteína precursora de 3000 aminoácidos e uma região 3’-NC (Moradpour et al. 2007).

Durante a etapa de replicação viral essa poliproteína é clivada pela ação de enzimas virais e do hospedeiro em 3 proteínas estruturais: proteína do capsídeo C, duas glicoproteínas do envelope E1 e E2; e várias proteínas não-estruturais: o canal iônico P7, a protease NS2-3, a serino protease NS3 e RNA helicase; o polipeptídeo NS4A, as proteínas NS4B e NS5A; e NS5B RNA polimerase dependente de RNA (Figura 1.2) (You et al., 2004, Wasmuth, 2010).

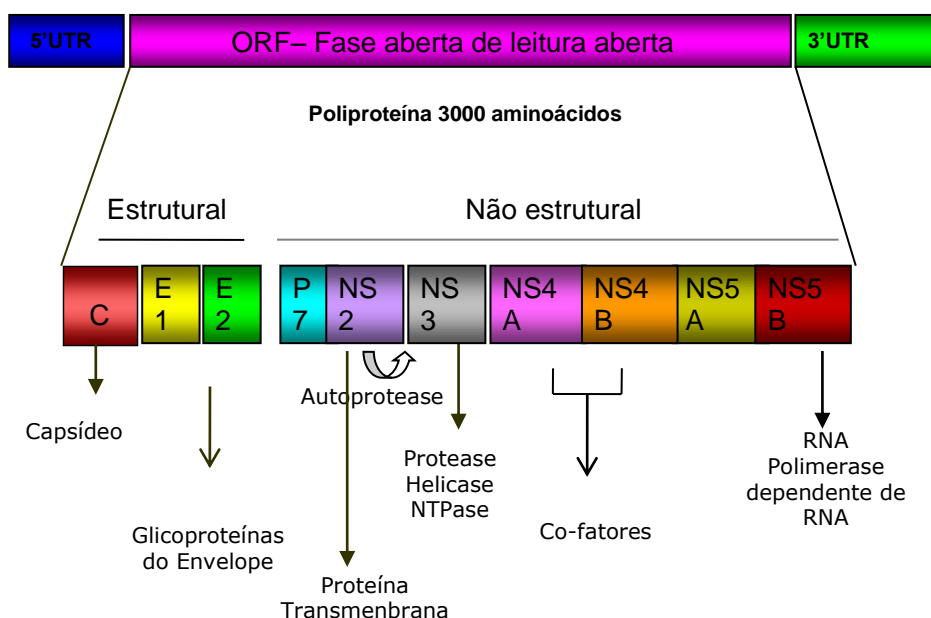


Figura 1.2. Organização do Genoma do Vírus da Hepatite C (Lemon et al. 2007)

As proteínas estruturais são componentes essenciais para a formação do capsídeo e envelope viral, enquanto as proteínas não estruturais estão associadas à replicação do RNA e a morfogêneses dos vírions. A fase de leitura aberta é flanqueada pelas regiões 5’ e 3’ não codificantes que contêm sequência nucleotídicas relevantes para regulação da replicação viral.

A região 5’NC representa o segmento mais conservado do genoma viral. É composta por aproximadamente 341 nucleotídeos e altamente conservada entre os diferentes genótipos do HCV, apresentando quatro domínios estruturais

secundários e o IRES, que é essencial para o início da tradução de uma forma cap-independente do RNA viral. Os domínios são ordenados de I a IV, sendo os domínios I e II, localizados na extremidade 5', essenciais para replicação do RNA viral (Brass et al. 2006; Moradpour et al. 2007).

A região 3'NC apresenta três domínios distintos: uma região variável de 80 nucleotídeos, um trato poli U/UC de comprimento variável e uma região altamente conservada chamada cauda X. A região variável, de 80 nucleotídeos, é altamente conservada dentro de cada genótipo, entretanto variável entre cada um deles. A cauda de aproximadamente 98 nucleotídeos é essencial para etapas de replicação do RNA, deleções e substituições. (Brass et al. 2006; Moradpour et al. 2007, Lemon et al., 2007). Na cauda X desta região existe uma estrutura secundária de RNA que parece ter papel essencial na replicação do HCV. (Moradpour et al. 2007).

1.3 Proteínas virais

1.3.1 Proteínas Estruturais

O segmento amimo terminal da poliproteína é processado por sinais peptídicos do hospedeiro para produção do nucleocapsídeo (core), duas glicoproteínas de envelope (E1 e E2) e uma proteína transmembrana p7.

A proteína core possui estrutura α -helicoidal, sendo encontrada nas membranas do RE dentro de redes membranosas e na superfície de resíduos de lipídios (Boulant et al. 2006). Existem evidências de que a interação da proteína core com os resíduos de lipídios pode afetar o metabolismo lipídico, contribuindo para o desenvolvimento de esteatose hepática, que ocorre principalmente em pacientes infectados com o genótipo 3 (Asselah et al. 2006). Esta proteína tem papel fundamental na formação do nucleocapsídeo, na modulação do gene de transcrição, na proliferação celular, morte celular e nos mecanismos de sinalização celular (Murphy et al. 2007).

As proteínas E1 e E2 são glicosiladas constituindo um complexo não-covalente responsável pela formação do envelope do HCV e têm papel importante na entrada do vírus na célula (Moradpour et al., 2007).

A proteína p7 é formada por duas α -hélices transmembrana, conectadas por uma alça voltada para o citoplasma. É uma proteína integral de membrana, hidrofóbica, localizada entre a região estrutural (E2) e não-estrutural (NS2) do HCV. Sua função consiste em um íon oligomérico presente na formação do canal iônico capaz de mediar o fluxo de cátions através das membranas artificiais. O HCV também depende da função da proteína p7 para montagem, liberação e produção de vírions infecciosos para célula hepática (Wasmuth,2010; Khaliq et al. 2011).

1.3.2 Proteínas não estruturais

A proteína não estrutural 2 (NS2) desempenha um papel central na morfologia da partícula viral. Estudos indicam que a NS2 atrai as proteínas do envelope viral para o sítio de montagem do vírus, promovendo a interação entre as demais proteínas não-estruturais para a montagem da partícula viral (Popescu et al., 2011)

A proteína NS3-4A apresenta função de serino protease em seu terço inicial da região N-terminal, e função de RNA helicase/NTPase nos dois terços da região C-terminal. O polipeptídeo NS4A funciona como um cofator da serina protease NS3 (Moradpour et al., 2007). É responsável pela clivagem da poliproteína viral nas junções NS3-4A, NS4A4B, NS4B5A e NS5A5B, e de duas proteínas adaptadoras da resposta imune da célula hospedeira, TRIF e MAVS. Dessa forma, é um dos principais alvos para o desenvolvimento de novas terapias para hepatite C (Romano et al., 2011).

A proteína NS4B consiste em 217 aminoácidos. É uma proteína de membrana integral localizada no retículo endoplasmático. A NS4B desencadeia a formação específica do rearranjo das membranas vesiculares que constituem a rede membranosa, correspondendo ao complexo replicativo do HCV.(Wasmuth, 2010; Paul et al., 2011).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína com múltiplas funções que pode ser encontrada nas formas basal e hiperfosforilada. A fosforilação é um processo altamente regulado por várias proteínas quinases celulares (Moradpour et al. 2007). Está localizada normalmente na membrana do retículo endoplasmático e acredita-se que faça parte de um componente do complexo de replicação viral compreendido entre NS2 e NS5B, também chamado de replicase. Possui uma região de 40 aminoácidos onde foram identificadas mutações chamada de região determinante da sensibilidade ao interferon (ISDR), que foi relacionada à eficiência do tratamento com interferon alfa. Sua função também está relacionada com a modulação do ciclo celular, apoptose e via de resposta ao estresse, assim como nas vias de sinalização (Huang et al. 2007).

A proteína NS5B possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, essencial para replicação do genoma viral. O domínio hidrofóbico na extremidade C da proteína NS5B se insere na membrana do retículo endoplasmático, enquanto os sítios de atividades da polimerase encontram-se no citoplasma. O domínio citosólico da enzima viral forma a estrutura típica de polimerase com 3 subdomínios. Sua estrutura única vem se constituindo também em um alvo intensamente estudado para terapia anti-HCV (Wasmuth, 2010, Ferrari et al. 2008).

1.4 Entrada na Célula e Replicação Viral

A entrada do vírus na célula é um processo complexo que envolve diversas etapas. Andréo et al. (2007) demonstraram que a atividade catalítica da lipase de lipoproteínas permite a ligação e internalização de partículas do HCV por diferentes tipos celulares, agindo como “ponte” entre as lipoproteínas complexadas ao HCV e receptores de proteoglicanos na superfície das células.

A entrada do vírus na célula do hospedeiro é o primeiro passo de infecção pelo HCV que requer a interação de glicoproteínas de envelope E1 e E2 do HCV e a membrana da célula hospedeira. E1 e E2 são proteínas transmembranares do tipo I com um ectodomínio N-terminal e um domínio transmembranar curto de terminal-C (DTM). (Moradpour et al.,2007; Lemon et al., 2007).

A associação das glicoproteínas E1E2 forma grandes complexos covalentes estabilizados por pontes de dissulfeto permitindo a entrada. O domínio transmembranar curto da extremidade C desempenha um papel importante na formação dos complexos E1E2 e no processo de fusão de membrana. Os ectodomínios N-terminais de E1 e E2 são fortemente glicosiladas. Os glicanos desempenham papel importante na associação E1E2, assim como na entrada de HCV e são cruciais para a evasão das respostas imune do hospedeiro. Além disso, existem formas heterogêneas do HCV no soro humano que podem estar associadas a VLDL, LDL, HDL e também protege o vírus a partir de anticorpos de neutralização de segmentação das glicoproteínas do envelope do HCV (Zeisel et al., 2011).

Estudos sugerem que a entrada do vírus no hepatócito seja mediada por lipoproteínas, principalmente VLDL (*Very-low-density lipoprotein* ou lipoproteína de muito baixa densidade) e o receptor para LDL (*Low-density lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade) e/ou GAG (glicosaminoglicano). Posteriormente, o HCV se liga ao receptor CD81 que torna a célula permissiva a entrada do vírus, porém sozinha é insuficiente, necessitando então de co-fatores como SR-BI (*scavenger* classe B tipo I), gerando o sinal para entrada do vírus. Em seguida, o HCV é transferido para junções estreitas onde se liga à CLDN-1 (claudina) e ocludina. O vírus entra na célula através das junções estreitas via endocitose mediada por clatrina seguido pela fusão no endossoma da célula através das glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, e libera o nucleocapsídeo. A entrada e saída do vírus envolvem uma rede dinâmica de microtúbulos celulares (Wasmuth, 2010; Burlone et al., 2009; Budkowska, 2009) (Figura 1.3).

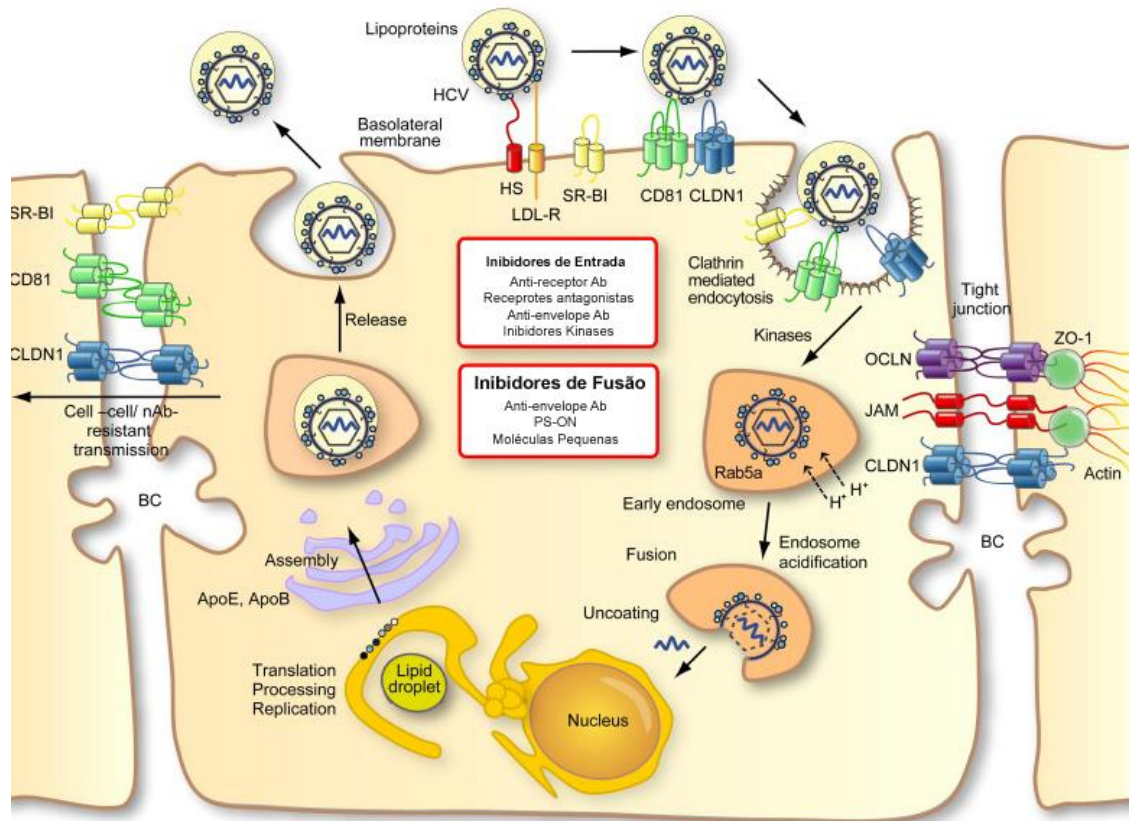


Figura 1.3- Mecanismo de entrada e saída do HCV na célula (Zeisel, 2011)

O processo de replicação do HCV ocorre no citoplasma do hepatócito e não é diretamente citopático. Sua taxa de replicação no organismo do paciente pode ser bastante elevada, variando entre 10^{10} a 10^{12} vírions por dia, com meia-vida viral estimada de 2 a 3 horas (MS, 2011). A tradução do RNA genômico é dependente do sítio de entrada interna de ribossomos (IRES) localizado ao longo da região 5'NC. O segmento IRES se liga diretamente ao ribossomo 40S por alta afinidade. Em seguida, liga-se eIF3 e eIF2 formando um complexo 48S que é capaz de agir como um ribossomo 80S de replicação-competente. A IRES parece estar diretamente envolvida na montagem dos fatores iniciadores no ribossomo como também no posicionamento do tRNA e na localização do códon de iniciação na extremidade 3'. A ligação da subunidade 40S ao ribossomo induz à mudanças conformacionais no 40S. As polipirimidinas se ligam ao IRES do RNA e aumentam a atividade traducional (Lemon et al. 2007).

Pouco se sabe sobre o mecanismo de liberação do vírus da célula hospedeira, mas estudos sustentam que a proteína NS2 esteja envolvida

indiretamente no processo. A proteína p7, desempenhando o papel de canal iônico contribui para o processo de liberação da partícula (Lemon et al. 2007). Estudos bioquímicos e morfológicos por Andre et al. (2005) sugerem que o HCV é empacotado em conjunto com lipídios como lipovirionículas (LVP) com densidades semelhantes à da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). LVP purificadas são ricas em triglicerídeos e contém apolipoproteínas B e E (apoB e apoE), HCV RNA e proteína do core. Ambos apoB e apoE foram detectadas nas frações de baixa densidade do RNA do HCV contendo partículas (Chang et al. 2007; Zeisel et al. 2011).

1.5 Diversidade Genética

HCV é classificado dentro do gênero distinto Hepacivirus, na família *Flaviviridae*. Essa classificação é baseada na comparação filogenética das seqüências virais. O HCV difere das outras flaviviruses e pestiviruses, na organização de suas proteínas estruturais que compreendem o terceiro amino terminal. (Lemon et al., 2007). A análise filogenética da região NS5 do HCV demonstra a existência de 6 grandes grupos genotípicos do vírus (tipos 1-6), e um número ainda maior de subtipos (>80), que diferem, cerca de, 20% e 30% em suas seqüências nucleotídicas, respectivamente (Simmonds, 2004; Simmonds, 2005).

Os genótipos têm distribuição geográfica variável nas diferentes regiões do globo, refletindo, provavelmente, a evolução filogenética do vírus e o modo de transmissão da doença entre os hospedeiros (Augusto, 2003). Genótipos 1 e 2 são globalmente distribuídos, genótipo 3 é predominante em parte da Europa, Ásia e América do Norte. Regiões da Europa, África Central e Oriente Médio apresentam diversidade endêmica para o genótipo 4, o genótipo 5 é encontrado na África do sul e o genótipo 6 é encontrado prioritariamente no Sudeste da Ásia e América do Norte (WHO, 2009; Zhao, Feng & Xia, 2012) (Figura 1.4).

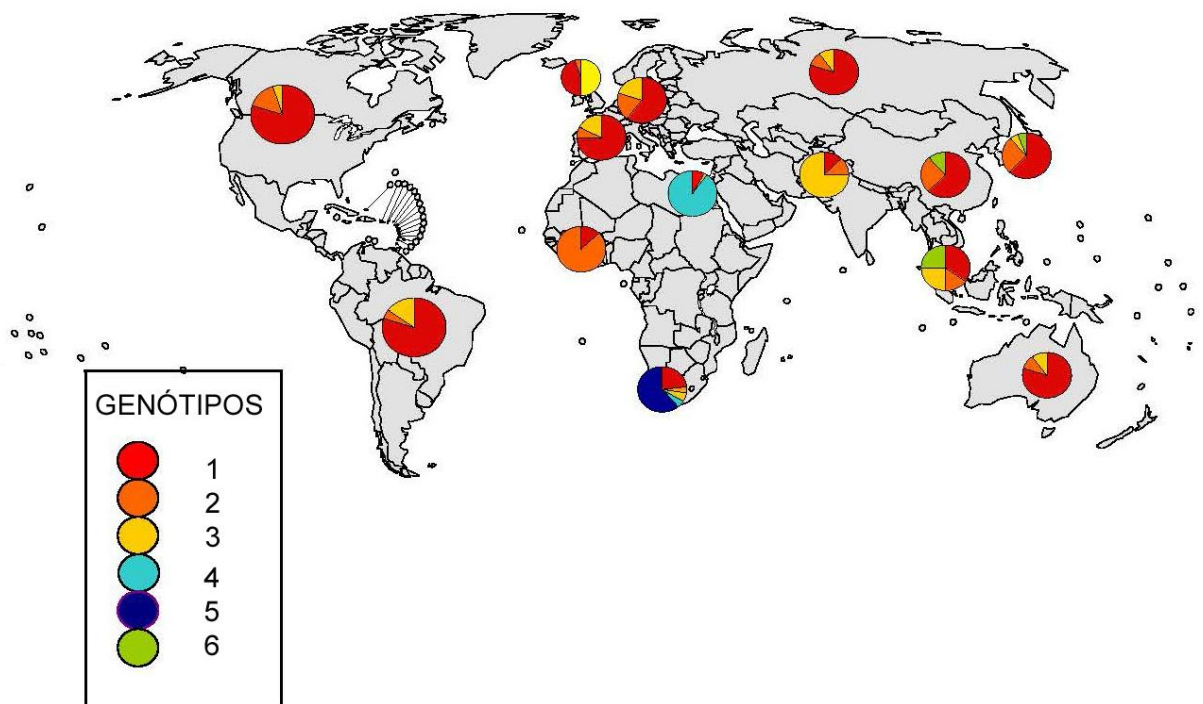


Figura 1.4 – Distribuição Mundial dos Genótipos do HCV (WHO, 2009)

Os tipos mais comuns encontrados mundialmente são: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4, e 5. O genótipo 1 apresenta maior resistência a terapia com interferon e ribavirina, enquanto o genótipo 3 apresenta maior taxa de resposta ao tratamento com interferon (WHO, 2009).

No Brasil, são encontrados, principalmente, os genótipos 1, 2 e 3, com predominância do genótipo 1 sobre os genótipos 2 e 3, com distribuição de 60% para o primeiro e taxas aproximadas de 40% entre os dois outros genótipos comumente encontrados (MS, 2011; ABPH, 2012).

O estudo da filogenia dos diferentes isolados do HCV apresenta grande importância no estabelecimento da relação evolutiva entre grupos, possibilitando a compreensão histórica da disseminação destes isolados e da cadeia de transmissão dos mesmos. Lampe e colaboradores (2010) traçaram a história epidêmica dos subtipos 1a, 1b e 3a do HCV no Brasil e demonstraram que os três subtipos dos HCV brasileiros apresentam múltiplas linhagens, e número e tipos muito variados entre as linhagens identificadas. O estudo indicou que grande parte das infecções do subtipo 1a (95%) no Brasil sejam consequência da introdução de uma única cepa do

HCV disseminada dentro das fronteiras brasileiras, uma vez que os isolados se apresentaram dentro de uma mesma grande linhagem parafilética.

Os agrupamentos monofiléticos das infecções dos subtipos 1b e 3a compreendem apenas 25-30% de sequências brasileiras, sugerindo que o subtipo 1b e 3a brasileiros ocorreram por meio de difusão simultânea de múltiplas cepas incluindo cepas locais, pequenas variantes locais, e cepas alóctones.

Em estudo realizado por Campiotto e colaboradores (2005) para determinar a distribuição dos genótipos do HCV no Brasil, obtiveram os seguintes resultados: genótipo 1: 64.9% (1.095); genótipo 2: 4.6% (78); genótipo 3: 30.2% (510); genótipo 4: 0.2% (3); e genótipo 5: 0.1% (2). Em todas as regiões geográficas do Brasil, o genótipo 1 foi o mais frequente (51.7% a 74.1%) com maiores percentuais na região Norte; o genótipo 2 foi mais prevalente na região Centro-Oeste (11.4%), enquanto o genótipo 3 foi mais comum no Sul do país (43.2%). Os genótipos 4 e 5 foram encontrados, apenas no estado de São Paulo, em taxas muito baixas (0,4% e 0,2%, respectivamente).

A contaminação pelo HCV entre indivíduos submetidos a hemodiálise foi descrita por Espirito-Santo e colaboradores (2007) onde o genótipo 1a foi o mais prevalente entre os pacientes usuários da terapia na região Central do Brasil. Esta mesma observação foi constatada em outros estudos realizados em centros de hemodiálise no Brasil (Moreira et al., 2003; Albuquerque et al., 2005).

1.6 Epidemiologia

A maioria dos casos de infecção aguda pelo HCV é assintomática (60-70%) e, portanto, os dados sobre a incidência da infecção aguda são escassos. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012) estima-se que 130-170 milhões de indivíduos, cerca de 3% da população mundial, estejam infectados pelo vírus do HCV. Relata-se também que 3-4 milhões de novas infecções ocorram anualmente. Apesar de afetar mundialmente a população, há regiões onde a prevalência da doença é mais elevada.

As maiores taxas de soroprevalência regionais de anticorpo anti-HCV são encontradas no Oriente médio (4,7%) e África (3,2%), em países como Egito (14%), Camarões (13,8%), Mongólia (10,7%). Enquanto as prevalências mais baixas foram documentadas na região da Austrália e Oceania (1,2%) (Lavanchy, 2011; WHO, 2012) (Figura 1.5).

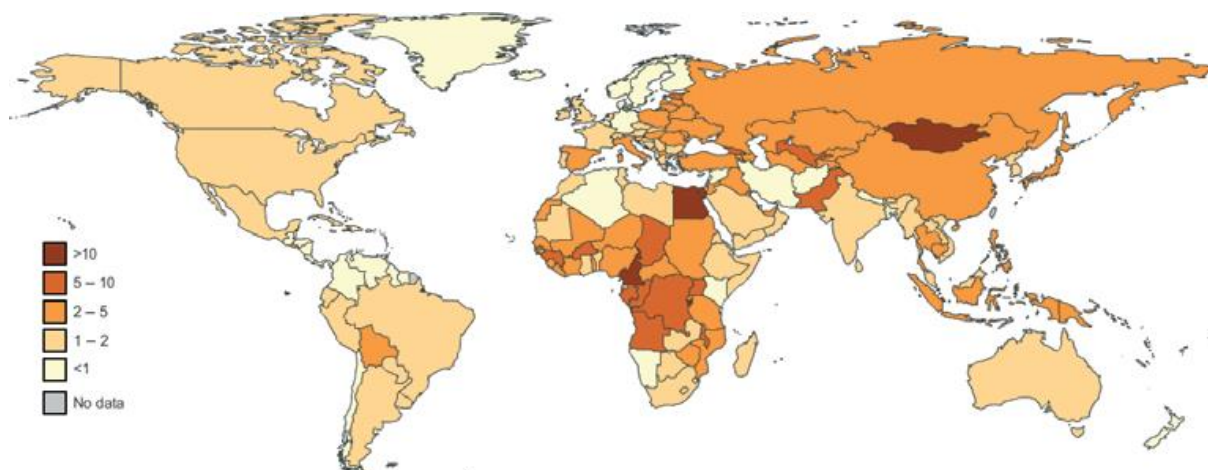
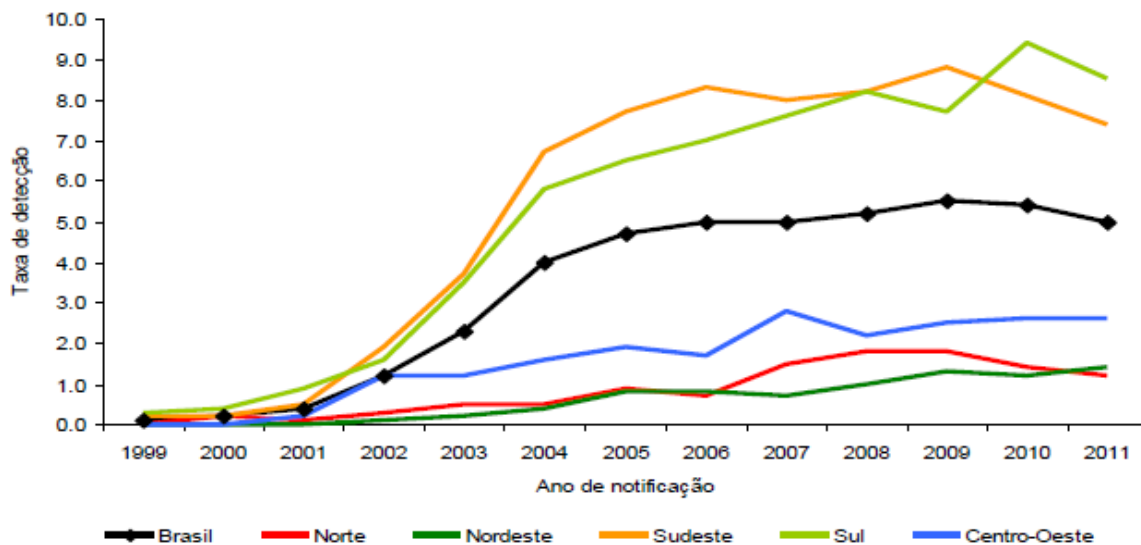


Figura 1.5. Prevalência Global de Hepatite C (Lavanchy, 2011)

No período compreendido entre a Segunda Guerra Mundial e os anos de 1980, as principais vias de transmissão nos países desenvolvidos eram a exposição ao sangue contaminado ou a produtos derivados do sangue e o uso de drogas injetáveis. A introdução dos testes de diagnóstico para detecção de anti-HCV nos bancos de sangue eliminou praticamente esta via de transmissão nos países desenvolvidos. No entanto, o uso de drogas injetáveis continua sendo a principal via de transmissão, representando 40% ou mais do total de pessoas infectadas (Lavanchy, 2009).

No Brasil, país de variações demográficas, sociais e culturais entre suas diferentes regiões, as hepatites virais foram, em 1996, incluídas na lista de doenças de notificação compulsória. Dados epidemiológicos recentes divulgados pelo Ministério da Saúde (2012) estimam que entre os anos de 1999 e 2011 foram registrados mais 82.000 casos, ocorrendo cerca de 2.000 mortes, e 10.000 novos casos registrados anualmente. Na figura 1.7 podemos observar que a partir de 2010 as taxas de detecção na região Sul ultrapassam a região Sudeste que



até então, se mostrava como principal área de notificação de casos de hepatite C.

Figura 1.6 Taxa de detecção dos casos de HCV (por 100.000 habitantes) segundo região de residência por ano de notificação: Brasil 1999-2011. (MS, 2012).

De 1999 a 2011, observou-se que do total de casos confirmados do sexo masculino (49.291), a maior proporção, 34,5%, encontrava-se na faixa etária de 40 a 49 anos de idade. Para o sexo feminino (32.734), a mesma faixa etária representou 24% dos casos (MS, 2012).

Entretanto, as maiores taxas de detecção de HCV em ambos os sexos em 2011 ocorreram na faixa etária de 50 a 59 anos de idade (Figura 1.7).

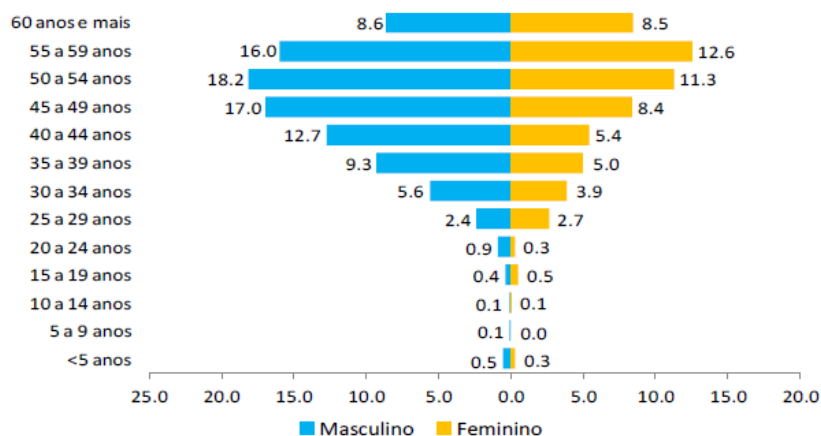


Figura 1.7- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 hab.) segundo faixa etária e sexo. (MS/SVS/ Departamento de DST, Aids, Hepatites Virais e IBGE, 2011).

Realizado nas capitais brasileiras, o estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C encontrou as seguintes prevalências de anti-HCV: na Região Norte, 2,1% (IC95% 1,4-2,8); no Nordeste, 0,7% (IC95% 0,4-1,0); no Centro-Oeste, 1,3% (IC95% 0,9-1,7); no Sudeste, 1,3% (IC95% 0,9-1,6); no Sul, 1,2% (IC95% 0,8-1,6); e no Distrito Federal, 0,8% (IC95% 0,4-1,2) (MS, 2011).

1.7 Transmissão e Prevenção

O HCV é transmitido principalmente pela via parenteral, através de grandes ou repetidas exposições percutâneas ao sangue (ex. transfusão ou transplante de órgãos de doadores infectados e uso de drogas injetáveis) (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT (MMWR), 1998; Shepard, Finelli, Alter, 2005; Te, Jensen, 2010; Pereira et al. 2013) A transmissão pelo HCV por exposição percutânea inaparente tem sido também relatada e foi atribuída a contaminação cruzada pelo reuso de agulhas e seringas, uso múltiplo de medicações endovenosas, e acessórios para uso de drogas injetáveis (Williams; Perz; Bell, 2004; Hagan et al., 2001).

Um grande percentual de indivíduos infectados é representado por usuários de drogas endovenosas e/ou intranasal ilícitas e receptores de hemoderivados (Alter, 2002). Pacientes transplantados com órgãos de doadores anti-HCV positivos também são um grupo de risco (Ho, 1991). Entretanto, de

acordo com trabalho apresentado por Strauss (2001) estima-se que 40% a 50% dos indivíduos com infecção por HCV não apresentem qualquer fator de risco parenteral conhecido na sua história epidemiológica, configurando os casos esporádicos da infecção.

As taxas de transmissão vertical variam de 0% a 20% na maioria dos estudos. Os fatores de riscos para a transmissão vertical estão associados com elevada carga viral da mãe, trabalho de parto prolongado, ruptura placentária, e co-infecção HCV-HIV. Dados do Ministério da Saúde do Brasil demonstraram que as principais formas de transmissão do HCV no período de 1999 a 2011 foram o uso de drogas e a transfusão sanguínea (antes de 1993). (Figura 1.8).

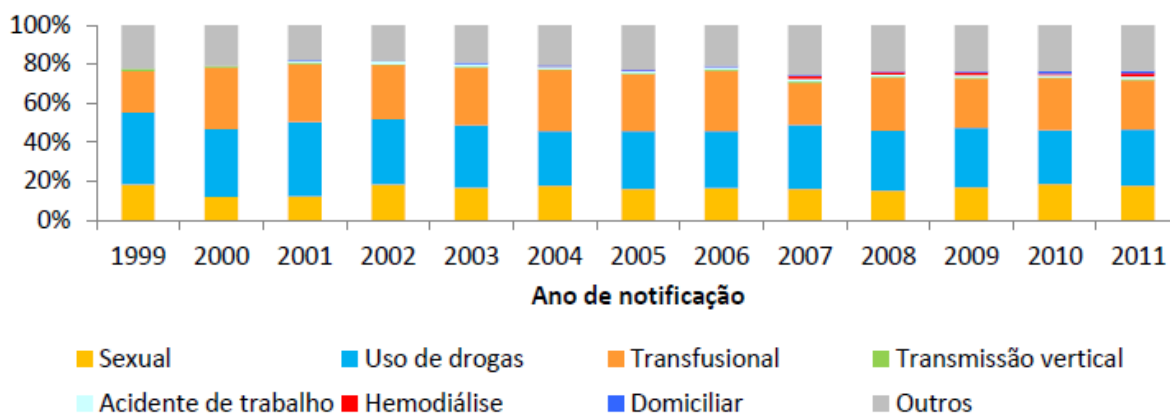


Figura 1.8. Distribuição percentual dos casos de HCV segundo provável fonte/ mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2011 (MS/SVS/ Departamento de DST, Aids, Hepatites Virais e IBGE, 2011).

1.8 Profilaxia

Na inexistência de uma vacina contra a infecção pelo HCV, são recomendadas medidas de prevenção para diminuir os riscos de contaminação. Entre estas medidas estão: a seleção de doadores de sangue, tecidos e órgão e aconselhamento para desenvolver atitudes e práticas seguras em relação à modificação do comportamento de alto risco e a precaução com sangue e fluidos corpóreos, como o uso adequado do preservativo e o não compartilhamento de instrumentos perfurocortantes e objetos de higiene pessoal - como escovas de dente, alicates de unha, barbeadores ou depiladores (MS, 2011).

1.9 Tratamento

O tratamento inicial para a infecção com HCV era realizado apenas com Interferon- α recombinante. O interferon- α (IFN α) administrado no tratamento é uma citocina que compõe a resposta inata do hospedeiro humano; a adição de uma molécula de polietilenoglicol à molécula do IFN alfa prolonga a ação, eleva a velocidade de absorção, aumenta a meia-vida reduzindo o tempo de absorção do INF no organismo. Estudos demonstraram que apenas 15% dos pacientes tratados por 6 meses com IFN recombinante foram capazes de eliminar o vírus. Entretanto, o aumento para 12 a 18 meses da terapia associando o IFN α peguilado com a ribavirina ofereceu aumento substancial na resposta viral tornando-se tratamento padrão para a doença (MS, 2011).

A conjugação do polietilenoglicol inerte ao IFN α parece alterar favoravelmente a cinética do vírus permitindo maiores intervalos nas injeções e facilitando o tratamento. Em paciente com genótipo 1, a combinação do IFN α peguilado à ribavirina registra 42% a 46% de resposta virológica sustentada, e esse percentual pode chegar a 82% em pacientes infectados com genótipos 2 ou 3. A terapia viral tende a alcançar melhores resultados em pacientes mais jovens com baixa viremia, ausência de fibroses ou cirrose (Lemon et al., 2007).

O mecanismo de ação do interferon ainda não está bem caracterizado nas infecções do HCV, entretanto, acredita-se que a estimulação dos genes associados ao interferon através dos antivirais representa grande importância para a habilidade do IFN em controlar a infecção. Os níveis de viremia tendem a baixar 8 horas após a aplicação de uma alta dosagem do IFN α recombinante. IFN γ também é capaz de inibir as ampliações dos replicons (Lemon et al., 2007).

A ribavirina (RBV) é um nucleosídeo sintético, que consiste de D-ribose acoplada a 1,2,4 triazole carboxamida. Esta droga tem um largo espectro de atividade antiviral *in vitro* contra os vírus do RNA e DNA. Acredita-se que a RBV reduza a capacidade de replicação durante o tratamento, possibilitando o desenvolvimento natural de uma resposta imunológica do hospedeiro para combater a infecção viral (MS, 2011)

No Brasil, está disponível o IFN convencional e a RBV, de produção nacional, e o PEG-IFN alfa-2a e alfa-2b, produzidos por diferentes companhias farmacêuticas.

O tratamento da hepatite C crônica tem como objetivo controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral. De forma geral, a redução da atividade inflamatória impede a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. A genotipagem do HCV é obrigatória para candidatos a tratamento, já que o mesmo é definido de acordo com o genótipo encontrado. O esquema recomendado para tratamento dos pacientes portadores de hepatite crônica C com genótipo 1 é a associação de interferon peguilado (PEG-IFN) e RBV, durante 48 a 72 semanas conforme a figura 1.9. (MS, 2011).

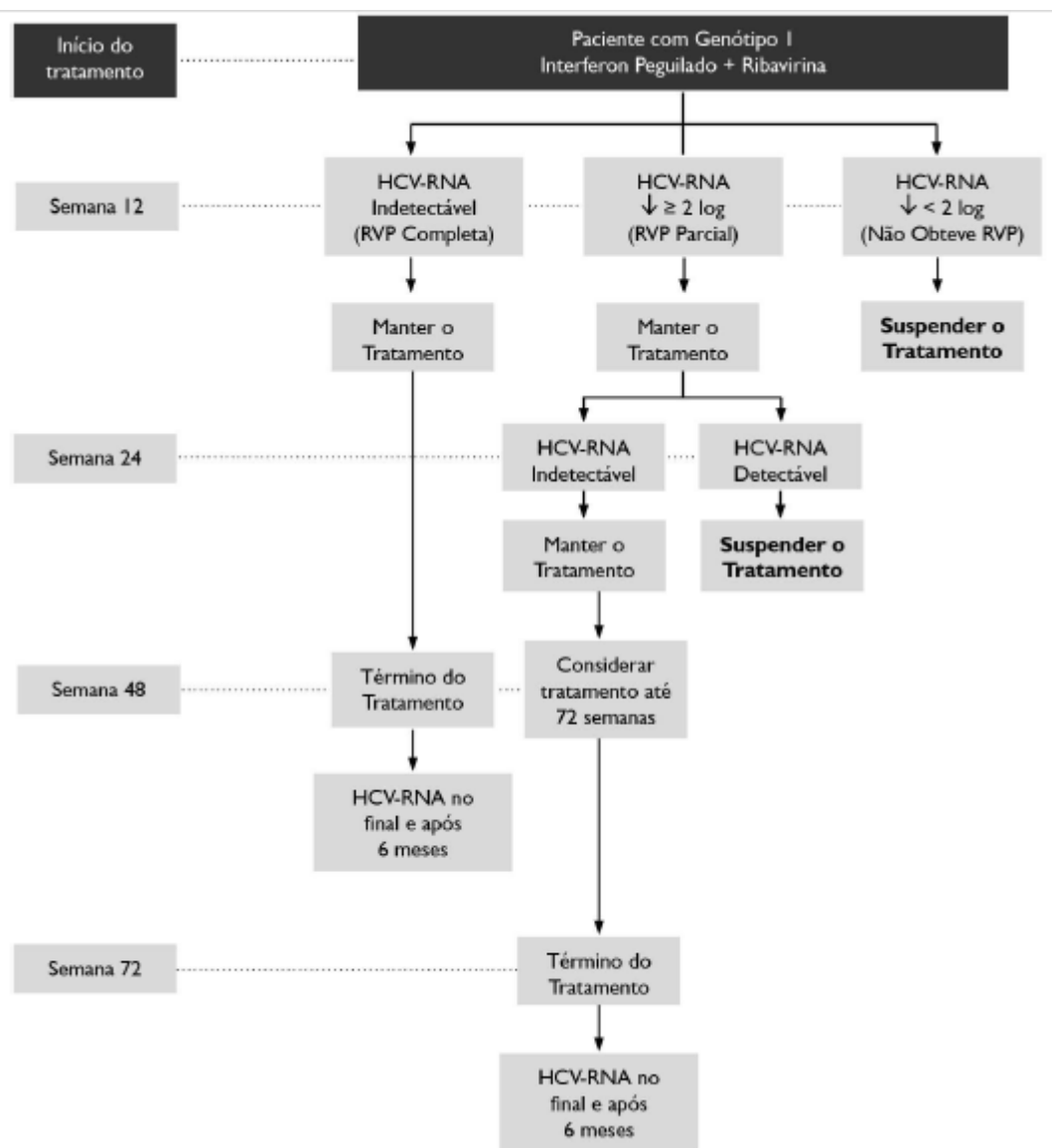


Figura 1.9 Fluxograma de tratamento da hepatite crônica C em pacientes portadores do genótipo 1 do HCV.

De forma geral, as taxas de RVS dos genótipos 2 e 3 são superiores às aquelas encontradas no genótipo 1, independentemente da estratégia de tratamento adotada. O esquema recomendado para o tratamento, na inexistência de fatores preditores de baixa RVS como, fibrose avançada ou cirrose e carga viral superior a 600.000UI/mL, é a associação de IFN convencional e RBV, durante 24 semanas. Na existência desses fatores, o esquema recomendado é a associação de PEG-IFN e RBV, durante 24 a 48 semanas conforme a figura 1.10.

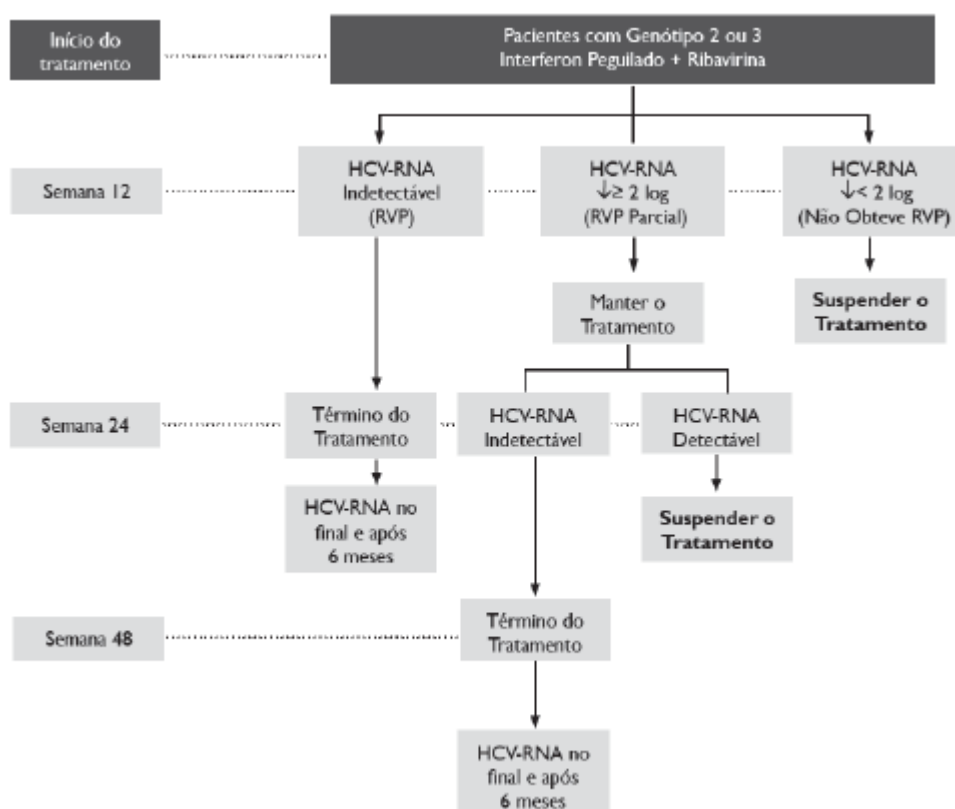


Figura 1.10 Fluxograma de tratamento da hepatite crônica C em pacientes portadores do genótipo 2 e 3 do HCV e fatores preditores de má resposta.

Os genótipos 4 e 5 são pouco frequentes no Brasil e por isso existem poucas informações sobre tratamento. O esquema recomendado de tratamento é o mesmo para os portadores de hepatite C do genótipo 1.

Em pacientes não tratados as taxas de cronificação podem chegar a 80%, sendo que 20-40% evoluem para quadro de cirrose hepática com risco de

descompensação hepática, carcinoma hepatocelular e morte. Por tais motivos, se recomenda a todos os pacientes com níveis alterados de aminotransferases (ALT) e doença hepática crônica que sejam realizados testes diagnósticos para HCV (McHutchison, 2004).

1.10 Diagnóstico

A infecção aguda da hepatite C apresenta uma evolução subclínica, pois cerca de 80% dos pacientes infectados são assintomáticos e sem icterícia. Consequentemente, a doença muitas vezes é diagnosticada acidentalmente durante triagem sorológica em doadores de sangue ou para investigação da causa do aumento da atividade enzimática das aminotransferases (Foccacia, 2007), e normalmente nestes casos, os indivíduos já se encontram na fase crônica. Aproximadamente 10 a 20% dos indivíduos apresentam sintomas inespecíficos, como anorexia, astenia, mal estar e dor abdominal. Quando presente, o quadro clínico é semelhante àquele decorrente de outros agentes que causam hepatites virais e o diagnóstico é possível apenas através de testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos (MS, 2011).

Sintomas de infecção aguda podem ter início cerca de 6 a 12 semanas após a exposição ao HCV. Em apenas 20% dos pacientes sintomáticos o início dos sintomas precede a soroconversão, a qual raramente ocorre em período superior a 6 meses. Os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT/TGP) começam a aumentar entre 2 e 8 semanas após a exposição indicando necrose dos hepatócitos e frequentemente atingem níveis superiores ao limite superior da normalidade (10 vezes), normalmente com padrão flutuante (MS, 2011) (Figura 1.11).

O HCV RNA pode ser detectado no sangue com 1-3 semanas após a exposição inicial (Figura 1.11). Dentro de 4-12 semanas, a lesão das células do fígado se manifesta pela elevação da alanina aminotransferase (ALT). A infecção aguda pode ser grave, porém raramente, fulminante. Os sintomas são inespecíficos e geralmente eles desaparecem depois de várias semanas assim como ocorre o declínio dos níveis de ALT (NIH, 2002). O nível do HCV-RNA aumenta rapidamente durante as primeiras semanas, atingindo seus níveis máximos entre 10^5 e 10^7 UI/mL,

imediatamente antes do pico dos níveis séricos de aminotransferases, coincidindo com o início dos sintomas, exceto nos assintomáticos (Figura 1.11).

O *clearance* viral espontâneo após a infecção aguda pelo HCV ocorre em cerca de 20 a 25% dos casos. Alguns fatores do hospedeiro têm sido identificados como associados ao clareamento viral espontâneo: idade abaixo de 40 anos, sexo feminino, aparecimento de icterícia e fatores genéticos (MS, 2011).

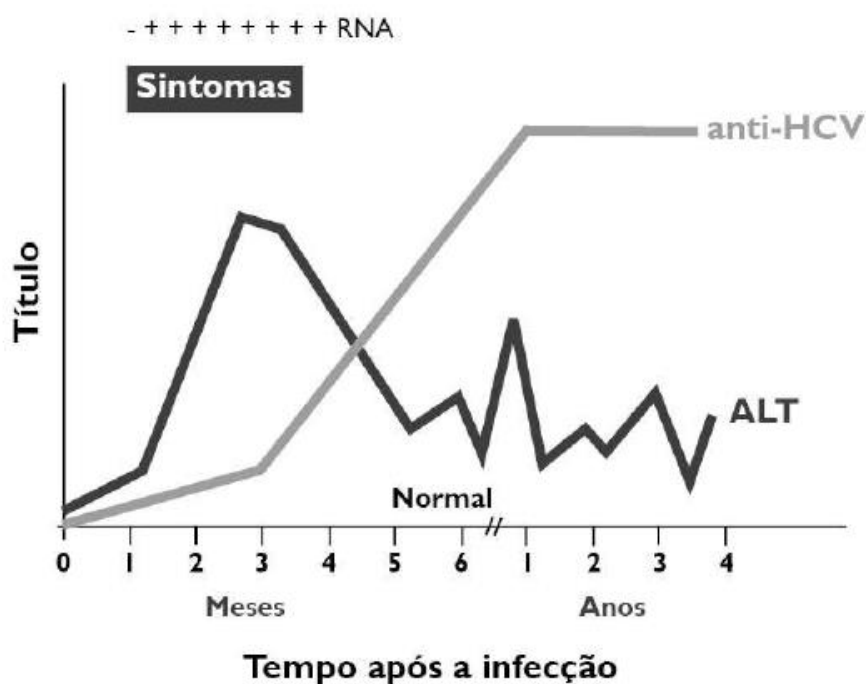


Figura 1.11. Evolução dos marcadores bioquímicos e sorológicos durante o curso da infecção pelo vírus da hepatite C (MS, 2011)

O diagnóstico do HCV baseia-se na identificação do vírus ou dos seus anticorpos, sendo utilizados dois tipos de testes: sorológicos e moleculares (Scott, 2007). Os testes sorológicos de terceira geração apresentam taxas de sensibilidade superiores a 99%, e são considerados adequados para identificar pacientes crônicos. Resultados sorológicos positivos necessitam dos testes moleculares de detecção de ácidos nucleicos a fim de confirmar cronificação. Nos casos de hepatite C aguda, é essencial a detecção e quantificação do HCV RNA que terá papel importante para determinação do tempo, tipo e sucesso esperado do tratamento (Terrault, 2005).

1.10.1 Testes Sorológicos

Os dois principais testes sorológicos são o ensaios imunoenzimáticos (EIE) e o immunoblot recombinante (RIBA), que se baseiam na detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos virais, estruturais e não-estruturais, no soro ou plasma de indivíduos infectados. Por meio de diversos métodos, dentre eles o EIE, os anticorpos anti-HCV são revelados. Os anticorpos anti-HCV são detectáveis de 4 a 10 semanas após o contato com o vírus, persistindo uma vez que a infecção tende a seguir para um curso crônico (Filho, Galizzi, 2008).

A primeira geração de EIE permitia a detecção apenas de anticorpos contra a região NS4, com a utilização do antígeno recombinante c100-3. Com o desenvolvimento da segunda geração de testes, foram adicionados antígenos na região central e foram utilizadas a região NS3 e uma parte do c100-3 (chamado 5-1-1) da região NS4. A terceira geração incluiu um antígeno adicional da região NS5 e uma reconfiguração dos antígenos do core e NS3 (Kesli et al., 2009). Recentemente desenvolvida, a quarta geração de testes permite a detecção simultânea anticorpos anti-HCV e antígenos do core viral (Gonçales; Gonçales Jr. 2007).

A janela imunológica foi reduzida significativamente com a introdução dos EIE de quarta geração. A quarta geração de testes pode detectar anticorpos a partir 14 a 20 dias de infecção, comparados com 28 a 70 dias da terceira, 82 dias da segunda e 150 dias da primeira geração (Lambert, 2007).

Os testes disponíveis no mercado capazes de detectar anticorpos anti-HCV apresentam especificidade maior que 99% e sensibilidade entre 95-99% (Gonçales; Gonçales Jr. 2007). Os testes que detectam antígeno e anticorpo apresentam sensibilidade de 100% e especificidade igual ou maior que 99,5% (Lambert, 2007).

Pacientes imunossuprimidos podem não apresentar sorologia reagente (anti-HCV), em virtude da diminuição ou ausência da produção de anticorpos. Nesses casos, o diagnóstico deverá ser realizado por meio de testes moleculares (MS, 2011).

1.10.2 Testes Moleculares

A partir de 1997, a Organização Mundial da saúde (OMS) estabeleceu um padrão internacional de conversão da quantificação de carga viral para o HCV conhecido como Unidade Internacional (UI) que permite que os diferentes sistemas de detecção do vírus, mesmo que apresentem resultados quantitativos em concentrações distintas possam ser convertidos em um padrão único para avaliação e comparação.

São testes de amplificação de ácidos nucleicos, denominados HCV RNA, que permitem detectar o RNA viral de todos os genótipos e subtipos descritos do HCV. Esses testes podem ser qualitativos, quando apenas detectam a presença do RNA viral, ou quantitativos, quando quantificam o RNA viral.

1.10.2.1 Ensaio qualitativo para detecção do HCV RNA.

Os ensaios qualitativos indicam a presença ou ausência do vírus e são indicados no diagnóstico confirmatório da hepatite C quando os anticorpos do HCV são positivos em testes sorológicos. Podem ser utilizados também para confirmação de resposta virológica sustentada (RVS), definida pela ausência do RNA detectável, após o tratamento com antivirais bem como em triagem para doação de sangue e órgãos. Diversos fluxogramas para diagnóstico e confirmação de casos de hepatite C, tais como aqueles preconizados pelo CDC (Centro de Controle de doenças) e Ministério da Saúde, sugerem que após confirmação pelo teste qualitativo, os pacientes sejam conduzidos a testes quantitativos que visam à detecção da carga viral. Existem diferentes técnicas disponíveis de detecção qualitativa do RNA do HCV:

- a) RT-PCR qualitativo: teste baseado na PCR com transcrição reversa, quando o HCV RNA é utilizado como matriz para a síntese da fita complementar (cDNA) por transcrição reversa. Posteriormente, o cDNA é amplificado pela ação da DNA polimerase em múltiplas cópias de DNA dupla fita. Esses testes são capazes de detectar

até 50 UI/mL do HCV RNA com sensibilidade igual para qualquer genótipo (Lange, Sarrazin, 2010).

- b) TMA: Amplificação mediada por transcrição é uma metodologia muito sensível (96-100%) com limites de detecção inferiores a 5-10 UI/mL e especificidade superior a 99% independente do genótipo. Esse teste ocorre em 3 etapas: captura do alvo, amplificação e detecção específica dos amplicons por hibridização. Nele são utilizados 2 iniciadores, o iniciador contendo o promotor T7 hibridiza com o RNA viral resultando na síntese do cDNA mediado pela transcrição reversa. A transcrição reversa favorece a ativação de RNases que degrada o RNA resultante da fita híbrida. O segundo iniciador se liga ao cDNA que já contém o promotor T7 e a dupla fita é sintetizada. Em seguida, a RNA polimerase reconhece a região T7 e os transcritos de RNA que subsequentemente retornam ao ciclo do TMA são amplificados exponencialmente (Figura 1.12). Um teste TMA disponível comercialmente é o Versant™ HCV RNA Qualitativos (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Alemanha) (Lange, Sarrazin, 2010).

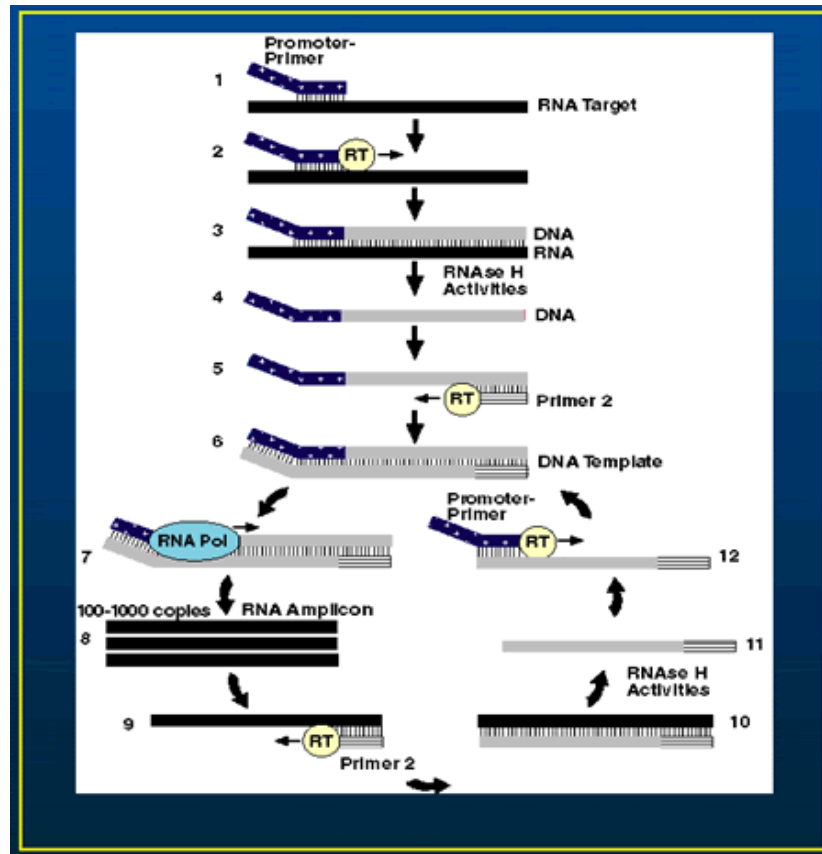


Figura 1.12. Esquematização do ensaio qualitativo aplicando a metodologia de TMA.

1.10.2.2 Ensaio quantitativos para detecção do HCV RNA.

A quantificação do HCV RNA pode ser obtida através de técnicas de amplificação do sítio alvo, como a PCR em tempo real ou amplificação de sinal, ou o DNA ramificado. Atualmente no mercado estão disponíveis os testes Cobas Taqman HCV (Roche) e *Abbot Real Time™* HCV (Abbott) que utilizam a PCR em tempo real e o teste *Versant™* HCV RNA (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Alemanha) que utiliza a metodologia de DNA ramificado (bDNA).

I.DNA Ramificado (*branched* DNA ou bDNA): Essa técnica baseia-se na detecção por amplificação de sinal. Na reação, após a transcrição reversa do HCV RNA, a fita complementar resultante liga-se a oligonucleotídeos com seqüência específicas de região conservada do genoma do HCV. Em seguida, múltiplos oligonucleotídeos se ligam às terminações livres da dupla fita do DNA e são hibridizadas

por cópias múltiplas de uma sonda de fosfatase alcalina. A detecção então é alcançada pela incubação desse complexo com um substrato quimioluminescente (Sarrazin, 2002). O limite de detecção da versão atual 3.0 do Versant™ HCV RNA (Siemens) é de 615 UI/mL (Lange, Sarrazin, 2010).

II. PCR em tempo Real: A PCR em tempo real realiza a quantificação de ácidos nucleicos de maneira mais precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (C_T), permitindo a quantificação exata baseada na fluorescência (Figura 1.13). A emissão dos compostos fluorescentes aumenta proporcionalmente à quantidade de produto da PCR. As metodologias mais empregadas são *SYBR® Green* e TaqMan. A PCR em tempo real consiste numa plataforma contendo um termociclador com sistema óptico capaz de coletar a emissão de fluorescência e um computador com programa para aquisição e análise dos dados.

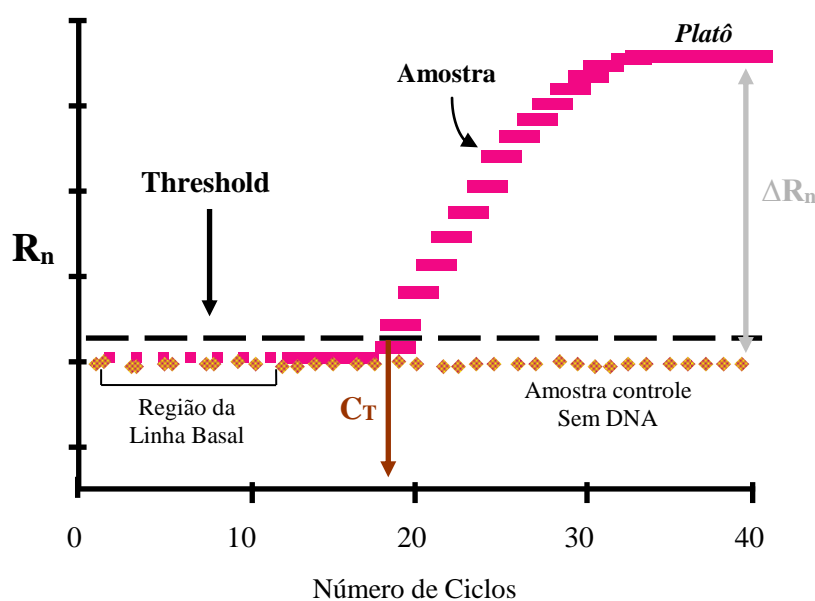


Figura 1.13. Curva de Amplificação da PCR em tempo real demonstrando 3 fases distintas: (1) Linha Basal: não há produto da PCR suficiente para ser detectado pela fluorescência, (2) Fase log: a quantidade do produto da PCR dobra a cada ciclo, (3) Fase Platô: não há mais aumento no número de produtos.

- a) TaqMan: A metodologia TaqMan apresenta uma sonda que consiste em um fragmento de DNA específico para a região alvo que apresenta em sua região 5' um fluoróforo e em sua extremidade 3' um *quencher*, molécula que aceita energia em forma de luz e a dissipa. Durante a PCR em tempo real, a sonda se liga a seqüência de fita simples do DNA alvo e é degradada pela ação de 5' exonuclease da *TaqDNA* polimerase, separando fisicamente o *quencher* do fluoróforo. A separação resulta no aumento da fluorescência, assim durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada exponencialmente e captada pelo equipamento permitindo a quantificação da região alvo (Figura 1.14). Hibridização específica entre sondas e alvo é necessária nessa técnica para emissão da fluorescência, logo permite redução de falsos positivos e interferentes no ensaio (Novais, Pires-Alves e Silva, 2004; Lange, Sarrazin, 2010) Outra vantagem da metodologia é a possibilidade de amplificação de diferentes alvos em uma mesma amostra, uma vez que é possível associar diferentes sondas e reporteres. O processamento pós PCR também é eliminado, o que reduz o risco de contaminação e os custos de material de ensaio (Life Technologies, 2012).

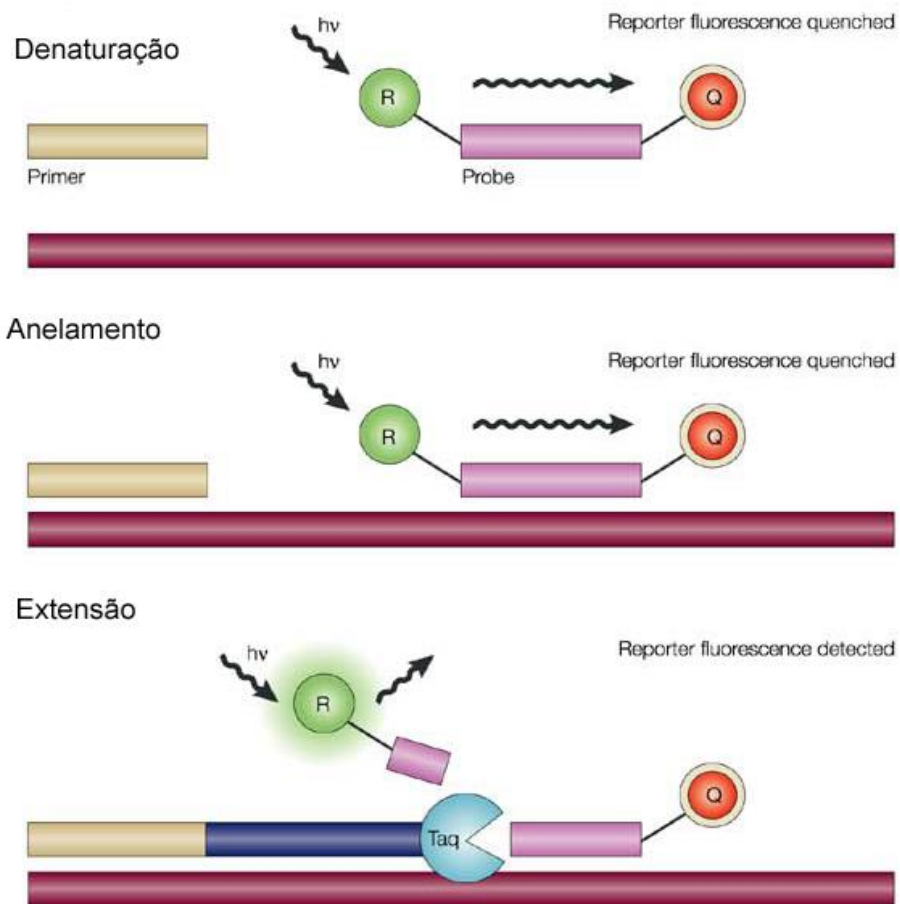


Figura 1.14 PCR em tempo real com sonda TaqMan. (Q). Quencher, (R). Reporter (Koch, 2004)

b) SYBR Green: O corante SYBR Green se liga entre a fita dupla do DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. No começo da reação de amplificação a mistura contém DNA desnaturado, iniciadores e o SYBR Green. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. A reação é monitorada continuamente, e o aumento da fluorescência observado em tempo real (Figura 1.15). A principal desvantagem relativa a essa metodologia é que por se ligar a todo DNA dupla fita, incluindo dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, esse pode superestimar a concentração do fragmento. Entretanto, apresenta um custo mais baixo, maior facilidade no uso e sensibilidade em comparação a metodologia TaqMan.

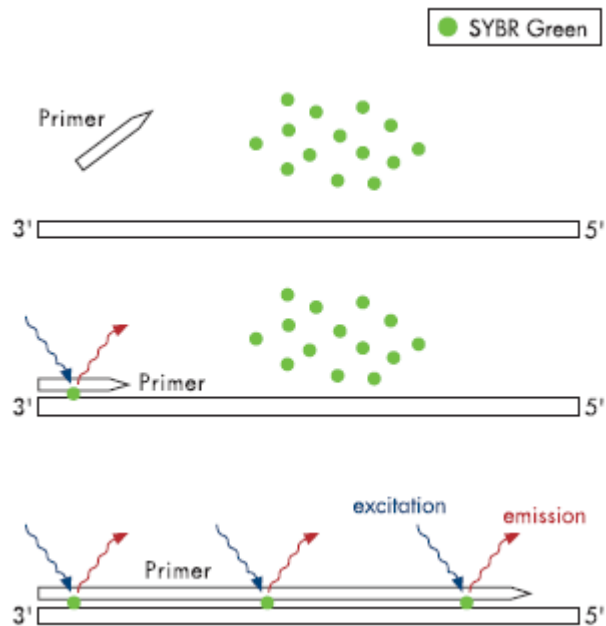


Figura 1.15. PCR em tempo real com o princípio da metodologia de SYBR Green, demonstrando que durante a polimerização as moléculas de SYBR Green se ligam ao DNA dupla fita gerando uma excitação e emitindo fluorescência (QIAGEN, Hilden, Germany, 2013).

O Ministério da Saúde (2011) recomenda o uso de métodos quantitativos para confirmar diagnóstico de hepatite C, caracterizar transmissão vertical, definir possíveis vias de transmissão (casos de acidentes com materiais biológicos), monitoramento clínico e avaliação da resposta virológica.

1.11. Uso de amostras de sangue coletado em papel de filtro

A coleta de amostras de sangue é necessária para estabelecimento do diagnóstico etiológico da infecção pelo HCV, porém há necessidade de pessoal treinado para a realização da punção venosa, além de infraestrutura para coleta dentro das condições de biossegurança. Estas condições nem sempre estão disponíveis em áreas distantes do laboratório.

O conceito de sangue capilar obtido por punção digital em papel de filtro surgiu na década de 1960, na Escócia, por Robert Guthrie para o rastreio de

doenças metabólicas em grandes populações de recém-nascidos. Desde então, amostras de sangue coletadas em papel de filtro (SPF) foram coletados rotineiramente de crianças recém-nascidas em mais de 20 países para detecção de fenilcetonúria e, mais recentemente, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e infecção pelo HIV (Parker & Cubitt, 1999).

O uso de amostras de SPF para o diagnóstico de desordens metabólicas congênitas em recém-natos foi introduzido no Brasil em 1976, pelo pediatra Benjamin J. Schmidt e se tornou obrigatório em todo o país em 1990, através da lei federal n. 8.069/90. Em 2001 o Ministério da Saúde criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal.

O SPF pode ser preparado aplicando cuidadosamente poucas gotas de sangue fresco coletado por punção venosa, ou pela punção digital com lanceta retrátil em um papel de filtro absorvente. O sangue é saturado no papel, seco a temperatura ambiente por 4 horas, e encaminhado dentro de um envelope para o laboratório.

A grande vantagem da utilização de papel de filtro para o diagnóstico da hepatite C é a facilidade na coleta tornando esta uma alternativa satisfatória e conveniente, principalmente em estudos populacionais em larga escala em áreas remotas, pois requer espaço mínimo de estocagem, apresenta pouco risco biológico, é menos onerosa, e facilita o transporte das amostras.

2.0 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo vírus da hepatite C foi identificada como um problema de saúde pública com 170 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo (Lavanchy, 2009). Os testes moleculares representam uma importante ferramenta de detecção, quantificação e caracterização do tipo viral. O desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis e de baixo custo é muito importante para aumentar o acesso ao diagnóstico, assim como definir e monitorar o tratamento antiviral.

A utilização de sangue venoso é fundamental para a realização de praticamente todos os ensaios diagnósticos para HCV e embora relativamente simples em se tratando de um ambiente clínico, ela exige profissionais treinados, insumos e equipamentos para coleta da amostra, processamento e armazenamento, representando um problema para locais mais remotos e com pouca infraestrutura. Amostra de sangue coletada por punção digital e absorvidas em papel de filtro, chamadas como sangue em papel de filtro ou sangue seco, tem algumas vantagens sobre o sangue venoso, pois exigem volumes menores de sangue, são simples de serem coletadas, não necessitam de profissionais com experiência, não requerem instalações para centrifugação e possuem boa estabilidade podendo ser armazenadas e transportadas à temperatura ambiente, além de diminuição do risco biológico referente à coleta.

A detecção de marcadores para hepatite C em SPF foi inicialmente demonstrada por Parker e colaboradores em 1997. Desde então, vários estudos têm sido feitos, utilizando amostras de SPF para a detecção de marcador para hepatite C (Parker et al., 1997; Abe e Konomi, 1998; Montebugnoli et al., 1999; McCarron et al., 1999; Parker et al., 1999; Solmone et al., 2002; Mendy et al., 2005; Toledo et al., 2005; Croom et al., 2006; Marques et al., 2012). Nestes estudos, diferentes percentuais de sensibilidade, grupos de indivíduos e testes de detecção foram relatados.

A detecção do HCV RNA em papel de filtro já foi relatada previamente (Tuailon et al., 2010; De Crignis et al., 2010; Bennet et al., 2012; Santos et al., 2012). No estudo de Tuailon e colaboradores foi possível observar 96.7% de concordância na detecção do HCV RNA em papel de filtro comparado com o soro. Neste mesmo estudo, observaram que a amostra é estável por até 6 dias à -20°C,

tempo máximo de estabilidade testado. O HCV RNA também foi detectado em amostras de SPF utilizando a metodologia de SYBR Green RT-PCR (De Crignis et al., 2010), onde foi possível detectar o HCV RNA em 15 das 16 amostras analisadas contaminadas com o vírus. No estudo de Bennet e colaboradores (2012), o limite de detecção do HCV RNA pelo método PCR em tempo real utilizando a metodologia TaqMan foi de 250 UI/mL em amostras de papel de filtro e a sensibilidade e especificidade encontradas foram 100% e 95,8%, respectivamente. Santos et al. (2012) realizaram estudos para detecção do RNA do HCV com amostras de SPF provenientes de pacientes em tratamento com hepatite C crônica no Brasil encontrando taxas de 98% de sensibilidade e 94,3% de especificidade para a metodologia *in house* utilizada.

Pelo exposto, é fundamental desenvolver métodos de diagnóstico para hepatite C que sejam mais baratos e possam ser utilizados para detecção do vírus em fluidos alternativos, tal como, o sangue em papel de filtro.

3.0 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é otimizar protocolos para detecção e quantificação do vírus da hepatite C em amostras de sangue coletado em papel de filtro em métodos moleculares a fim de facilitar o acesso ao diagnóstico em áreas distantes de grandes centros.

3.2. Objetivos Específicos

- Testar diferentes conjuntos de extração de RNA para determinar o mais adequado para detecção de HCV em SPF
- Quantificar o RNA do HCV em amostras de sangue coletado em papel de filtro utilizando a metodologia de RT-PCR em tempo real para a região 5'NC do genoma do HCV;
- Comparar a carga viral das amostras pareadas de soro e de sangue coletado em papel de filtro para verificar se existe correlação entre a carga viral presente nestes dois tipos de espécimes clínicos;
- Avaliar sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e presença de inibidores como parâmetros de qualidade dos protocolos moleculares desenvolvidos para detecção e quantificação de HCV
- Detectar e genotipar o RNA do HCV em amostras de sangue coletado em papel de filtro utilizando a metodologia de RT-PCR e sequenciamento.

4.0 METODOLOGIA

Este trabalho está inserido no projeto “Padronização de testes imunoenzimáticos e moleculares para o diagnóstico das hepatites B e C em sangue coletado em papel de filtro”, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, segundo resolução 196/96, sob nº 459/08 (ANEXO I).

4.1. Amostra Populacional

Para a realização deste estudo, foram obtidas amostras pareadas de soro e sangue coletado em papel de filtro (SPF), entre o período de 2010 a 2012, de:

- 59 indivíduos com hepatite C crônica (anti-HCV/HCV RNA detectado no soro por mais de 6 meses) atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Laboratório de Hepatites Virais (LAHEP/IOC/Fiocruz) e no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ).
- 30 indivíduos não reagentes para hepatite C ou hepatite B
- 10 indivíduos com sorologia reagente para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Estes indivíduos foram recrutados no LAHEP/IOC/FIOCRUZ e HUCFF/UFRJ

Como critérios de inclusão, os participantes do estudo poderiam ser de qualquer sexo ou raça, e teriam que concordar em participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento pós-informação (Anexo II), conforme resolução nº 01, de 13 de junho de 1988 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde. Os critérios de exclusão seriam aqueles que não preencheram os critérios de inclusão citados.

Um questionário contendo dados epidemiológicos e socioeconômicos, bem como informações relativas às características individuais e fatores de risco foi aplicado a todos os participantes do estudo a fim de caracterizar da população de estudo envolvida.

4.2. Coleta e preparo das amostras biológicas

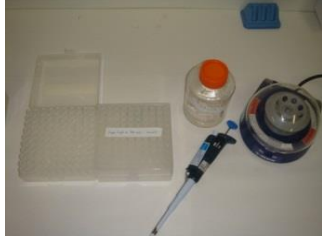
De cada voluntário, foram coletados dois tubos de sangue venoso por punção venosa periférica (*Vacutainer* (BD, Franklin Lakes, Nova Jersey), um deles contendo anticoagulante (EDTA) para obtenção de sangue total, e outro contendo gel separador para obtenção do soro. Posteriormente, 75 µL do sangue total obtido foram transferidos para cada círculo do papel de filtro Whatman .903 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) que apresenta tamanho de 12,5 mm de diâmetro. As amostras de SPF foram mantidas a temperatura ambiente por 4 horas, e depois foram acondicionadas em saco plástico tipo Ziplocks com dessecante à temperatura de -20°C até o momento da extração do eluato.

4.2.1 Processamento das Amostras de Soro

O tubo de sangue contendo o gel separador foi centrifugado a 1701,28 x g em centrífuga Biofuge® Primo, Thermo Scientific, EUA (3500 rpm, raio médio 124 mm) à temperatura de 25°C durante 10 minutos. O soro sobrenadante obtido de cada amostra foi acondicionado em um microtubo de 2 mL previamente identificado e armazenado à temperatura de -20°C até a realização das análises.

4.2.2 – Processamento amostras de SPF para testes sorológicos

Para preparar o eluato do SPF, um disco de 3 mm de diâmetro de papel de filtro foi recortado, transferido para um microtubo 1,5mL e incubado por 18 a 24 horas com 300 µL de tampão PBS/BSA 0,5%. Após a incubação, uma ponteira de pipeta foi utilizada para transferir o disco e o tampão de eluição para o sistema de centrifugação correspondente. O sistema consistiu em um tubo de centrifuga de 15 mL de capacidade que continha um microtubo de 1,5mL e uma seringa de 3 mL sem o êmbolo. As amostras foram centrifugadas a 1249,92 x g em centrífuga Biofuge primo (3000 rpm, raio médio 124 mm) à temperatura ambiente de 25°C por 5 minutos. Os microtubos contendo os eluatos foram removidos do interior dos tubos da centrífuga, utilizando uma ponteira de pipeta e estocados a -20°C até o momento de uso (Figura 4.1) (Mercader; Featherstone; Bellini, 2006).



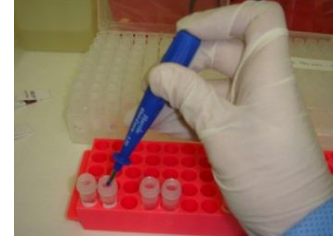
1. Preparo do material



2. 300 µL do tampão de eluição no microtubo



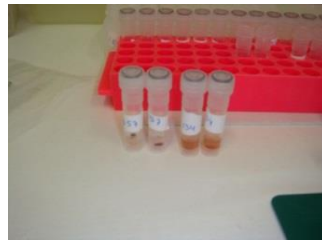
3. Corte do papel de filtro



4. Transferência para microtubo de 1,5 mL



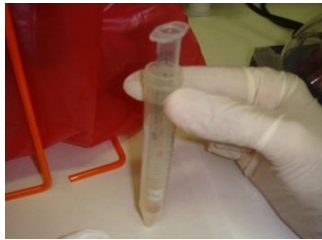
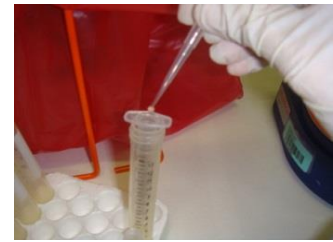
5. Homogeneização



6. Antes e após 18 a 24h de incubação a 2-8°C



7. Tubo de 15 mL e seringa de 3 mL sem êmbolo e transferência do disco 3 mm



Sistema pronto



8. Centrifugação a 3.000 rpm (1249,92 x g) por 5 minutos



9 .Eluato pronto para uso ou congelamento a -20°C

Figura 4.1. Procedimento de eluição do SPF (Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais - LRNHV).

4.3 Ensaio imunoenzimáticos

As amostras de soro e SPF foram submetidas a ensaio imunoenzimático comercial para detecção de anticorpos anti-HCV: HCV Ab Radim (Itália). Para as amostras de soro, o protocolo recomendado pelo fabricante foi seguido, enquanto para as amostras de SPF foram necessárias modificações (Marques, 2012).

4.3.1 – Pesquisa de anti-HCV no soro

O teste de detecção de anticorpos anti-HCV do fabricante Radim baseia-se na ligação de anticorpos anti-HCV da amostra de soro aos antígenos específicos derivado das regiões core e NS codificadas do genoma do HCV e determinantes antigênicos imunodominantes (peptídeo core, peptídeos NS3, NS4 e NS5 recombinantes), que estão capturados na microplaca. Estes anticorpos se ligam aos anticorpos humanos policlonais (cabra), imunoglobulinas G e M (IgG e IgM), conjugados com a enzima peroxidase de rábano (HRP) e, em seguida, a peroxidase reage com o cromógeno (tetrametilbenzidina) / substrato (peróxido de

hidrogênio), gerando um sinal ótico (coloração) que é proporcional à quantidade de anticorpos anti-HCV presentes na amostra de soro. O resultado final das amostras é dado em densidade ótica (D.O.) obtida pela leitura em espectrofotômetro 450-620nm. Para o teste de detecção de anticorpos anti-HCV (Radim), adiciona-se 200 µL de controle negativo em triplicata, 200 µL de calibrador em duplicata e 200 µL de controle positivo em uniplicata em cada microcavidade. Nas demais microcavidades, adiciona-se 200 µL do diluente de amostra e 10µL da amostra de soro. Em seguida, acrescenta-se 50 µL do diluente de ensaio em todas as microcavidades e procede-se a incubação por 45 minutos a 37°C. Após a incubação, cada cavidade da microplaca é lavada 5 vezes com 350 µL de solução de lavagem (Fosfato 10mM a pH 7,0 +/-0,2 e 0,05% Tween 20 e 0,05% Kathon GC). Em seguida, ocorrem as etapas de adição de conjugado enzimático, incubação e lavagem; adição de cromógeno/substrato, incubação, e finalizando, a reação é interrompida com ácido sulfúrico e a intensidade de cor da solução é medida em um espectrofotômetro com um filtro de 450nm com referencia de 620-630 nm (Radim Itália).

4.3.2 Pesquisa de anti-HCV em SPF

Para a detecção do anti-HCV em SPF utilizando a técnica de ELISA, o volume de amostra foi modificado, onde adicionamos 100 µL do diluente de amostra e 110 µL da amostra de SPF. Todos os demais procedimentos permaneceram inalterados.

4.4. Extração do RNA do HCV

4.4.1 Extração do RNA do HCV em amostras de Soro

O RNA do HCV das amostras de soro utilizadas nesse estudo foi extraído utilizando o conjunto comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Esta metodologia comercial de purificação do RNA viral utiliza colunas de membrana de sílica-gel e centrifugação. Todas as amostras de soro desse estudo foram submetidas a este protocolo para extração do RNA viral. Conforme protocolo do fabricante, 140 µl de amostra foi misturado com 560 µL de tampão AVL ("Viral Lysis buffer"), e incubado à

temperatura ambiente por 10 minutos para a desnaturação do material, inibição de RNases e isolamento do RNA.

Posteriormente foram adicionado 560 μL de etanol 100% no tubo contendo a mistura para lavagem do material. O material foi transferido para coluna de sílica e centrifugado 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto (Microcentrifuga 1-14 Edition, Sigma). Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 500 μL do tampão AW1 (“Washer buffer 1”) para lavagem da coluna, houve outra centrifugação de 8000 rpm por 1 min. Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Foram adicionados 500 μL do tampão AW2 (“Washer buffer 2”) para segunda lavagem; as colunas foram centrifugadas à 14000 rpm durante 4 min e mais uma vez o tubo coletor foi removido. Após colocar tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL na parte inferior da coluna, foram adicionados 60 μL do tampão AVE (“Elution buffer”) para eluir o RNA e as colunas foram submetidas à centrifugação de 8000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral foram estocados a -70°C até o momento de sua utilização na síntese do DNA complementar.

4.4.2 Extração do RNA do HCV em amostras de SPF

Para determinação do método de extração do RNA viral mais eficiente para as amostras de SPF uma diluição seriada foi realizada, onde uma amostra de soro HCV RNA reagente (carga viral igual a $3,22 \times 10^6\text{UI/mL}$) foi diluída em sangue total proveniente de indivíduo sem infecção pelo HCV. A partir daí uma diluição seriada foi realizada obtendo assim painel controle com 5 amostras de SPF com carga viral estimada de $3,22 \times 10^5\text{UI/mL}$ a $3,22\text{UI/mL}$. Um volume de 75 μL deste sangue foi aplicado em cada círculo do papel de 12,5mm de diâmetro. Adicionalmente 75 μL do sangue total não infectado foi também aplicado no papel e empregado como controle negativo.

Estas amostras foram secas por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida o RNA viral foi extraído utilizando os seguintes conjuntos de diagnóstico: (I) QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), (II) QIAamp DNA Mini Kit / QIAamp

DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha-), (III) SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), (IV) Genomic DNA from Blood (Nucleospin, Alemanha), (V) Dried Blood Spot (DBS) Genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biokit Corp, Canadá), (VI) Fenol-Cloroformio (Maniatis et al., 1989) , (VII) Metanol (Bereczky et al., 2005).

I. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha)

Esta metodologia comercial de purificação do RNA viral utiliza colunas de membrana de sílica-gel e centrifugação. Todas as amostras de soro desse estudo foram submetidas a este protocolo para extração do RNA viral conforme descrito no item 4.4.1.

Para a extração do RNA do HCV em SPF, 3 círculos de papel de filtro com diâmetro de 3mm cada foram acondicionados em tubo cônico estéril contendo 140µL de água e a solução foi mantida a 2 a 4°C por 10 minutos. Este material foi empregado no conjunto de diagnóstico Qiaamp Viral RNA Mini kit seguindo protocolo recomendado pelo fabricante, porém o RNA foi eluído em 30µL de tampão AVE.

II. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha)

O QIAamp DNA Mini Kit baseia-se na purificação do DNA por colunas de membrana de sílica-gel e centrifugação, apesar de ser um conjunto que visa a purificação de DNA, nele encontra-se protocolo empregado para sangue seco coletado em papel de filtro. Logo, o protocolo recomendado pelo fabricante foi seguido, onde três círculos de 3mm de diâmetro cada de SPF foram acondicionados em tubos cônicos estéreis contendo 180 µL de tampão de ATL (tampão de lise) e a mistura foi incubada a 85°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução de proteinase K à mistura, que foi homogeneizada e incubada a 56°C por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de Tampão AL e a mistura foi incubada à 70°C por 10 minutos. Seguiu-se, então, a adição de 200 µL de etanol (96- 100%) à amostra e a mesma foi homogeneizada. O material foi transferido para as colunas de sílica. Estas colunas foram centrifugadas a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto (Microcentrifuga 1-14 Edition, Sigma).

Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 500 μ L do tampão AW1 (“Washer buffer 1”) para lavagem da coluna, houve outra centrifugação de 8000 rpm (6000 x g) por 1 min. Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Foram adicionados 500 μ L do tampão AW2 (“Washer buffer 2”) para segunda lavagem; as colunas foram centrifugadas à 14000 rpm (20000 x g) durante 4 min e mais uma vez o tubo coletor foi removido. Após colocar tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL na parte inferior da coluna, foi adicionado tampão AVE (“Elution buffer”) para eluir o material genético e as colunas foram submetidas à centrifugação de 8000 rpm (6000 x g) por 1 min. O fabricante preconiza a utilização de 150 μ L do tampão AVE, porém a fim de aumentar a concentração de material genético, foi feita eluição com 30 μ L do tampão AVE. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral foram estocados a -70° C até o momento de sua utilização na síntese do DNA complementar.

III. SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA)

Para esta metodologia que se baseia na purificação por colunas de sílica gel e centrifugação, um círculo de 6mm de diâmetro de SPF foi misturado com 100 μ L água e esta mistura foi incubada a 2 a 4 $^{\circ}$ C por 10 minutos para recuperação do sangue. Posteriormente, o líquido obtido foi dispensado em um novo tubo contendo 175 μ L de Tampão de lise de RNA, e em seguida foi adicionado 350 μ L de tampão de diluição de RNA (RNA Dilution Buffer), conforme recomendação do fabricante. A amostra foi homogeneizada e incubada a 70 $^{\circ}$ C por 3 minutos seguida por centrifugação a 12,000xg por 10 minutos. O material lisado foi transferido para um novo tubo contendo 200 μ L de etanol 95% e homogeneizada. A mistura foi, então, transferida para colunas de sílica e foi feita nova centrifugação a 12,000xg por 1 minuto.

Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 600 μ L da solução de lavagem de RNA (“RNA Wash solution”) para lavagem da coluna, houve outra centrifugação de 12000 x g por 1 min. Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram

recolocados. Foram adicionados 600 μ L solução de lavagem de RNA (“RNA Wash solution”) para segunda lavagem; as colunas foram centrifugadas à 14000 rpm durante 2 min e mais uma vez o tubo coletor foi removido. Após colocar tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL na parte inferior da coluna, foram adicionados 40 μ L de água livre de nucleases para eluir o RNA e as colunas foram submetidas à centrifugação de 12000 x g por 1 minuto. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral foram estocados a -70° C até o momento de sua utilização na síntese do DNA complementar.

IV. Nucleospin Blood (Macherey-Negel, Alemanha)

Para esta extração, colunas de membrana de sílica-gel e centrifugação foram empregadas. O procedimento emprega 200 μ L de sangue total, para utilização em papel de filtro, empregamos um círculo de SPF de 6mm de diâmetro que foi acondicionado em um tubo cônico estéril contendo 200 μ L de água livre de nucleases. A mistura foi homogeneizada e incubada a 2 a 4 $^{\circ}$ C por 10 minutos. A seguir, 25 μ L da solução de proteinase k e 200 μ L do tampão B3 (tampão de lise) foram adicionados à mistura e realizada uma incubação a 20-25 $^{\circ}$ C por 5 minutos seguida de outra incubação a 70 $^{\circ}$ C por 10 min.

Posteriormente, 210 μ L de etanol (96-100%) foram adicionados à mistura que foi transferida para o tubo contendo a coluna de sílica gel. Após centrifugação a 11.000 x g por 1 min, os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 500 μ L do tampão BW (solução de lavagem) para lavagem da coluna, houve outra centrifugação de 11000 x g por 1 min. Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Foram adicionados 600 μ L de tampão B5 (solução de lavagem) para segunda lavagem; as colunas foram centrifugadas a 11000 X g por 1 minuto e o filtrado descartado. Foi feita nova centrifugação à 11000 X g por 1 minuto e o tubo coletor foi removido. Após colocar tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL na parte inferior da coluna, foram adicionados 100 μ L de tampão BE pré-aquecido a 70 $^{\circ}$ C para eluir o RNA, feita uma incubação a 20-25 $^{\circ}$ C por 1 minuto e as colunas foram submetidas à centrifugação de 11000 x g por 1 minuto. Posteriormente, as

colunas foram descartadas e os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral foram estocados a -70°C até o momento de sua utilização na síntese do DNA complementar.

V. Dried Blood Spot (DBS) Genomic DNA Isolation Kit (*Norgen Biokit Corp, Canadá*)

O conjunto de extração DBS Genomic DNA Isolation Kit foi desenvolvido para obtenção de DNA genômico a partir de gotas de sangue seco, sem necessidade de centrifugação. A purificação é baseada no uso de resina como matriz de separação, esta é altamente densa, permitindo que o material se deposite rapidamente e de forma eficiente usando a gravidade e eliminando a necessidade de centrifugação. Para este procedimento, três círculos de SPF de diâmetro de 3mm foram acondicionados em microtubos estéreis contendo $450\mu\text{L}$ da solução de Lise (lysis solution) e $30\mu\text{L}$ de proteinase K. A mistura foi homogeneizada e incubada à 60°C por 20 minutos. Esta mistura foi transferida para um novo tubo contendo $450\mu\text{L}$ da solução de ligação e resina (Slurry/binding solution), homogeneizada e incubada verticalmente por 10 minutos à 60°C .

O sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta, e a resina contendo o material genético ligado foi acondicionada em novo tubo contendo $500\mu\text{L}$ do Tampão de lavagem I. Este material foi homogeneizado e incubado a 60°C por 5 min. O sobrenadante é coletado e descartado com auxílio de pipeta e $500\mu\text{L}$ de solução de lavagem II foram adicionados ao precipitado. A solução é homogeneizada e incubada a 60°C por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado e descartado. A lavagem com a solução de lavagem II foi repetida mais uma vez. Em seguida, o tampão de eluição foi adicionado ao precipitado e a mistura foi incubada a 60°C por 5 min e o sobrenadante foi coletado e descartado. O volume de tampão de eluição preconizado pelo fabricante foi de $200\mu\text{L}$, entretanto neste estudo adicionamos $60\mu\text{L}$ de tampão de eluição para aumento da concentração de material genético. Este procedimento foi repetido e o sobrenadante foi colocado em novo tubo estéril e estocados a -70°C até o momento de sua utilização na síntese do DNA complementar.

VI. Extração manual com Fenol-Cloroformio (*Maniatis et al., 1989*):

Para extração manual utilizando a digestão com proteinase K seguida por fenol-clorofórmio, foi empregado um círculo de SPF com diâmetro de 12mm. Este material foi transferido para um tubo estéril com capacidade de 2 mL contendo 400 µL da solução de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.5%, proteinase K 10mg/mL) seguido por incubação a 56°C por 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo onde 400µL da solução de fenol foram adicionados à mistura. Esta mistura foi centrifugada a 12.000g (Microcentrifuga 1-14 Edition, Sigma) por 1 min e o sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo contendo 400µL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000g por 1 min. O sobrenadante foi acondicionado em novo tubo contendo (800 µL) de etanol 96-100% e a mistura foi incubada a – 20°C por 4 horas para precipitação do material. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado, e 500 µL de etanol 70% foram adicionados ao precipitado. Foi realizada centrifugação a 12.000g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, a amostra foi seca a temperatura ambiente e o material genético foi diluído em 25 µL de água destilada. O material foi armazenado a – 70°C até o momento da utilização.

VII. Extração química por metanol (*Bereczky et al., 2005*)

Para a extração do material genético utilizando metanol, um círculo de SPF de 3mm de diâmetro foi acondicionado em um tubo contendo 125µL de metanol e a solução foi incubada a 20-25°C por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta e as amostras foram secas a 20-25°C por 10 min.

Em seguida, 65µL de água destilada foram acrescentados à mistura que foi homogeneizada e incubada a 97°C por 15 min para a obtenção do RNA purificado.

Quadro 4.1. Conjuntos de extração de material genético empregados neste estudo para obtenção do RNA viral em sangue em papel de filtro (SPF).

Conjunto de Extração	Metodologia	Número de Círculos SPF	Volume Final do Eluato preconizado pelo fabricante	Volume Final do Eluato
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha)	Silica gel	3 (3mm)	150µL	30µL
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha)	Silica gel	3 (3mm)	30-50µL	30µL
SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA)	Silica gel	1 (6mm)	100µL	40µL
Nucleospin Blood (Nucleospin, Alemanha)	Silica gel	1 (6mm)	100µL	100µL
Dried Blood Spot (DBS) Genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Canadá)	Resina	3 (3mm)	200µL	60µL
Fenol-clorofórmio (Maniatis et al., 1989)	Reações químicas	1 (12mm)	25µL	25µL
Metanol (Bereczky et al., 2005)	Reações químicas	1 (3mm)	65µL	65µL

4.5. Testes Moleculares

4.5.1 - Detecção quantitativa do HCV em amostras de soro utilizando a técnica comercial.

As amostras de soro anti-HCV reagentes utilizadas nesse estudo foram submetidas à técnica COBAS® TaqMan® HCV (Roche, Nova Jersey, EUA) para detecção quantitativa do HCV.

O Teste COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 é um teste de amplificação de ácido nucleico *in vitro* destinado à quantificação dos genótipos 1 a 6 do RNA do HCV, no soro ou plasma humano, utilizando o conjunto de extração de ácido nucleico viral do Sistema High Pure para a extração manual do ácido nucleico nas amostras e o

Analizador COBAS® TaqMan® 48 para a amplificação e detecção automatizadas. O teste utiliza iniciadores de transcrição reversa e amplificação por PCR que definem uma sequência dentro da região 5'NC do HCV.

Segundo fabricante o limite de detecção do teste COBAS® TaqMan® HCV, v2.0 para amostras de genótipo 1 é de 9,3 UI/mL (95%CI 6,1; 24,2) em plasma EDTA e 8,8 UI/mL (95% CI 7,5; 11,1) em soro, enquanto para amostras de genótipo 4 é de 25,4 UI/ml (95% CI 21,5; 31,2) em soro.

4.5.1.2 – Procedimento do Teste

A solução de trabalho de ligação/lise foi preparada com volume final aproximado de 10 mL contendo 7 mL de tampão de eluição, 1,4mL de solução de proteinase K, 140 µL de RNA carreador e 56 µL de HCV QS. Em cada reservatório do suporte de lise, foram adicionados 625 µl de Solução de Trabalho de Ligação/Lise e em cada reservatório apropriado foram adicionados 500 µL de amostra ou controle. Após a adição das amostras é feita a mistura com o tampão de lise por agitação forte por 10 minutos e a reação é incubada a 50°C (\pm 2°C) por 10 minutos.

Em seguida, a solução foi centrifugada a 4600 x g por 10 a 20 segundos em centrifuga para placas Rotanta 460 Rotor (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). Logo após, foram adicionados 250 µL de isopropanol a mistura que foi homogeneizada por inversão três vezes e, em seguida, foi feita agitação forte por 10 seg.

Foi feita nova centrifugação a 4600 xg por 10 a 20 segundos, e foram adicionados 750 µL de amostra ou do controle nos reservatórios correspondentes do Suporte de Tubos de Filtragem com o Suporte de Resíduos afixado. Depois de adicionar todas as amostras ou controles, centrifugou-se a unidade do Suporte de Tubos de Filtragem durante 2 min a 4600x g no centrifugador de placas.

A amostra ou a mistura de controle foi transferida para os reservatórios correspondentes do Suporte de Tubos de Filtragem. Centrifugou-se a unidade do Suporte de Tubos de Filtragem durante 2 minutos a 4600 x g no centrifugador de placas. Em seguida as amostras foram transferidas ao suporte de tubos de filtragem

e feita nova centrifugação a 4600 x g por 2 min. Em seguida, o suporte de resíduos foi eliminado e substituído por um novo Suporte de Resíduos. Logo após foram adicionados 400 µL de Tampão de Remoção de Inibidor (IRB) em cada suporte de tubos de filtragem e feita centrifugação a 4600 x g por 2 minutos, em seguida, pipetou-se 700 µL de Tampão de Lavagem (WASH) ao longo das paredes laterais de cada reservatório.

Após centrifugação, retirou-se o Suporte de Tubos de Filtragem do Suporte de Resíduos, onde este último foi eliminado e substituído por um novo Suporte de Resíduos. Foi feita nova lavagem do suporte de tubos de filtragem com 700 µL de Tampão de Lavagem seguida pela centrifugação a 4600 x g por 3 min. Em seguida, retirou-se o Suporte de Tubos de Filtragem e o mesmo foi encaixado no Suporte de Eluição ao qual se adicionou 75 µL do Tampão de Eluição (ELB) pré-aquecido e realizou-se incubação a 20-25°C por 3 min. Em seguida, foi feita nova centrifugação durante 2 min a 4600 x g no centrifugador de placas para obtenção do RNA viral. Foi feita a transcrição reversa e amplificação do material, onde 50µL do RNA obtido foram adicionados em tubo K contendo a mistura principal de trabalho. Para um conjunto de 12 amostras, a mistura principal é preparada misturando 669 µL de HCV MMX (mistura principal Cobas Taqman HCV) com 81 µL de CTM Mn²⁺ (solução de manganês Cobas Taqman) em um tubo de 2 ml, invertendo-o 10 vezes. Os tubos K contendo esta solução são enviados ao Analisador Cobas Taqman para que a reação seja realizada conforme instruções do fabricante.

4.5.2 - Transcrição do RNA do HCV em amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro para detecção quantitativa do HCV “in house”

A transcrição reversa em amostras de soro foi feita utilizando 10 µL do RNA extraído pelo QIAamp Viral RNA Mini Kit e 10 µL do mix de reação. As amostras foram incubadas à 25°C por 5 minutos, 50°C durante 60 minutos para ocorrer à transcrição reversa do RNA em DNA complementar. Logo após, a enzima foi inativada pela incubação das amostras a 70°C por 15 minutos (Almeida et al., 2007).

Quadro 4.2. Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa

DNTP's 10mM ¹	1 µL
Random Primer 20 pmol	0,5 µL
Tampão 5X	4 µL
DTT 0,1M	1 µL
RNA SIN	1 µL
Água RNase/DNase free	1,5 µL
RT SuperScript III (200U/mL) ¹	1,0 µL
ssRNA	10 µL
Total	20 µL

¹(Invitrogen, EUA)

A fim de determinar os parâmetros da PCR quantitativa para HCV em amostras de SPF, a concentração de cDNA na reação (5µL e 7,5µL), concentração da transcriptase reversa Superscript III reverse transcriptase (1µL e 1,5µL) e o número de ciclos de amplificação (40 e 45) foram avaliados. Controles negativos obtidos a partir de amostra de sangue total anti-HCV/HCV RNA não reagentes foram incluídos em todas as etapas conforme citado acima.

4.5.3 Construção da Curva Padrão

Para a construção da curva interna, uma amostra de soro, genótipo 1b, carga viral de 18.400UI/mL foi submetida a uma PCR convencional com iniciadores para a região 5'NC do HCV. A extração do RNA foi feita como descrita no item 4.4.1 e o DNA complementar foi construído com iniciador anti-senso para a região 5'NC (K11: 5'GGTGCACGGTCTACGAGACC3') (Almeida et al., 2007). O DNA complementar foi utilizado em uma primeira reação de PCR utilizando iniciadores específicos para a região 5'NC (senso K10 (5' GGCGACACTCCACCATRRAT 3') e antisenso K11 (5' GGTGCACGGTCTACGAGACC 3) e em uma segunda amplificação, nested PCR, utilizando os iniciadores senso K15 (5' ACCATAGATCACTCCCCTGT 3') e antisenso K16 (5' CAAGCACCTATCAG GCAGT 3')- para obtenção de um fragmento de 280bp.

Para análise dos amplicons foi realizada eletroforese a 100V por 4min onde 10µL do produto amplificado acrescido com 1mL de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foram aplicados em gel de agarose (Sigma

Chemical Company, St. Louis, EUA) a 1,5% em Trisácido Bórico-EDTA 1X (100 mM Tris, 90 mM cido brico, 100mM EDTA, pH 8,3) impregnado com 3L de brometo de etídio 10mg/mL (Gibco, California, EUA). Os amplicons foram visualizados com o auxílio de um transluminador (Labnet, Edison, NJ, EUA) e registrados por um sistema de captura e fotodocumentação (UVP, Mitsubishi, Japão).

O fragmento de 280 bp foi seqüenciado para confirmação de que o genoma amplificado correspondia ao do HCV.

4.5.3.1 Ligação do amplicon ao vetor de clonagem

Antes de darmos início a esta etapa, submetemos os amplicons a purificação utilizando o conjunto QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany). A seguir, adicionamos na extremidade 3' moléculas de deoxiadenosina (A) para que o vetor possa se ligar ao amplicon. Com este intuito, preparamos uma mistura contendo 0.2 mM dATP (1,25 mM), 5 U Platinum Taq DNA Polimerase, 1X tampão da PCR(10X), 1,5 mM MgCl₂ (50 mM) que foi adicionada aos amplicons. Em seguida, esta mistura foi submetida a 72°C por 15 min. Terminada esta etapa, demos início à clonagem utilizando o conjunto comercial pCR[®]4 TOPO[®] (Invitrogen, EUA) como descrito pelo fabricante. Brevemente, adicionamos 4 µL do amplicon a uma mistura contendo 1 µL do vetor de clonagem e 1 µL de Salt Solution, seguida pela incubação a temperatura ambiente por 30 min e posterior resfriamento em gelo.

4.5.3.2 Transformação bacteriana e purificação do DNA plasmidial contendo o inserto do HCV

Células bacterianas competentes (*E. coli* cepa TOP10), previamente preparadas pelo método de cloreto de cálcio (CaCl₂) (Sambrook et al, 2001), foram descongeladas em banho de gelo. A estas células, foram acrescidos 2µL do produto da ligação e a mistura foi submetida à temperatura de 2 a 8.°C por 20 minutos. Essa reação foi submetida a um choque térmico por 3 minutos a 42°C e uma nova incubação a 2 a 8.°C por 10 minutos. A recuperação das células bacterianas, após choque térmico, foi realizada pela adição de 250µL de meio S.O.C. seguida de incubação a 37°C sob forte agitação (250 rpm) por 1 hora (Gyrotech Water Bath

Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA) (Sambrook et al, 2001).

Após esta etapa, foi realizado o plaqueamento em uma única placa contendo meio Luria Bertani (LB) sólido (LB líquido com 1,5% (p/v) de ágar suplementado, 100µg/mL de ampicilina, 0,1mM de IPTG e 40µg/mL de X-Gal). Após incubação a 37°C por 18 a 24 horas, cerca de 10 colônias bacterianas correspondentes a 10 clones plasmidiais foram selecionadas por cor e transferidas para tubos contendo 5mL de meio LB líquido (LB: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0) suplementado com ampicilina 50µg/mL. A reação foi incubada a 37°C por 18 a 24 horas sob agitação constante de 150rpm (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA). A fim de verificarmos quais clones continham o inserto de HCV, realizamos a digestão com a enzima de restrição Eco RI onde 16 µL do DNA plasmidial foram misturados a 2 µL da enzima e 2 µL de tampão 10X. Esta reação era incubada a 37 °C por 2 horas e a seguir a checagem era realizada em gel de agarose a 1,5% através de eletroforese. As culturas dos clones bacterianos selecionados foram submetidos à extração do DNA plasmidial utilizando-se o conjunto comercial *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN, Hilden) de acordo com o protocolo descrito pelo do fabricante.

A concentração do DNA plasmidial recombinante foi determinada por espectrofotometria e em seguida, este DNA foi diluído em série de log₁₀ para construir uma curva padrão interna e controle positivo do HCV na PCR em tempo real.

4.5.3.3 Quantificação e obtenção da curva padrão

A concentração dos plasmídios recombinantes contendo o inserto de HCV foi determinada pela leitura de 50 µL do produto em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A quantificação medida fornecida em ng/µL , sendo transformada em número de cópias/µL (nº cópias/µL) de acordo com a fórmula:

$$\text{Número de cópias/}\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{L)} \times 6,022 \times 10^{23}}$$

$$(\text{Número de pares de base do plasmídio recombinante}) \times 660$$

Após determinação do número de cópias do genoma viral, realizou-se diluições seriadas na base 10 dos plasmídios com concentrações variando de 10^{10} até 10 cópias para obtenção da curva padrão. Estas diluições foram aliqüotadas e armazenadas a -70°C para posterior utilização.

4.5.4 – Detecção quantitativa por PCR em Tempo Real *in house*

4.5.4.1 Desenho dos Oligonucleotídeos

Com o intuito de otimizar o desempenho do teste para as variantes predominantes do HCV no Brasil, foi realizada uma busca de sequências de diferentes cepas internacionais e brasileiras, de diferentes genótipos no GenBank, para o desenho dos oligonucleotídeos.

As sequências da região 5'NC do genoma do HCV foram alinhadas utilizando o software CLUSTAL X, versão 1.83 (Thompson et al., 1997), para definir o segmento ideal para desenho de nossos oligonucleotídeos. Posteriormente, o software Primer Express (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado para gerar um assay contendo oligonucleotídeos e a sonda específica para detecção e quantificação da região 5'NC comuns a todos os genótipos. Esta sonda foi marcada com um fluoróforo específico na extremidade 5' (FAM) e um quencher na extremidade 3' (TAMRA).

Tabela 4.1. Sequências dos iniciadores e sonda usados na reação de PCR quantitativa *in*

Iniciadores	Sequências	Posição no genoma (5'NC)
Senso	GCGAAAGGCCTTGTGGTACT	271- 290
Anti-senso	ACGGTCTACGAGACCTCCC	318-336
Sonda	ACTCGCAAGCACCTAT	296-312



4.5.4.2 Protocolo de reação da PCR em Tempo Real *in house* em amostras de Soro e SPF

Para quantificação do número de cópias do RNA do HCV em soro e SPF, foi empregado uma PCR em tempo real *in house* com iniciadores e sondas desenhados para a região 5'NC do. Para este método empregamos o equipamento Icyler (Biorad, França) e a metodologia TaqMan, onde foi utilizado o reagente real time TaqMan com uma concentração 300nM de cada iniciador e 150nM da sonda do TaqMan (Gentec, Applied Biosystems assay, CA), sendo a mistura de reação: 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (tampão, dNTPs com UTP, AmpERASE UNG e AmpliTaq Gold DNA polimerase) (Roche, Nova Jersey, EUA), concentrações determinadas pelo fabricante no *assay by design*. Os volumes utilizados na reação padrão em amostras de soro está apresentado na tabela 4.2:

Tabela 4.2. Concentração dos reagentes e cDNA utilizados na RT-PCR em tempo real *in house*

Mix qRT-PCR	Volumes
Sonda TaqMan (150 nM)	0,4 µL
Mistura de reação	12,5 µL
Água RNase free	6,7 µL
cDNA	5,4 µL
Total	25 µL por amostra

As condições da reação foram: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de: 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A fluorescência foi detectada ao final da etapa de hibridização da sonda. O valor de C_T (*threshold cycle*) foi fornecido automaticamente, em cada

corrida. Este valor refere-se ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada caracterizando a amplificação da amostra.

Para a quantificação absoluta do HCV nas amostras foi construída uma curva padrão interna a partir de uma amostra de soro contendo HCV RNA.

Os resultados gerados pelo aparelho estão em número de equivalentes de genomas na reação de PCR. A transformação para número de cópias, considerando recuperação das possíveis perdas de material durante as etapas de extração, se deu conforme a fórmula:

$$N = n / k' \cdot k'' \cdot k'''$$

N= Cálculo do número de equivalentes genômicos esperado em 1000 µL de soro

n= número de equivalente de genomas na reação de PCR (25 µL)

K'= fração esperada de recuperação do RNA extraído

K''= fração do RNA extraído utilizado na reação de formação do cDNA

(transcrição reversa)

K'''= fração do cDNA usada na reação de PCR em tempo real

Dado que a eficiência de cada extração comercial é maior que 50% em amostras de soro (Tian, Hummer, Landers, 2000), estabelecemos esta eficiência como 62,5% em amostras de soro e aproximadamente metade deste valor em SPF (32,5%). Foi utilizado 33,3% do RNA extraído a partir do SPF na reação de formação do cDNA e 16,6% do RNA extraído a partir do soro na reação de formação de cDNA, e 50% de cDNA na reação de PCR em tempo real das amostras de soro e 75% de cDNA na reação de PCR em tempo real das amostras de SPF. Logo, a partir do número de equivalentes de cópias encontrado por reação pode-se estimar o número de cópias que estariam presentes em cada mililitro de soro ou SPF no início da extração. Desta forma, o cálculo para soro e SPF foi realizado como descrito abaixo:

$$N \text{ em amostras de soro} = \frac{n}{0,625 \times 0,166 \times 0,250}$$

$$N \text{ em amostras de SPF} = \frac{n}{0,325 \times 0,333 \times 0,375}$$

4.6 Parâmetros de qualidade do qRT-PCR

Para a avaliação da sensibilidade, especificidade, concordância reprodutibilidade e presença de inibidores, foram utilizadas amostras de soro e SCPF obtidas da população estudada, provenientes de indivíduos reagentes e não reagentes cujas amostras de soro foram confirmadas pelos testes de diagnóstico empregados para detecção de anticorpo anti-HCV e do RNA do HCV para satisfazer o critério de caso confirmado do Ministério da Saúde. Os resultados obtidos no SCPF foram comparados com os resultados das respectivas amostras de soro.

Sensibilidade: A sensibilidade da PCR em tempo real para detecção e quantificação do HCV foi investigada através da comparação dos resultados obtidos entre as amostras HCV RNA reagentes no soro e respectivas amostras de SPF.

Especificidade: A especificidade desta técnica foi determinada através da comparação dos resultados obtidos entre as amostras HCV RNA não reagentes no soro e respectivas amostras de SPF.

Reprodutibilidade: A fim de avaliar a reprodutibilidade do ensaio, foram analisadas as dez diluições da curva padrão do HCV com cargas estimadas entre 10^1 e 10^9 cópias/mL (4.8.3) em cinco reações por cinco dias diferentes. Além disto, a reprodutibilidade da técnica foi determinada avaliando-se espécimens clínicos de soro e de sangue em papel de filtro. Para isso, foram testadas três vezes consecutivas em dias distintos, 4 amostras de sangue em papel de filtro, onde 3 eram HCV reagentes e 1 era HCV não reagente.

Presença de inibidores: Para avaliação da presença de inibidores, um controle de DNA interno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (controle endógeno humano) , que consiste em uma proteína presente no sangue humano. Este controle interno e seus reagentes específicos foram adicionados à 3 amostras de soro e 3 amostras de SPF, todas HCV-RNA negativas, permitindo a co-amplificação da sequência alvo do controle interno e da sequência alvo de HCV sem nenhum comprometimento da amplificação das amostras em questão.

Para confirmação da presença de DNA após a extração, foi realizada uma PCR com um kit contendo o conjunto de primers para o gene da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e sonda para confirmar a presença e amplificação de DNA nas amostras.

4.8 Detecção qualitativa do HCV em amostras de soro e SPF

O RNA obtido das amostras de soro e SPF foi submetido à transcrição reversa e PCR utilizando os reagentes SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum®Taq (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, California), com os iniciadores para região NS5B do HCV, PR3, PR4 e PR5 (Tabela 4.2)

Quadro 4.3 Reagentes utilizados na reação de RT-PCR qualitativa para amostras de soro

Tampão 2x	12,5 µL
PR3 20 pM	0,5 µL
PR4 20 pM	0,5 µL
SuperScript™ III One-Step RT / Platinum® Taq Mix	1 µL
RNasin®	1 µL
Água destilada DNase RNase free	4,5 µL
cDNA	5 µL
Total	25 µL

Nas amostras de SPF foram utilizados 7,5 µL do RNA e 17,5 µL da mistura, sendo subtraído da água os 2,5 µL. As condições da reação foram: 1 ciclo de 42°C por 45 min, 94°C por 2 min, seguidos de 5 ciclos de 93°C por 30s, 60°C por 45 s; 35

ciclos (com diminuição de 0,3°C a cada ciclo) de 72°C por 1 min, 93°C por 30 s, 60°C por 45s, 1 ciclo à: 72°C por 1min e 72°C por 5min.

Tabela 4.3. Iniciadores de reação utilizados no One-Step RT-PCR e PCR

Iniciadores	Sequência	Posição no Genoma
PR3 Sense	5' TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC3'	655-677
PR4 Antisense	5' GCNGARTAYCTVGTCATAGCCTC 3'	1021-1043
PR5 Antisense	5' GCTAGTCATAGCCTCCGT 3'	1018-1035

Em seguida, foi realizada uma nested-PCR, onde foram utilizando 20 µL do mix em cada tubo e 2 µL do PCR 1.

Quadro 4.4. Reagentes utilizados na reação de nested-PCR para amostras de soro

Água destilada DNase RNase free	10,9 µL
DNTPs 1,25 mM	4 µL
Tampão 10x	2,5 µL
CIMg 50 mM	1,5 µL
PR3 20 pM	0,5 µL
PR5 20 pM	0,5 µL
Taq DNA Polimerase	0,1 µL
Produto da PCR I	2 µL
Total	22 µL

Nas amostras de SPF o volume de Taq DNA Polimerase utilizado foi de 0,3 µL .As seguintes condições foram estabelecidas: 1 ciclo de 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s e posterior ciclo de 72°C por 10 min. Para a purificação do DNA e sequenciamento nucleotídico foi feita uma PCR 2 com volume final de reação de 100ul (96µL da mistura de reação e 4 µL da PCR1).

As amostras foram submetidas à visualização em gel de agarose a 1,5% com 5 µL de gel red para identificar quais haviam sido detectadas. Nesta etapa, 10 µL da PCR II foram utilizados, e a corrida foi de à 90V por cerca de 1 hora.

4.9 Sequenciamento nucleotídico do HCV obtido das amostras de soro e SPF

As amostras de soro ou SPF que apresentaram o padrão de bandas de aproximadamente 380 pares de bases foram submetidas à eletroforese em gel de agarose com baixo ponto de fusão (*Low melting point*, Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) para que a respectiva banda fosse cortada, purificada e posteriormente sequenciada.

Aplicou-se 100µL do produto da PCR II em gel de agarose a 1% em tampão TBE contendo 5µL brometo de etídio (Invitrogen, California, EUA) numa concentração final de 0,0025%. Após a corrida eletroforética a 90V por 40 minutos, o gel foi visualizado em transluminador ultravioleta e as bandas foram cortadas com auxílio de bisturi sob visualização em luz de ultravioleta.

4.9.1 Purificação do DNA em gel de agarose

O DNA presente no gel de agarose foi purificado utilizando o conjunto comercial para extração de DNA em gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Cada banda foi cortada com auxílio de um bisturi e pesadas em balança eletrônica (EK 200I, A&D, Tokyo, Japão). Em seguida, o peso em mg foi convertido para µl e colocado em um tubo cônico estéril. Logo após, foi adicionado o tampão QG (3 vezes o volume da banda) e a mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos para dissolução do gel contendo o DNA. Em seguida foi adicionado o isopropanol (1 vez o volume da banda) à amostra e homogeneizado.

A mistura então foi transferida para a coluna QIAquick, e centrifugada (MiniSpin plus, Eppendorf) por 1 minuto a 20.000 x g. O tubo contendo o filtrado foi descartado, e substituído por outro. Em seguida, 500 µL do Tampão GQ foram adicionados a cada coluna e esta foi submetida a nova centrifugação por 1 minuto a 20.000 x g. O filtrado foi descartado e 750µl do Tampão PE foi adicionado à coluna. Uma nova incubação à temperatura ambiente por 2 a 5 minutos foi realizada e o

material foi centrifugado por 1 minuto a 13,000 rpm. Para Eluição do DNA, 30µL do Tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) foi adicionado à membrana da coluna, e após incubação de 1 minuto a temperatura ambiente, foi centrifugado por 1 minuto a 20.000 x g.

Após a purificação do DNA, o mesmo foi quantificado em gel de agarose a 1,5%, onde 2µL do marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e 4µL do material purificado foram aplicados no gel. A determinação da concentração de DNA em ng foi feita pela comparação com o tamanho das bandas do marcador de massa molecular.

4.9.2 Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR purificados como descrito no item 4.6.1 foram sequenciados utilizando-se os reagentes e protocolos do Kit “Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit”. As amostras foram amplificadas na Plataforma de Sequenciamento (PDTIS), Fiocruz.

Em cada poço da placa foram adicionados aproximadamente 30ng de DNA, 1µL de oligonucleotídeos (sense e antisense), 1µL (16x) do marcador “BigDye” mix e 1,5µL de tampão (5x), sendo o volume final da reação de 10µL. Em seguida as amostras foram colocadas em um termociclador e submetidas a 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia de: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. O sequenciamento e a leitura automática das seqüências foram feitos utilizando-se o equipamento “DNA analyzer 3730” da Applied Biosystems.

Tabela 4.4. Reagentes e volumes utilizados na reação de sequenciamento.

Reagentes	Reagentes Volume (µL)
DNA (30ng)	3,5 - 6,5
Iniciadores de cadeia PR3 (3,2 pMol)	1,0
Iniciadores de cadeia PR% (3,2pMol)	1,0
BigDye	1
Tampão (5x)	1,5
H2O <i>DNAse/RNAse</i> livre	Volume p/ completar 10 µL

4.10. Análise dos dados

Os dados obtidos dos resultados dos testes sorológicos e moleculares foram codificados e digitados em um banco de dados criado no programa Microsoft Excel XP. Análise estatística descritiva foi realizada com cálculo de médias, frequências e intervalos de confiança (IC) de 95%. Para comparação de prevalências utilizaremos o teste do Qui-quadrado. Um valor de $p < 0,05$ foi estabelecido como nível de significância utilizando o programa SPSS versão 17.0.

Toda a análise estatística, incluindo os cálculos de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos, foram realizados utilizando-se o programa GraphPad InStat 3.01 (GraphPad software, San Diego, CA) e MedCalc (version 9.2.1.0, MedCalc Software, Bélgica). As análises de sequenciamento foram realizadas através do pelo banco de dados *HCV Database* e alinhadas pelo programa Mega 5 (Tamura et al., 2011).

5. RESULTADOS

5.1. Características da População de Estudo

A população deste estudo foi composta por 99 indivíduos com amostras pareadas de soro e SPF, onde a maioria da população era do sexo feminino (56,5%) e apresentava média de idade igual a 47,3 ($\pm 16,6$) anos. Quanto ao grau de instrução, a maioria tinha até o ensino fundamental (40%) e quanto à renda familiar, 72% dos indivíduos recebia até três salários mínimos mensais.

Dos 99 indivíduos incluídos, 59 tinham a infecção pelo HCV e destes 57 eram heterossexuais, 3 relataram uso de drogas, 16 admitiram compartilhamento de lâminas e giletes, 1 realizava hemodiálise e 29 realizaram hemotransfusões, onde sete deles receberam sangue ou hemoderivados antes de 1994, conforme a figura 5.1.

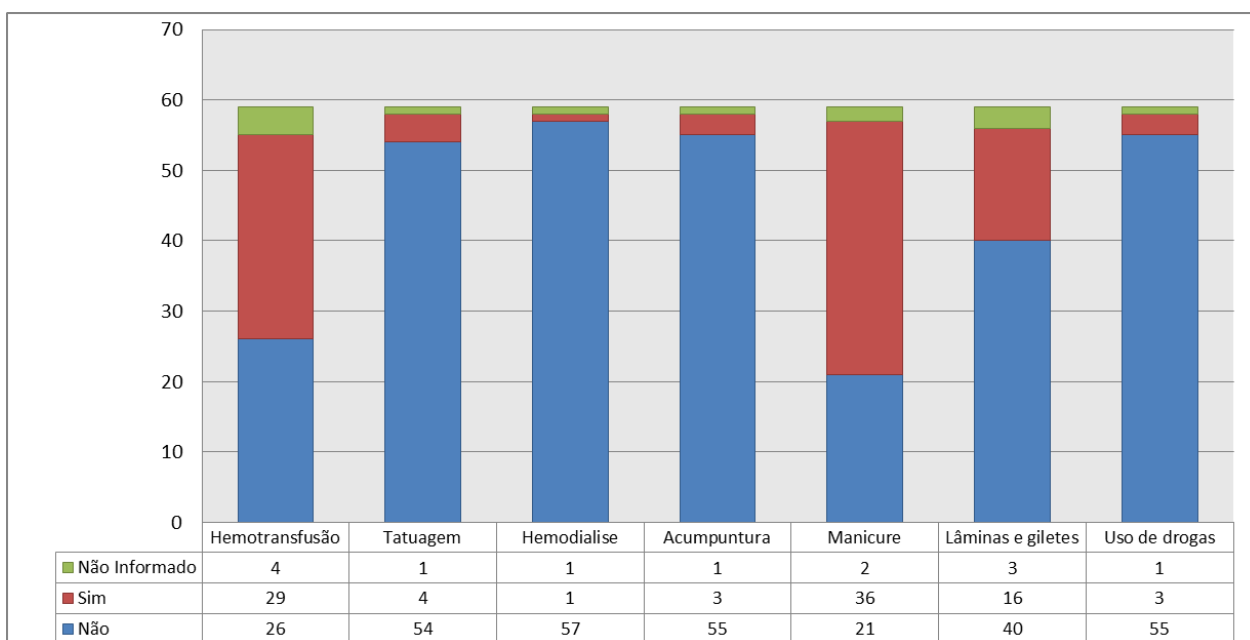


Figura 5.1. Fatores de risco a infecção pelo HCV entre os 59 indivíduos infectados pelo HCV incluídos no estudo

5.2 Detecção de anti-HCV em soro e SCF

A fim de confirmar o status sorológico dos indivíduos incluídos no estudo, as amostras pareadas de soro e SPF foram submetidas ao teste imunoenzimático comercial HCV Ab Radim (Itália), onde 59 amostras de soro foram anti-HCV reagentes com valor médio de densidade ótica (D.O.) igual a 2,970nm ($\pm 0,227$). Dentre os 59 indivíduos anti-HCV reagentes no soro, 56 também apresentaram anti-HCV em suas respectivas amostras de SPF (valor médio de D.O. igual a 2,814 nm ($\pm 0,447$)). Por outro lado, 40 amostras de soro apresentaram resultado não reagente para anti-HCV (valor médio de D.O. igual a 0,051 nm $\pm 0,058$) e 43 amostras de SPF também não tiveram o anti-HCV detectado (valor médio de D.O. igual a 0,033 nm $\pm 0,028$). Dentre as 40 amostras de soro anti-HCV não reagentes, 10 eram reagentes para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg).

5.3 – Determinação do método de extração do RNA do HCV em SPF

Todas as amostras de soro tiveram seu RNA extraído utilizando o conjunto comercial de extração QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Espanha) conforme instruções do fabricante. Para o SPF, sete métodos de extração foram avaliados (5 conjuntos comerciais e 2 métodos manuais), onde um painel de amostras de SPF contendo com cargas virais de $8,69 \times 10^5$ cópias/mL a 8,69 cópias/mL e um controle negativo foram empregados. O conjunto de extração QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) e a técnica que emprega fenol clorofórmio foram os únicos métodos onde foi possível a detecção do HCV pela técnica de PCR quantitativo *in house*. Utilizando o QIamp DNA mini kit, foi possível detectar o HCV nas amostras de SPF contendo $8,69 \times 10^5$ e $8,69 \times 10^4$ cópias/mL com valores de Ct iguais a 33,6 e 36,2, respectivamente. Pela técnica de fenol clorofórmio, foi possível detectar na amostra contendo carga estimada igual a $8,69 \times 10^5$. A partir disto, o conjunto QIAamp DNA Mini Kit foi empregado nas análises seguintes.

5.4. Desenvolvimento da PCR quantitativa in house

5.4.1. Desenho dos Oligonucleotídeos

Após busca na base de dados *GenBank*, 300 seqüências da região 5'NC do genoma do HCV pertencente aos 6 genótipos foram obtidas e as mesmas foram alinhadas no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) onde foi possível obter uma seqüência consenso com mais de 90% de identidade nucleotídica (Figura 5.2). Esta seqüência foi submetida ao programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) para construção dos iniciadores e sondas empregados na PCR quantitativa conforme apresentado na Tabela 5.1.

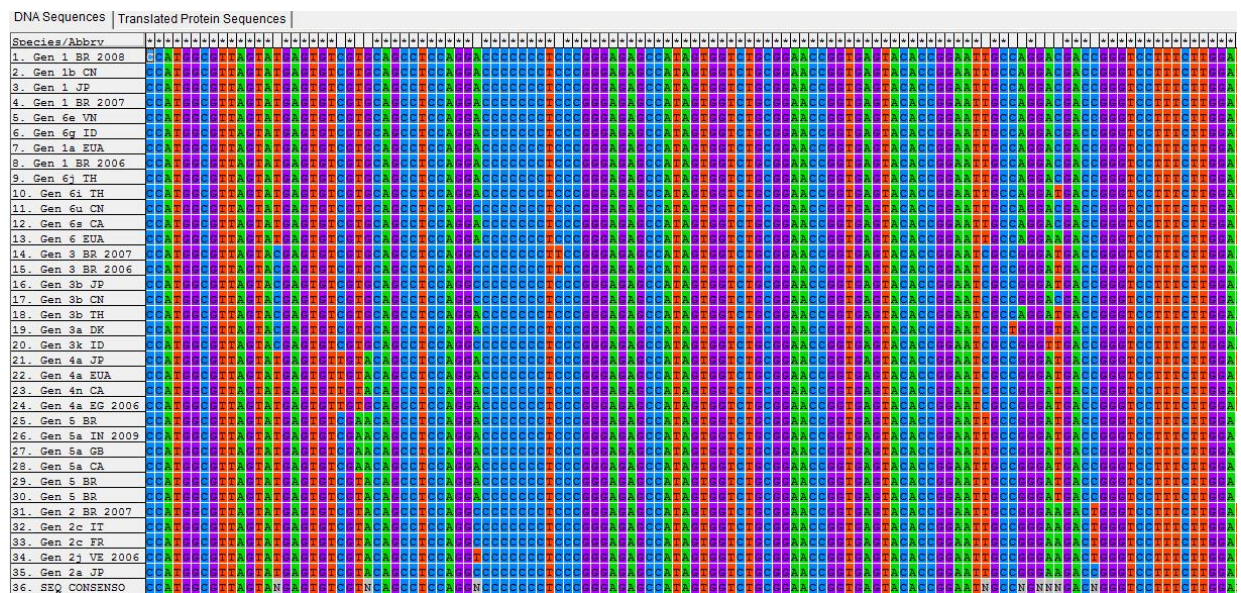


Figura 5.2. Alinhamento realizado com as seqüências de HCV de diferentes genótipos obtidas no GenBank para construção dos iniciadores e sondas utilizados na PCR quantitativa.

5.4.2. Amplificação, clonagem e obtenção de plasmídeos recombinantes para quantificação do vírus da hepatite C

A construção da curva padrão da PCR quantitativa foi feita utilizando uma amostra de soro HCV RNA reagente pertencente ao genótipo 1 com carga viral de 49.680 cópias/mL (18.400 UI/mL). A figura 5.3 mostra o resultado da nested *PCR* para a amostra protótipo de HCV, utilizando iniciadores específicos para a região

5'NC do HCV. Observa-se uma banda com tamanho molecular de aproximadamente 280pb a qual foi visualizada no gel de agarose conforme o esperado.

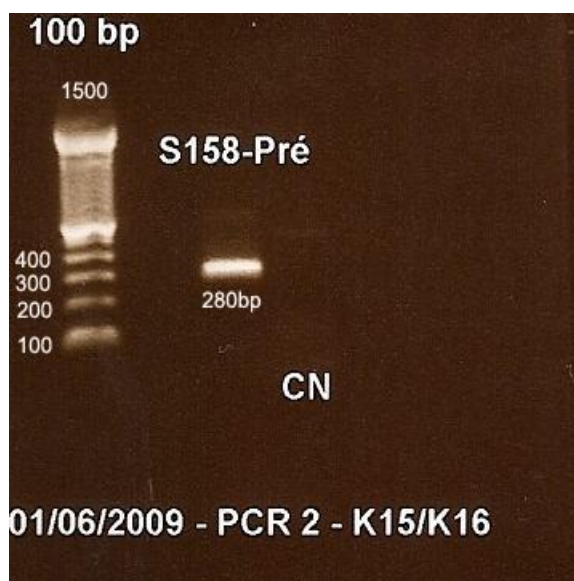


Figura 5.3. Resultado da amplificação da região 5' NC do protótipo de HCV em gel de agarose 1,5%. Da esquerda para direita temos o padrão de peso molecular (100 bp), o protótipo do HCV amplificado (S158-Pré) e o controle negativo da reação (CN).

Após a ligação de cada fragmento amplificado ao vetor plasmidial, seguida de transformação e plaqueamento bacteriano, as colônias foram selecionadas para crescimento pela inabilidade de degradar a lactose do meio, possivelmente, contendo o inserto de interesse. A purificação dos DNAs plasmidiais das colônias selecionadas, contendo o inserto de HCV foram realizados e a presença do inserto foi confirmada pela reação de digestão do plasmídeo purificado com a endonuclease de restrição Eco RI. O inserto de HCV, clonado e digerido apresentou banda na altura de 280pb (Figura 5.4) visualizado em gel de agarose por brometo de etídio.



Figura 5.4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% apresentando o inserto do HCV genótipo 1 após a reação do produto purificado com a enzima de restrição Eco RI.

O inserto de HCV foi clonado e amplificado por PCR conforme descrito no item 4.5.3, e sequenciado e alinhado utilizando o programa Blast, apresentando 98% de similaridade com HCV genótipo 1.

5.4.3. Padronização da RT-PCR quantitativa para Hepatite C

Aplicando a fórmula descrita no item 4.5.3.3 foi obtido uma quantificação do plasmídeo recombinante de aproximadamente 1×10^{10} cópias/ μL . Os protocolos apresentados foram resultantes da otimização das concentrações dos iniciadores e das sondas para cada uma das reações.

A PCR quantitativa apresentou limite de detecção de 10 cópias de genoma viral por reação. A curva padrão obtida apresentou coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,997 e “slope” de -3,22. Para cada reação foi utilizada uma nova curva com os padrões variando de 1×10^9 a 10 cópias, aliquotados e estocados a temperatura de -70°C para aferição de cada teste realizado (Figura 5.5).

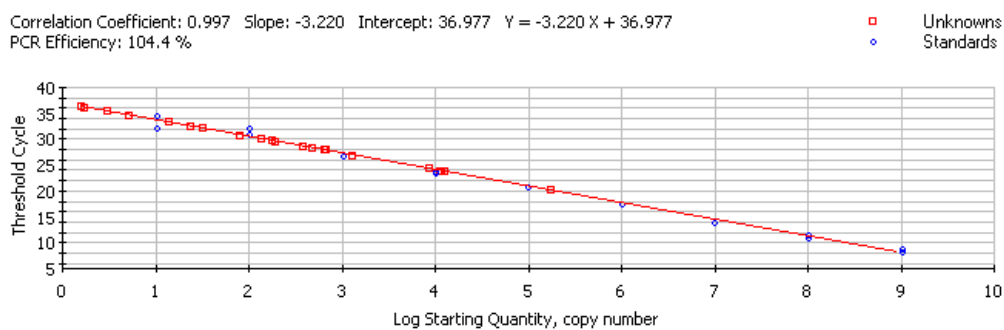


Figura 5.5. Gráfico representativo da curva padrão utilizada na PCR quantitativa obtida de diluições seriadas do plasmídeo recombinante contendo o inserto do HCV.

5.5. Detecção quantitativa do RNA HCV

5.5.1. Detecção quantitativa do HCV em amostras de soro pelo método comercial

Todas as 59 amostras de soro anti-HCV reagentes incluídas neste estudo foram submetidas ao teste comercial COBAS® TaqMan® HCV (Roche) para quantificação do RNA do HCV, onde foi possível detectar o HCV em todas as amostras. A mediana de carga viral foi igual a 1.782.000 cópias/mL (variando de 41 a $5,8 \times 10^7$ cópias/mL) e a mediana em \log_{10} cópias/mL igual 5,82 (valor mínimo igual a 1,1 e máximo igual a 7,3) conforme apresentado no quadro 5.1.

5.5.2. Detecção do HCV RNA pela PCR quantitativa *in house* em amostras de soro

Após extração do RNA nas amostras de soro e construção do DNA complementar, este foi submetido a PCR quantitativa *in house* como descrito nos itens 4.5.4.2. Das 59 amostras de soro anti-HCV reagentes e detectadas pelo COBAS® TaqMan® HCV (Roche), 44 tiveram sua carga viral determinada pela PCR quantitativa *in house*, onde a mediana da carga viral foi igual 90.200 cópias/mL (variando de 1834 a $4,8 \times 10^{10}$ cópias/mL) e a mediana em \log_{10} cópias/mL igual 4,94 (valor mínimo igual a 3,26 e máximo igual a 10,68) (Quadro 5.1). Pela técnica comercial, estas mesmas amostras apresentaram mediana de carga viral igual a

1.875.150 cópias/mL (variando de 41 a $5,8 \times 10^7$ cópias/mL) e a mediana em \log_{10} cópias/mL igual 6 (valor mínimo igual a 1 e máximo igual a 7). Todas as amostras de soro anti-HCV não reagentes submetidas a PCR quantitativa *in house* não foram detectadas. Das 15 amostras de soro com resultados discordantes entre a técnica comercial e a PCR quantitativa *in house*, a mediana da carga viral foi igual a 1.692.900 cópias/mL (variando de 41 a 11.610.000 cópias/mL) e mediana em \log_{10} cópias/mL igual a 5,79 (variando de 1,17 a 6,63) pelo COBAS® TaqMan® HCV.

Foi possível observar a correlação entre os valores de carga viral em log de cópias/mL obtidos entre as 44 amostras anti-HCV reagentes nos dois testes quantitativos (comercial e *in house*) com coeficiente de correlação *Spearman's rho* igual a $R= 0,263$ e $p=0,085$ (figura 5.6).

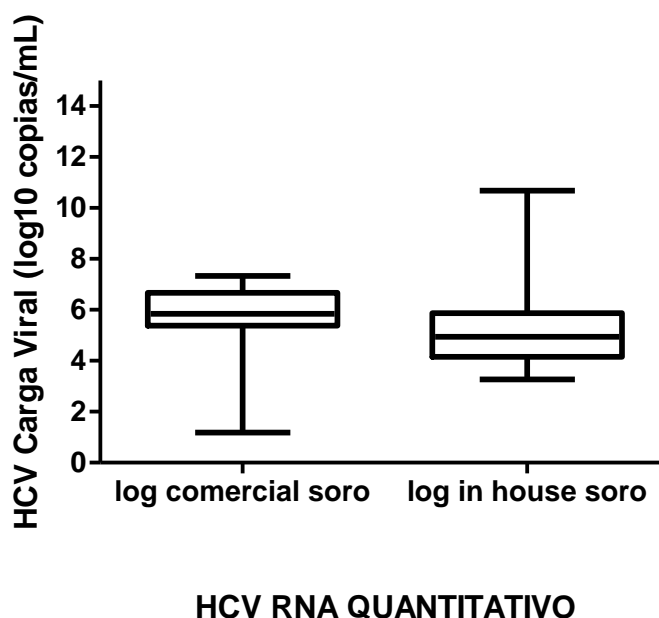


Figura 5.6. Diagrama de caixas da carga viral no soro de 44 pacientes positivos para HCV-RNA no soro e SPF. A caixa central representa os valores dos quartis inferiores (25th) e superiores (75th) e a mediana é representada pela linha horizontal. Diferenças entre os grupos (HCV-RNA positivo no soro pela PCR quantitativa comercial versus HCV-RNA positivos no soro pela PCR quantitativa *in house*) em relação a carga viral (\log_{10} cópias/mL) não foram significantes ($p=0,085$).

5.5.3. Detecção quantitativa *in house* em amostras de SPF

A fim de determinar as condições da reação de PCR em tempo real nas amostras de SPF, avaliamos a concentração de transcriptase reversa, cDNA e número de ciclos da reação em um painel de 6 amostras de SPF (tabela 5.1):

Tabela 5.1. Determinação da carga viral do HCV (cópias/mL) e threshold cycle (Ct) das amostras de SPF avaliadas pela PCR quantitativa *in house* com diferentes concentrações de transcriptase reversa, cDNA e número de ciclos da reação.

Amostras	Carga viral no soro (cópias/mL) COBAS Taqman HCV	Volume de transcriptase reversa na reação (1,0µL)						Volume de transcriptase reversa na reação (1,5µL)	
		5µL DNA/ 40 ciclos		5µL DNA/ 45 ciclos		7,5µL DNA/ 45 ciclos		7,5µL DNA/ 40 ciclos	
		Carga	Ct	Carga	Ct	Carga	Ct	Carga	Ct
1	1.274.400	45.750	29,6	52.250	29,5	60.500	29,7	44.000	28,23
2	1.101.600	45.025	29,5	32.000	31	26.937,5	31	114.000	27,43
3	104.328	7.412,5	32	5.637,5	33	4.470	34	310.000	38
4	NR	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
5	NR	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
6	NR	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-

NR = Não realizado; ND = Não Detectado

Ao analisar os dados obtidos, não foi possível observar diferença estatística entre as medianas das cargas virais obtidas nos diferentes protocolos ($p=0,32$). Entretanto, utilizando 1,5 µL de transcriptase reversa e 7,5 µL de cDNA na reação de PCR em tempo real *in house*, observamos maior mediana de carga viral igual a 456 cópias/mL, seguido pelos protocolos com 1,0 µL de transcriptase reversa, 5 µL de cDNA e 45 ciclos (mediana de carga viral igual a 128,4 cópias/mL), 5 µL de cDNA e 40 ciclos (mediana de carga viral igual a 108,1 cópias/mL), 7,5 µL de cDNA e 45 ciclos (mediana de carga viral igual a 107,75 cópias/mL). Logo, foi definido o uso de 1,5 µL de transcriptase reversa e 7,5 µL de cDNA com 40 ciclos de reação para a PCR quantitativa em SPF.

Foi possível detectar e quantificar o HCV RNA em 35 amostras de SPF utilizando a PCR quantitativa *in house* com mediana de carga viral igual a 241.750 cópias/mL (variando de 58.5 a $3,07 \times 10^{10}$ cópias/mL) e a mediana em \log_{10}

cópias/mL igual a 5,38 (valor mínimo igual a 1,76 e máximo igual a 10,48). As amostras de soro correspondentes apresentaram carga viral mediana igual a 2.111.400 cópias/mL pelo COBAS Taqman HCV (variando de 86 a 58.590.000 cópias/mL), e a mediana em log₁₀ cópias/mL igual a 5,89 (1,504 a 7,336 cópias/mL). Pela PCR quantitativa *in house*, estas amostras de soro apresentaram carga viral mediana igual a 121.600 cópias/mL (variando de 5560 a 4,31 x 10¹⁰ cópias/mL), e a mediana em log₁₀ cópias/mL igual a 3,74 (3,74 a 10,63 log₁₀ cópias/mL). Além disto, seis amostras de soro não foram detectadas pela PCR quantitativa *in house*, embora tenham sido detectadas no SPF pelo mesmo método. Todas as amostras de SPF provenientes de indivíduos com soro anti-HCV não reagente não foram detectadas pela PCR quantitativa *in house*. Das 24 amostras de SPF que não foram detectadas pela PCR quantitativa *in house*, todas tiveram o HCV RNA quantificado em suas amostras de soro pela técnica comercial apresentando mediana da carga viral foi igual a 1.061.100 cópias/mL (variando de 41 a 24.300.000 cópias/mL) pelo COBAS® TaqMan® HCV.

Quadro 5.1. Carga viral de HCV em cópias/mL e log₁₀ em soro e SPF utilizando a metodologia comercial e *in house*.

Número da Amostra	HCV RNA no soro pelo método comercial (cópias/mL)	Log cópias/mL	HCV RNA no soro pela PCR quantitativa <i>in house</i> (cópias/mL)	Log cópias/mL	HCV RNA no SPF pela PCR quantitativa <i>in house</i> (cópias/mL)	Log cópias/mL
1	2373300	5,944	20840	4,319	58,5	1,767
2	58590000	7,336	472000	5,674	4575	3,660
3	15066000	6,747	257200	5,410	ND	ND
4	116640	4,635	2380	3,377	ND	ND
5	116640	4,635	1834	3,263	ND	ND
6	1101600	5,611	48800	4,688	ND	ND
7	22086000	6,913	290400	5,463	ND	ND
8	2111400	5,893	38640	4,587	695	2,842
9	5616000	6,318	70400	4,848	123,25	2,091
10	685800	5,405	1972	3,295	ND	ND
11	14688000	6,736	242800	5,385	4200	3,623
12	1533600	5,754	10200	4,009	712,5	2,853
13	36990	4,137	4120	3,615	ND	ND
14	21114000	6,893	1024000	6,010	ND	ND
15	1425600	5,723	28120	4,449	249500	5,397
16	3736800	6,141	44400	4,647	ND	ND

17	1053000	5,591	27960	4,447	ND	ND
18	1069200	5,598	59200	4,772	ND	ND
19	8316000	6,489	121600	5,085	1707500	6,232
20	5346000	6,297	316400	5,500	4825	3,683
21	28944000	7,030	408000	5,611	241000	5,382
22	19818000	6,866	556000	5,745	ND	ND
23	2000700	5,870	110000	5,041	33250	4,522
24	1968300	5,863	13560	4,132	31250	4,495
25	24300000	6,954	816000	5,912	ND	ND
26	41	1,176	ND	ND	ND	ND
27	255960	4,977	2864	3,457	ND	ND
28	3.159.000	6,068	ND	ND	238750	5,378
29	6.858.000	6,405	ND	ND	ND	ND
30	3.375.000	6,097	ND	ND	1595000	6,203
31	68	1,398	ND	ND	ND	ND
32	1134000	5,623	13440	4,128	241750	5,383
33	4.509.000	6,223	ND	ND	ND	ND
34	6.210	3,362	ND	ND	33250	4,522
35	3245400	6,080	428000	5,631	31500000	7,498
36	2246400	5,920	2992000	6,476	240750	5,382
37	88020	4,513	55600000	7,745	257500000	8,411
38	4811400	6,251	3320000000	9,521	1505000	6,178
39	1431000	5,724	16920	4,228	780	2,892
40	2006	2,871	43200000000	10,635	2092500000	9,321
41	4.185.000	6,190	ND	ND	1492500	6,174
42	126090	4,669	17920	4,253	30250000	7,481
43	645300	5,378	11800	4,072	32500000	7,512
44	1541700	5,757	46800	4,670	255000000	8,407
45	8.964.000	6,521	ND	ND	30250000	7,481
46	265680	4,993	366000	5,563	252500000	8,402
47	1166400	5,635	2448000	6,389	67,5	1,829
48	40284000	7,174	52400000	7,719	2090000000	9,320
49	14850000	6,740	408000000	8,611	2107500000	9,324
50	3704	3,137	3296000000	9,518	30500000000	10,484
51	41	1,176	48000000000	10,681	ND	ND
52	78	1,459	ND	ND	ND	ND
53	1.692.900	5,797	ND	ND	ND	ND
54	1782000	5,820	5560	3,745	1402,5	3,147
55	86	1,504	ND	ND	30750000000	10,488
56	24732000	6,962	6760	3,830	807,5	2,907
57	11.610.000	6,633	ND	ND	ND	ND
58	68	1,398	ND	ND	ND	ND
59	68	1,398	ND	ND	ND	ND

*ND – Não detectado

Ao comparar os resultados da PCR em Tempo Real “in house” de SPF com a técnica *in house* padronizada em amostras de soro, foi possível observar correlação positiva entre os métodos ($r=0,515$; $p=0,004$) (Figura 5.7).

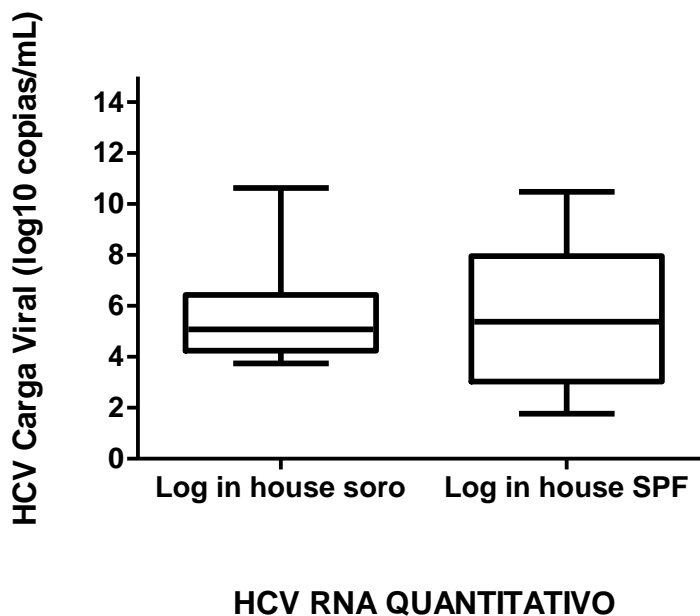
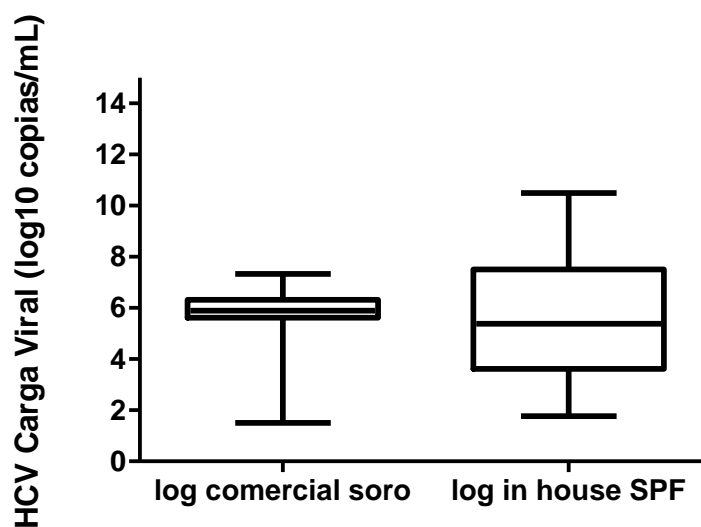


Figura 5.7. Diagrama de caixas da carga viral no soro de 29 pacientes positivos para HCV-RNA no soro e SPF. A caixa central representa os valores dos quartis inferiores (25th) e superiores (75th) e a mediana é representada pela linha horizontal. Diferenças entre os grupos (HCV-RNA positivo no soro pela PCR quantitativa *in house* versus HCV-RNA positivos no SPF pela PCR quantitativa *in house*) em relação à carga viral (log10 cópias/mL) foram significantes ($p=0,004$).

Na comparação da PCR quantitativa *in house* em SPF com a PCR comercial empregada no soro, 35 amostras foram detectadas e o coeficiente de correlação *Spearman's rho* foi igual a $R= 0,255$ ($p=0,139$) (figura 5.8).



HCV RNA QUANTITATIVO

Figura 5.8. Diagrama de caixas da carga viral no soro de 35 pacientes positivos para HCV-RNA no soro e SPF. A caixa central representa os valores dos quartis inferiores (25th) e superiores (75th) e a mediana é representada pela linha horizontal. Diferenças entre os grupos (HCV-RNA positivo no soro pelo método comercial versus do HCV-RNA positivos no SPF pela PCR quantitativa *in house*) em relação a carga viral (log10 cópias/mL) não foram significantes ($p=0,139$).

5.4. Avaliação dos Parâmetros de Qualidade da PCR quantitativa *in house*

5.4.1. Determinação da sensibilidade e especificidade da PCR quantitativa *in house*

Inicialmente os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e concordância kappa foram calculados para a PCR quantitativa *in house* em amostras de soro em comparação com a técnica comercial, onde foi possível observar 74,58% de sensibilidade e 100% de especificidade com concordância Kappa igual a 0,703 indicando uma boa concordância entre as metodologias. Ao compararmos o desempenho da PCR quantitativa *in house* em SPF com os resultados obtidos nas amostras de soro pela técnica comercial, verificamos menor sensibilidade (59,3%), porém a mesma especificidade (100%) com baixa concordância kappa (0,541). Entretanto ao compararmos a PCR

quantitativa *in house* em amostras de SPF e soro, foi possível verificar melhor desempenho da técnica *in house* em SPF com 65,9% de sensibilidade, 100% de especificidade e concordância kappa igual a 0,648 (tabela 5.2).

Tabela 5.2. Valores de Sensibilidade, especificidade, Valores Preditivos positivo e negativo e Concordância entre a PCR quantitativa *in house* e a PCR quantitativa comercial para detecção do HCV.

Métodos de quantificação avaliados	Sensibilidade (95% IC)	Especificidade (95% IC)	VPP* (95% IC)	VPN* (95% IC)	Concordância (kappa)
PCR quantitativa comercial					
(soro) x	74,58%	100%	100%	72,7%	0,703
PCR quantitativa <i>in house</i> (soro)	(61,5-85,0)	(91,1-100)	(91,9-100)	(58,9-83,8)	
PCR quantitativa <i>in house</i>					
(soro) x	65,9%	100%	100%	72,7%	0,648
PCR quantitativa <i>in house</i> (SPF)	(50,0-79,5)	(91,1-100)	(88,0-100)	(58,9-83,8)	
PCR quantitativa comercial					
(soro) x	59,3%	100%	100%	62,5%	0,541
PCR quantitativa <i>in house</i> (SPF)	(45,7-71,9)	(91,1-100)	(90-100)	(49,5-74,2)	

*VPP - Valor Preditivo Positivo; VPN - Valor Preditivo Negativo

5.4.2 Avaliação da Reprodutibilidade

A fim de avaliar a reprodutibilidade do ensaio, foram analisadas nove diluições da curva Padrão do HCV com cargas estimadas entre 10^1 e 10^9 cópias/mL (4.5.3.3) em duplicata por cinco dias distintos (Quadro 5.2).

Quadro 5.2. Valores de Ct da curva padrão avaliados em 5 dias distintos para a avaliação da reprodutibilidade.

Amostra (HCV cópias/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média	DP	CV (%)
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct			
1 (10 ⁹)	8,56	8,16	8,96	8,88	9,06	8,72	0,367	4,20%
2 (10 ⁸)	11,21	11,06	11,88	11,36	12,24	11,55	0,494	4,27%
3 (10 ⁷)	13,94	14,05	14,75	14,57	15,30	14,52	0,553	3,80%
4 (10 ⁶)	17,59	17,32	18,45	17,70	18,82	17,97	0,631	3,51%
5 (10 ⁵)	20,88	20,54	21,44	21,45	21,41	21,14	0,414	1,95%
6 (10 ⁴)	23,62	23,7	24,22	23,76	24,72	24,00	0,463	1,93%
7 (10 ³)	26,92	27,08	28,00	27,91	28,06	27,59	0,548	1,98%
8 (10 ²)	31,71	30,65	31,08	31,31	31,31	31,21	0,387	1,24%
9 (10 ¹)	33,48	33,35	34,45	33,82	34,41	33,90	0,512	1,50%

* Ct= *threshold cycle*, DP=Desvio Padrão e CV= Coeficiente de Variação

A análise estatística pelo método de Bonferroni forneceu um valor de $p=0,99$, o que demonstra uma variação não significativa entre os dados obtidos pela curva padrão em cinco dias distintos, indicando boa reprodutibilidade inter ensaio do método.

A reprodutibilidade da técnica também foi avaliada em amostras de SPF, onde 3 eram HCV reagentes e 1 HCV não reagentes. Essas amostras foram avaliadas em duplicata em três dias distintos e a média, desvio padrão e coeficiente de variação foram obtidos (tabela 5.3), onde pouca variação foi observada.

Tabela 5.3. Reprodutibilidade da PCR em tempo real na detecção do HCV em amostras de SPF (três amostras HCV RNA positivas e uma amostra HCV RNA negativa utilizadas).

CV ^a	Dia	Valores de Ct (threshold cycle)			
		SPF 1	SPF 2	SPF 3	SPF4
	1	29,6	29,5	32	ND
	2	29,5	31	33	ND
	3	29,7	31	34	ND
	Média ± DP	29,6±0,1	30,5±0,86	33±1	
	CV ^a (%)	0,34%	2,84%	3,03%	

Coefficiente de Variação

DP: Desvio Padrão

ND: Não Detectado

5.4.3 Avaliação da Presença de Inibidores

Para avaliar a presença de inibidores na PCR quantitativa *in house*, 5 amostras pareadas de soro e SPF foram testadas utilizando o reagente GAPDH na reação de PCR em tempo real *in house* utilizando o protocolo otimizado neste estudo.

Observamos na tabela 5.4, que em todas as amostras de soro e SPF previamente HCV-RNA negativas, somente o DNA exógeno foi amplificado demonstrando que estas amostras são negativas devido a ausência de sequência alvo do RNA do HCV e não pela presença de substâncias inibidoras de PCR nestas amostras. Estes resultados nos permitem distinguir os dois possíveis tipos de reações negativas: amostras identificadas como negativas devido a ausência de sequência alvo de DNA e amostras identificadas como negativas devido a presença de inibidores de PCR.

Tabela 5.5. Avaliação da presença de substâncias inibidoras em amostras de soro e SPF através de controlos exógenos internos *GAPDH*.

Detector	Valores de Ct (threshold cycle)	
	HCV (FAM)	Controle Interno (HEX)
Soro 1	ND	33,2
Soro 2	ND	4,5
Soro 3	ND	14
SPF 1	ND	29,2
SPF 2	ND	23
SPF 3	ND	19,1

ND: Não Detectado

5.5 – Detecção Qualitativa do RNA HCV

Todas as amostras de soro e SPF provenientes dos 59 indivíduos anti-HCV reagentes foram submetidas a PCR qualitativa com iniciadores para região NS5B conforme descrito no item 4.5, onde foi possível detectar o HCV RNA em 45 amostras de soro e 15 amostras de SPF pareadas a estas amostras de soro detectadas pela PCR qualitativa (Figuras 5.9 e 5.10). Dentre as 45 amostras detectadas pelo PCR qualitativo, 8 não foram detectadas pela PCR quantitativa e a mediana de carga viral pela PCR quantitativa *in house* foi igual a 59.200 cópias/mL (variando de 1834 a $3,32 \times 10^9$ cópias/mL). Dentre as 15 amostras de SPF detectadas pela PCR qualitativa, 6 também foram detectadas pela PCR quantitativa *in house* com mediana de carga viral igual a 241.250 cópias/mL (variando de 1402 a $2,09 \times 10^9$ cópias/mL).

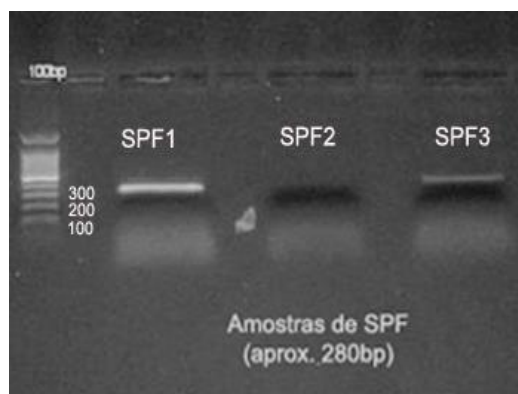


Figura 5.9. Perfil eletroforético dos resultados encontrados no RT-*nested* PCR no gel de agarose 1,5% utilizando amostras de sangue em papel de filtro. Linha 1, peso molecular 100bp. Linhas 2 e 4, amostras de sangue em papel de filtro HCV reagentes. Linha 3, amostra de sangue em papel de filtro HCV não reagente.

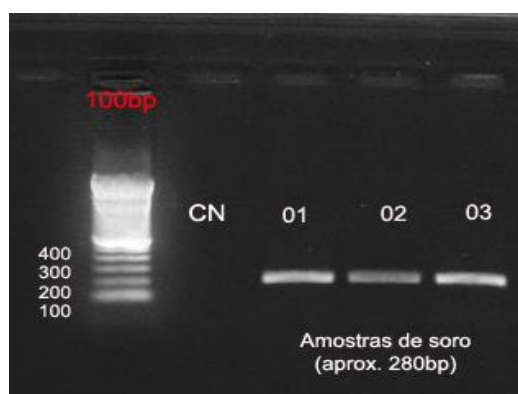


Figura 5.10. Perfil eletroforético dos resultados encontrados no RT-*nested* PCR no gel de agarose 1,5% utilizando amostras de soro. Linha 1, peso molecular 100bp. Linhas 2, controle negativo. Linhas 3 a 5, amostras de soro HCV reagentes.

5.6.- Sequenciamento das amostras de soro e SPF

Todas as amostras detectadas pela PCR qualitativa foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico, onde foi possível obter 43 sequências provenientes de amostras de soro e 11 sequências provenientes de amostras de SPF. A fim de confirmar se todas as sequências dos isolados obtidos eram do HCV, utilizamos o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificar a identidade destas sequências com sequências do HCV disponíveis no GenBank. Verificamos que todas as sequências dos isolados eram de vírus da hepatite C.

Foi calculado a distancia entre as sequências nucleotídicas e peptídicas das amostras pareadas de soro e de SPF entre si (n=11), onde o valor de distancia varou de 0 a 0,267 entre as sequências nucleotídicas (quadro 5.3) e 0 a 0,204 entre as sequencias peptídicas (quadro 5.4).

Quadro 5.3. Distância entre as sequencias nucleotidicas dos 22 isolados de HCV provenientes de 11 amostras pareadas de soro e SPF utilizando pairwise deletion e o modelo Kimura 2 parâmetros.

	SPF 1460	SPF 1287	S 1287	S 1493	SPF 1493	S 1484	SPF 1484	SPF 1610	SPF 1288	S 1288	SPF 1290	S 1290	S 1545	SPF 1545	S 1460	SPF 1485	S 1485	S 1610	SPF 1619	S 1293	S 1619	
SPF 1460																						
SPF 1287	0,069																					
S 1287	0,076	0,006																				
S 1493	0,112	0,109	0,102																			
SPF 1493	0,062	0,056	0,049	0,049																		
S 1484	0,079	0,073	0,066	0,075	0,037																	
SPF 1484	0,079	0,073	0,066	0,075	0,037	0,000																
SPF 1610	0,052	0,052	0,059	0,098	0,049	0,069	0,069															
SPF 1288	0,052	0,052	0,059	0,098	0,049	0,069	0,069	0,003														
S 1288	0,049	0,049	0,056	0,095	0,046	0,065	0,065	0,003	0,006													
SPF 1290	0,046	0,059	0,066	0,095	0,059	0,076	0,076	0,046	0,046	0,043												
S 1290	0,037	0,056	0,063	0,085	0,049	0,066	0,066	0,036	0,036	0,033	0,009											
S 1545	0,043	0,050	0,056	0,085	0,043	0,053	0,053	0,030	0,030	0,027	0,033	0,024										
SPF 1545	0,033	0,046	0,053	0,088	0,040	0,056	0,056	0,027	0,027	0,024	0,030	0,021	0,009									
S 1460	0,006	0,069	0,076	0,112	0,062	0,079	0,079	0,052	0,052	0,049	0,046	0,037	0,043	0,033								
SPF 1485	0,089	0,043	0,049	0,123	0,069	0,079	0,079	0,072	0,072	0,069	0,086	0,076	0,062	0,066	0,089							
S 1485	0,083	0,043	0,049	0,116	0,062	0,072	0,072	0,065	0,065	0,062	0,079	0,069	0,056	0,059	0,083	0,006						
S 1610	0,082	0,062	0,062	0,098	0,049	0,086	0,086	0,075	0,075	0,072	0,079	0,069	0,062	0,059	0,082	0,089	0,089					
SPF 1619	0,197	0,221	0,226	0,232	0,205	0,193	0,193	0,212	0,212	0,212	0,225	0,213	0,205	0,201	0,189	0,212	0,213	0,221				
S 1293	0,234	0,230	0,234	0,270	0,239	0,234	0,234	0,241	0,241	0,241	0,255	0,243	0,243	0,238	0,226	0,224	0,229	0,242	0,059			
S 1619	0,249	0,267	0,271	0,261	0,258	0,249	0,249	0,265	0,265	0,265	0,266	0,253	0,253	0,253	0,240	0,261	0,266	0,257	0,055	0,062		
SPF 1293	0,205	0,209	0,213	0,240	0,209	0,213	0,213	0,220	0,220	0,220	0,216	0,213	0,221	0,209	0,205	0,221	0,225	0,213	0,049	0,046	0,062	

Quadro 5.4. Distância entre as sequencias peptidicas dos 22 isolados de HCV provenientes de 11 amostras pareadas de soro e SPF utilizando pairwise deletion e o modelo de correção de Poisson.

	SPF 1460	SPF 1287	S 1287	S 1493	SPF 1493	S 1484	SPF 1484	SPF 1610	SPF 1288	S 1288	SPF 1290	S 1290	S 1545	SPF 1545	S 1460	SPF 1485	S 1485	S 1610	SPF 1619	S 1293	S 1619	SPF 1293	
SPF 1460																							
SPF 1287	0,044																						
S 1287	0,044	0,000																					
S 1493	0,106	0,080	0,080																				
SPF 1493	0,035	0,009	0,009	0,071																			
S 1484	0,053	0,027	0,027	0,080	0,018																		
SPF 1484	0,053	0,027	0,027	0,080	0,018	0,000																	
SPF 1610	0,027	0,018	0,018	0,080	0,009	0,027	0,027																
SPF 1288	0,027	0,018	0,018	0,080	0,009	0,027	0,027	0,000															
S 1288	0,027	0,018	0,018	0,080	0,009	0,027	0,027	0,000	0,000														
SPF 1290	0,053	0,044	0,044	0,097	0,035	0,053	0,053	0,027	0,027	0,027													
S 1290	0,035	0,027	0,027	0,080	0,018	0,035	0,035	0,009	0,009	0,009	0,018												
S 1545	0,035	0,027	0,027	0,080	0,018	0,035	0,035	0,009	0,009	0,009	0,018	0,000											
SPF 1545	0,027	0,018	0,018	0,080	0,009	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	0,027	0,009	0,009										
S 1460	0,000	0,044	0,044	0,106	0,035	0,053	0,053	0,027	0,027	0,027	0,053	0,035	0,035	0,027									
SPF 1485	0,053	0,027	0,027	0,088	0,018	0,018	0,018	0,027	0,027	0,053	0,035	0,035	0,027	0,053									
S 1485	0,044	0,018	0,018	0,080	0,009	0,009	0,009	0,018	0,018	0,018	0,044	0,027	0,027	0,018	0,044	0,009							
S 1610	0,062	0,018	0,018	0,097	0,027	0,044	0,044	0,035	0,035	0,062	0,044	0,044	0,035	0,062	0,044	0,035							
SPF 1619	0,142	0,142	0,142	0,159	0,133	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124	0,150	0,133	0,133	0,124	0,142	0,133	0,124	0,159					
S 1293	0,150	0,159	0,159	0,204	0,159	0,150	0,150	0,150	0,150	0,177	0,159	0,159	0,150	0,15	0,159	0,150	0,159	0,044					
S 1619	0,195	0,186	0,186	0,195	0,186	0,177	0,177	0,177	0,177	0,177	0,195	0,177	0,177	0,177	0,195	0,186	0,177	0,186	0,062	0,071			
SPF 1293	0,150	0,142	0,142	0,186	0,142	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,159	0,142	0,142	0,133	0,150	0,142	0,133	0,142	0,027	0,018	0,053		

Para a classificação do vírus da hepatite C em genótipos e correlacionar os genótipos presentes nas amostras pareadas de soro e de SPF, um segmento de 339 nucleotídeos correspondente à região NS5B foi utilizado. Todas as sequências foram editadas com o auxílio dos programas MEGA 5.0 e CLUSTAL X e comparadas com sequências padrão do HCV que estavam depositadas no *HCV Database* - Los Alamos.

Um dendrograma foi construído comparando 339 nucleotídeos da região NS5B das amostras de soro e SPF com as sequências nucleotídicas do HCV correspondentes aos subgenótipos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a, 6a, 6b. O resultado desta análise filogenética é apresentado na figura 5.13. Todas as amostras sequenciadas neste estudo foram classificadas como genótipo I, com exceção de uma amostra classificada como genótipo 3a. Entre as amostras de soro, 29 foram classificadas como subgenótipo 1b, 13 como subgenótipo 1a, 1 como genótipo 3. Entre as amostras de SPF, 9 foram classificadas como subgenótipo 1b e 2 como subgenótipo 1a. Entre as amostras pareadas (n=22) foram observados dois tipos de ocorrência: 1) Amostras pareadas com mesmo subgenótipo e com sequências idênticas (S1484 e SPF1484), 2) Amostras pareadas com mesmo subgenótipo e com sequências semelhantes (S 1287 e SPF 1287, S1288 e SPF 1288, S1290 e SPF 1290, S1293 e SPF 1293, S1460 e SPF1460, S1485 e SPF1485, S1493 e SPF1493, S1545 e SPF1545, S 1610 e SPF 1610, S1619 e SPF1619,) (figura 5.12).

As sequências obtidas neste estudo serão posteriormente submetidas ao *GenBank*. As sequências referentes às amostras de soro deste trabalho estão representadas com a sigla S na frente da numeração, enquanto que as referentes às amostras de SPF deste trabalho estão representadas com a sigla SPF na frente da numeração. As outras sequências estão identificadas com o nome correspondente ao banco de dados *Genbank*.

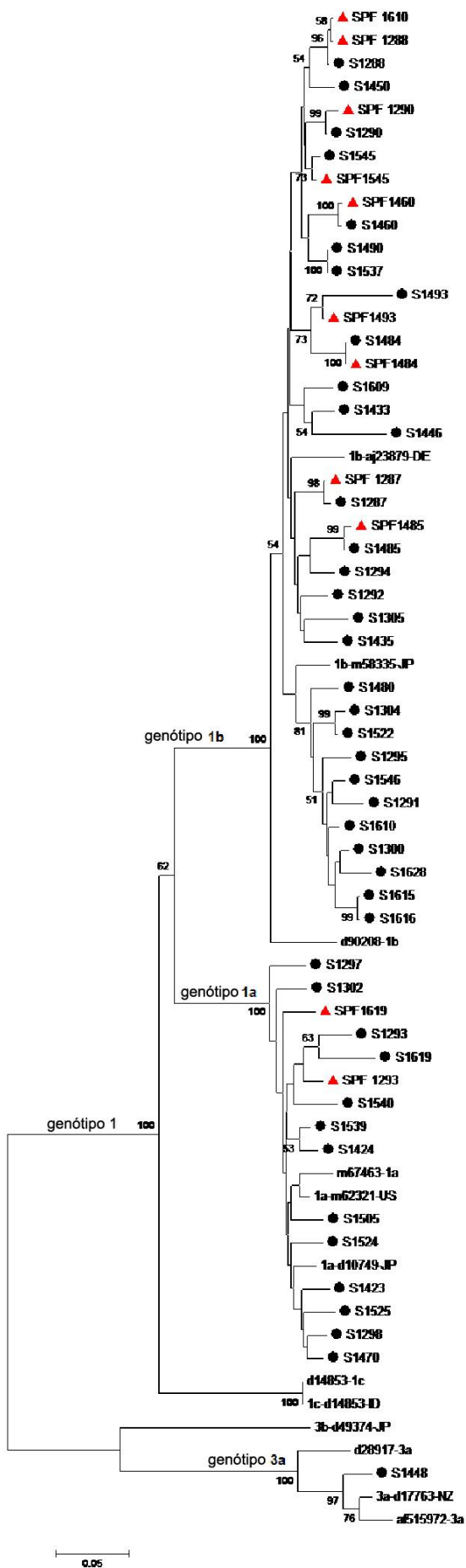


Figura 5.12. Árvore Filogenética composta por 43 sequencias de HCV oriundas de soro e 11 sequencias de HCV oriundas de SPF provenientes deste estudo e 12 sequencias de HCV provenientes dos genótipos 1 e 3 obtidas do *GeneBank*. As amostras que são deste trabalho estão representadas pelas siglas S (amostras de soro) e SPF (amostras de sangue em papel de filtro) na frente da numeração.

6. DISCUSSÃO

Os estudos com SPF iniciaram-se na década de 60 em recém-natos para detecção de fenilcetonúria (Guthrie e Suzi, 1963) e posteriormente este espécime alternativo foi utilizado para detecção de marcadores de diversas doenças infecciosas (Villa et al. 1981; Gil et al. 1997; Tappin et al. 1998; Abe e Konomi 1998; Parker e Cubitt 1999; McCarron et al. 1999; Mercarder et al. 2006; Fachiroh et al. 2008; Villar et al. 2011; Marques et al., 2012), e marcadores moleculares (Sherman et al., 2005; Tuailon E et al., 2010; De Crignis et al., 2010; Bennet et al., 2012; Santos et al., 2012; Neogi et al., 2012). O SPF representa um método de coleta de sangue alternativa, menos oneroso, mais seguro e não necessita de equipe especializada, além da facilidade de transporte e armazenamento, principalmente quando utilizados para atender demandas em populações de difícil acesso (Mei et al. 2001).

O objetivo principal deste estudo foi desenvolver métodos moleculares para detecção e quantificação do HCV em sangue em papel de filtro. A extração viral é particularmente importante principalmente quando o genoma viral é de RNA, no qual o estágio de transcrição reversa é necessário. Além disso, a baixa concentração de RNA viral e a presença de substâncias inibitórias ou de interferência são os maiores fatores limitantes da técnica (Arnal *et al.*, 1999). Portanto, é necessária a padronização de uma metodologia que permita uma alta sensibilidade de detecção de vírus em amostras de sangue em papel de filtro. Inicialmente, avaliamos o método de extração de RNA mais adequado em SPF, onde sete metodologias foram avaliadas (cinco métodos comerciais e dois métodos manuais) utilizando diluições seriadas do HCV e o conjunto *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha)* apresentou maior eficiência para detecção de HCV RNA. Este método já foi utilizado para detecção de HCV RNA em SPF pela metodologia de SybrGreen (De Crignis et al., 2011), assim como para detecção de citomegalovirus (CMV) em SPF (Atkinson et al., 2009) com ótimos resultados. Neste método, o RNA viral se liga especificamente a uma membrana gel-sílica enquanto os contaminantes passam através da membrana, sendo então eliminados. Logo, isto permite que somente o RNA alvo seja recuperado e a maior quantidade de interferentes possa ser eliminado da amostra (Ratcliff et al.).

A fim de otimizar a PCR quantitativa, a concentração de transcriptase reversa e de cDNA, assim como o número de ciclos de reação foram avaliados. Podemos observar que ao aumento da concentração da enzima Superscript (Invitrogen, CA, EUA) e do cDNA foram essenciais para maior mediana de carga viral das amostras de SPF analisadas. Este fato pode ter ocorrido devido a baixa concentração de RNA viral presente na amostra, logo a otimização da PCR é fundamental para a detecção do HCV em SPF, assim como foi demonstrado por Zhang et al. (2013) que realizaram a otimização de diversas etapas da técnica para detecção do HCV genótipo 1 em amostras de plasma.

Assim como em qualquer tipo de espécime clínico, a quantificação apropriada de patógenos virais em amostras de sangue em papel de filtro através de PCR em tempo real requer uma validação da técnica com padrões definidos e vários controles. Sendo necessário avaliar critérios esperados em qualquer teste laboratorial como: sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

A sensibilidade da PCR em tempo real avaliada através de diluições seriadas de controles de HCV em água livre de RNA/DNase foi de 10 cópias/mL, enquanto que em amostras de sangue em papel de filtro foi possível detectar o HCV até a concentração de 58,5 cópias/mL e em soro até a concentração de 1834 cópias/mL.

No presente estudo, o limite de detecção do HCV em SPF foi menor do que demonstrado por Bennet et al. 2010 que observaram um limite mínimo de 250 IU/ml, utilizando extração automatizada e detecção do RNA do HCV por técnica *in house* Taqman qRT-PCR. De Crignis e colaboradores. (2010) também obtiveram um alto limite mínimo de detecção (500 UI/ml) utilizando o conjunto comercial QIAamp DNA mini kit para extração do RNA em SPF e SYBR green PCR para detecção do HCV. Brown e colaboradores (2009) também obtiveram alto valor mínimo de detecção (1000 UI/mL) utilizado a extração automatizada easyMAG (bioMérieux) para obtenção do RNA em SPF e uma PCR desenvolvida pelo grupo.

A PCR em tempo real desenvolvida neste estudo foi baseada na linearidade da curva padrão que foi construída através da utilização de controles de HCV-RNA com números de cópias conhecidas. Neste estudo, empregamos uma curva plasmidial devido à facilidade na obtenção de grande quantidade de DNA, maior reprodutibilidade e menor custo quando comparada ao uso da curva comercial. Nossa curva padrão apresentou boa linearidade entre as diluições 1×10^9 até 10 com

coeficiente de correlação de 0,997 e slope de -3,22 (figura 5.6), ambos considerados satisfatórios, conforme relatado por outros autores (Yang *et al.*, 2002).

A análise da reprodutibilidade intra-ensaio verifica a variabilidade dos resultados dentro de um único teste, enquanto que a reprodutibilidade inter-ensaio, verifica a variabilidade dos resultados em testes realizados consecutivamente. Nossos resultados, em concordância com estudos anteriores (Yang *et al.*, 2002), demonstraram que a variabilidade inter e intra-ensaio não foram estatisticamente significativas utilizando tanto controles de HCV RNA quanto espécimes clínicos, já que observamos que as médias dos coeficientes de variação dos valores de C_t em cada diluição utilizada foram menores que 10%. Estes resultados demonstram a acurácia e a confiabilidade desta técnica, utilizando amostras de soro e de SPF.

A fim de verificar a presença de substâncias inibidoras do PCR em tempo real em amostras de sangue em papel de filtro, foram utilizados controles positivos internos, que consistem em uma proteína presente no sangue humano conforme tem sido descrito por alguns autores (Watzinger *et al.*, 2004; Abd El Galil *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2005). Observamos que em todas as amostras de sangue em papel de filtro, o sinal de fluorescência foi negativo para sequência-alvo do HCV e positivo para o DNA exógeno de vírus não-humano, indicando que a sequência-alvo de HCV não estava presente nestas amostras e que não ocorreu inibição do PCR. Portanto, estes resultados sugerem que não há substâncias de interferência ou inibidoras do PCR em tempo real nas amostras de sangue em SPF.

A PCR quantitativa *in house* para o HCV em amostras de soro apresentou boa sensibilidade e excelente especificidade em comparação com a técnica comercial. Além disto, foi observada boa correlação entre as cargas virais detectadas pelos dois métodos (teste comercial apresentou mediana de carga viral igual a 5,82 log cópias/mL e o teste *in house* apresentou mediana igual a 4,94 log cópias/mL), demonstrando a utilidade da técnica desenvolvida neste estudo em amostras de soro. Outros estudos que empregaram a PCR em tempo real para detecção do HCV em soro também apresentaram bons resultados (Yang *et al.* 2002; Puig *et al.*, 2002). Yang e colaboradores observaram um limite de detecção de 1000 cópias de RNA por reação com uma faixa dinâmica de detecção entre 10(3) e 10(7) cópias de RNA, utilizando a tecnologia de molecular beacons. Por outro lado, Puig *et al.* (2002) obtiveram o mesmo limite de detecção observado no presente estudo (10

cópias de RNA por reação) utilizando a metodologia Taqman e demonstrando boa concordância com duas técnicas comerciais (Amplicor Monitor Version 2.0 (Roche, Molecular Systems, Pleasanton, CA) e bDNA tests (Quantiplex 2.0 Chiron Diagnostics, CA)).

Observamos excelente especificidade da PCR quantitativa desenvolvida neste estudo, visto que nenhuma amostra anti-HCV não reagente foi detectada em soro ou SPF pela técnica desenvolvida. Isto foi observado também entre as 10 amostras HBsAg reagentes, demonstrando que a técnica não apresenta reações cruzadas com o HBV.

Ao avaliar as 99 amostras de SPF com a PCR quantitativa *in house*, foi possível detectar o HCV RNA em 35 amostras representando 59,3% de sensibilidade em comparação com a técnica comercial e 65,9% em comparação com a PCR quantitativa *in house* para o soro. Estes valores foram mais baixos do que aqueles observados por Tuailon et al. (2010) e Bennett et al. (2012) para a detecção do HCV em SPF. Nos dois estudos o papel de filtro empregado foi o mesmo que utilizado no presente trabalho (Whatman 903), porém foi empregada uma extração automatizada nestes dois estudos (Tuailon et al., 2010; Bennett et al., 2012), o que pode ter colaborado para melhor desempenho desta técnica na detecção do HCV em papel de filtro.

No presente estudo, a mediana da carga viral em log cópias/mL das amostras de SPF detectadas pelo método quantitativo *in house* foi bem próxima (\log_{10} 5,38 cópias/mL) aquela obtidas nas amostras de soro pareadas pelo método comercial (5,84 log cópias/mL), demonstrando a boa correlação entre as cargas virais nos dois espécimes clínicos. Estudos anteriores demonstraram que a carga viral do HCV em amostras de soro é maior do que aquela obtida em amostras pareadas de SPF (van der Eijk et al 2005; Tuailon, 2010). Por outro lado, a mediana da carga viral obtida em amostras de soro pelo método quantitativo *in house* (log 4,94 cópias/mL) foi inferior àquela observada pelas mesmas amostras pela técnica comercial (5,79 log cópias/mL). Isto pode ter ocorrido devido às diferenças entre os iniciadores e sondas empregados em ambas às técnicas, apesar dos dois métodos utilizarem iniciadores para a região 5'NC do HCV.

Neste estudo também foi realizada a detecção do HCV RNA em soro e SPF utilizando a PCR qualitativa a fim de analisar a variabilidade genética das

sequências de nucleotídeos e conseqüentemente de aminoácidos do HCV, a partir de um fragmento de 339 pares de bases correspondentes à região NS5B. Esta região foi selecionada neste estudo por apresentar um alto grau de heterogeneidade quando comparada às outras regiões genômicas e tem sido utilizada para a classificação dos isolados do HCV em genótipos (Espírito-Santo et al. 2007, Daniel et al. 2008; Lampe et al. 2010; Hope et al. 2011; Pagani et al. 2012).

Neste estudo através da análise filogenética das seqüências identificamos os genótipos circulantes nas amostras de soro e SPF incluídas. Foi possível detectar os genótipos 1a, 1b e 3a neste estudo, onde todas as amostras de soro e SPF pareadas apresentaram o mesmo genótipo. Entre as amostras de soro, 29 foram classificadas como subgenótipo 1b, 13 como subgenótipo 1a, 1 como genótipo 3. Entre as amostras de SPF, 9 foram classificadas como subgenótipo 1b e 2 como subgenótipo 1a. Ao compararmos a distância nucleotídica e aminoácida das amostras pareadas de soro e SPF (n=22), observamos valores de 0 a 0,267, onde um par de seqüências nucleotídicas foram iguais no soro e DBS (S1484 e SPF1484). Por outro lado, 9 pares de amostras de soro e SPF ficaram agrupados no mesmo braço do dendograma, enquanto o outro par apresentou maior variação entre as seqüências nucleotídicas de soro e SPF. Alta taxa de homologia entre seqüências nucleotídicas do HCV de soro e SPF já foi observada por Hope et al (2011) que analisaram amostras de soro e SPF provenientes de usuários de drogas do Reino Unido onde os genótipos de HCV mais prevalentes foram 1a e 3a.

Este estudo demonstrou a importância na utilização do sangue em papel de filtro para detecção molecular do HCV. Além disto, foi possível realizar a análise da variabilidade genética empregando amostras de SPF que apresentaram resultado semelhante aquele observado em amostras pareadas de soro. O uso da PCR em tempo real e da análise filogenética para o HCV em SPF demonstrou ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico e estudos de epidemiologia molecular do HCV. A conveniência, acurácia e a facilidade de coleta e transporte do sangue em papel de filtro, tornam este espécime uma ferramenta atrativa não apenas para a detecção de anticorpos, mas também para caracterização molecular do HCV, confirmando o potencial de sangue em papel de filtro para diagnóstico e investigação molecular da hepatite C.

7. CONCLUSÕES

- O conjunto comercial de extração *QIAamp DNA Mini Kit*, Qiagen foi o método mais eficaz para extração do RNA do HCV em amostras de SPF
- O limite mínimo de detecção da PCR em tempo real *in house* foi igual a 10 cópias de HCV por reação e limite máximo igual a 109 cópias de HCV por reação com boa reprodutibilidade;
- Foi necessário otimizar as condições da reação com o aumento da concentração da transcriptase reversa e de cDNA utilizado na reação para a quantificação do HCV RNA em amostras de SPF.
- O limite mínimo de detecção na PCR *in house* para as amostras de soro foi igual a 1834 cópias/mL e a mediana de carga viral foi inferior aquela observada nas respectivas amostras de soro avaliadas pela técnica comercial (\log_{10} 4,94 e \log_{10} 6 cópias de HCV/mL, respectivamente).
- O limite mínimo de detecção do RNA do HCV em amostras de SPF foi igual a 58,5 cópias/mL e a mediana de carga viral semelhante aquela observada nas respectivas amostras de soro avaliadas pela técnica comercial (\log_{10} 5,38 e \log_{10} 5,89 cópias de HCV/mL, respectivamente).
- Não foi observada presença de inibidores em amostras de SPF utilizando o GAPDH como controle interno;
- Em comparação a técnica comercial, a sensibilidade da PCR quantitativa *in house* foi igual a 74,58% em amostras de soro e 59,3% em amostras de SPF, com uma concordância moderada ($k=0,541$) em SPF e concordância substancial em soro ($k=0,703$), indicando que a técnica desenvolvida pode ser empregada para quantificação do HCV em ambos espécimes clínicos;
- Foi possível detectar o HCV RNA pela PCR qualitativa em 43 amostras de soro e 11 amostras de SPF, onde 11 amostras pareadas de soro e SPF foram sequenciadas e apresentaram o mesmo genótipo (genótipo 1) indicando que é possível utilizar o SPF para detecção e genotipagem do HCV;

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a interferência de determinados fatores na detecção quantitativa do HCV RNA em amostras de SPF, tal como: o tipo de papel utilizado, o hematócrito, presença de outras doenças hematológicas;
- Desenvolver um controle interno para o HCV que será utilizado desde a etapa de extração até a amplificação do HCV RNA em soro e SPF;
- Avaliar o desempenho da PCR quantitativa desenvolvida neste estudo frente a diferentes genótipos do HCV;
- Avaliar o uso do SPF para estudo da distribuição de quasiespecies do HCV.

REFERENCIAS

- Abe K., Konomi N. Hepatitis C virus RNA in dried serum spotted onto filter paper is stable at room temperature. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 36(10):3070-2. 1998.
- Abd el-Galil KH, el-Sokkary MA, Kheira SM, Salazar AM, Yates MV, Chen W, Mulchandani A.. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Nov;71(11):7113-6.
- Alter M. J.. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. V. 36: S93-S98. 2002.
- Albuquerque AC, Coêlho MR, Lopes EP, Lemos MF, Moreira RC. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Aug;100(5):467-70. Epub 2005 Sep 15.
- Andréo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, et al. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol*. 2007, 9: 2445-2456.
- Andreotti M, Pirillo M, Guidotti G, Ceffa S, Paturzo G, Germano P, et al. Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche Cobas Taqman assay. *J Clin Virol* 2010; 47: 4-7.
- Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatose in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006, 55: 123-130
- Associação Brasileira dos Portadores de Hepatite. Genótipo. 2012. <http://www.hepatite.org.br>
- Atkinson C, Walter S, Sharland M, Tookey P, Luck S, Peckham C, Griffiths P. Use of stored dried blood spots for retrospective diagnosis of congenital CMV. *J Med Virol*. 2009 Aug;81(8):1394-8. doi: 10.1002/jmv.21543.
- Arnal C, Ferré-Aubineau V, Besse B, Mignotte B, Schwartzbrod L, Billaudel S.. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. *J Virol Methods*. 1999 Jan;77(1):17-26.
- Augusto F., Lobato C.. Hepatite C. In: Cotter J, editor. *Hepatites Víricas*. Portugal: Núcleo de Gastreenterologia dos Hospitais Distritais; 2003. p. 99-130 ;
- Bennet, S., Gunson, R. N., McAllister, G. E., Hutchinson, S. J., Goldberg, D. J., Cameron, S. O., Carman, W. F.. Detection of hepatitis C virus RNA in dried blood spots. *Journal of Clinical Virology* 54 (2012) 106– 109.
- Bereczky S., Martensson, A., GIL, J. P., Farnert, A.. SHORT REPORT: Rapid DNA Extraction from archive blood spot on filter paper for genotyping of *Plasmodium Falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(3), 2005, pp. 249–251

- Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinler M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006, 281: 22236-47.
- Brass V, Moradpour D, Blum H. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int. J. Med. Sci.* 2006; 3: 29-34.
- Brooks HA, Gersberg RM, Dhar AK.. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2005 Aug;127(2):109-18.
- Brown BS, Klapper PE, Guiver M. Development of diagnostic serological and molecular screening from dried blood spots for HCV,HIV, HBV and syphilis. *J Clin Virol* 2009;44 (Supplement 1):S27-S28
- Budkowska A. Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV) – a new paradigm in virus-cell interaction. *Pol J Microbiol* 2009, 2: 93-98.
- Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 2009, 90: 1055-1070.
- Campiotto, S., Pinho, J. R. R., Carrilho, F. J., Da Silva, L. C., SOuto, F. J. D., Spinelli, V., Pareira, L.M.M.B. Coelho, H. S. M., Silva, O. A., Fonseca, J. C., Rosa, H., Lacat, C.M.C., Bernardini, A. P.. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* (2005) 38: 41-49
- Chang, K, Jiang, J., Cai, Z. and Luo G. Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* 2007, 81(24):13783. 3 October 2007.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., Houghton, M.. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science.* 1989. Disponível em: < <http://www.jstor.org>> Acesso em Outubro 2010.
- Croom H. A., Richards K. M., Best S. J., Francis B. H., Johnson E. I., Dax E. M., Wilson K. M. Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Clin Microbiol.* V. 36(1):68-71. May 2006.
- Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, Billaudel S, Ferré V. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat.* 2002 Mar;9(2):101-6.
- Daniel HD, David J, Grant PR, Garson JA, Chandy GM, Abraham P. Whole blood as an alternative to plasma for detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2008.
- De Crignis E, Re MC, Cimatti L, Zecchi L, Gibellini D.. HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2010

Espírito-Santo, M. P., Carneiro, M. A. S., Reis, N.R.S., Kozlowski, A. G., Teles, S. A., Lampe, E., Yoshida, C. F. T., Martins, R. M. B.. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2007) 40: 545-550

Fachiroh J, Prasetyanti PR, Paramita DK, Prasetyawati AT, Anggrahini DW, Haryana SM, et al. Dried-blood sampling for Epstein-Barr virus immunoglobulin G (IgG) and IgA serology in nasopharyngeal carcinoma screening. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1374-1380.

Ferrari E, He Z, Palermo RE, Huang HC. Hepatitis C virus NS5B polymerase exhibits distinct nucleotide requirements for initiation and elongation. *J Biol Chem* 2008; 283: 33893-901.

Focaccia R, Baraldo DC, Ferraz ML, Martinelli AL, Carrilho FJ, Gonçalves FL Jr, Pedroso ML, Coelho HS, Lacerda MA, Brandão CE, Mattos AA, Lira LG, Zamin I Jr, Pinheiro JO, Tovo CV, Both CT, Soares JA, Dittrich S. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004 Oct;8(5):348-55. Epub 2005 Mar 17.

Gil A, González A, Dal-Ré R, Dominguez V, Astasio P, Aguilar L. Detection of antibodies against hepatitis A in blood spots dried on filter paper. Is this a reliable method for epidemiological studies? *Epidemiol Infect*. 1997 Apr;118(2):189-91.

Gonçalves, N. S. L., Gonçalves, Jr. F. L. Laboratory testing for hepatitis C. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. V. 11 (5)Suppl. 1:22-4. 2001.

Guthrie R, Suzi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-343

Hagan, H., Thiede, H., Weiss, N. S., Hopkins, S. G., Duchin, J. S., Alexander, E. R. Sharing of drug preparation equipment as a risk factor for hepatitis C. *American Journal of Public Health*. V. 91: 42-46. 2001

HCV Ab [Bula]. Pomezia, Itália: Radim SPA; 2005.

Hartwell D, Jones J, Baxter L, Shepherd J. Peginterferon alfa and ribavirin for chronic hepatitis C in patients eligible for shortened treatment, re-treatment or in HCV/HIV co-infection: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2011 Apr;15(17):i-xii, 1-210. doi: 10.3310/hta15170. Review.

Ho, M. Hepatitis C virus : another agent transmitted by transplanted organs. *New England Journal of Medicine*. V. 15; 325(7):507-9. Aug. 1991.

Hope VD, Hickman M, Ngui SL, Jones S, Telfer M, Bizzarri M, Ncube F, Parry JV. Measuring the incidence, prevalence and genetic relatedness of hepatitis C infections among a community recruited sample of injecting drug users, using dried blood spots. *J Viral Hepat*. 2011 Apr;18(4):262-70.

Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan S-L. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigma for phosphorylation-dependent viral RNA replication. *J Virol* 2007; 364: 1-9

ICTVdB Picture Gallery (2005). **Virosphere 2005**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Disponível: URL: http://www.ictvdb.org/Images/Viroscoop2005_07minPoster.jpg

ICTVdB Management (2006). **00.026.0.03. Hepacivirus**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Disponível: URL: <http://www.ictvdb.org/Ictv/index.htm>

Kesli, R., Osdemir, M., Kurtoglu, M. G., Baykan, M., Baysal, B. Evaluation and comparison of three different anti-hepatitis C virus antibody test based on chemiluminescence and enzyme-linked immunosorbent assay methods used in the diagnosis of hepatitis C infections in Turkey. *Journal of International Medical Research*; V. 37: 1420-29. 2009.

Khaliq S, Jahan S, Hassan S. Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target. *Liver Int* 2011; 31: 606-617.

Kuo YH, Chang KC, Wang JH, Tsai PS, Hung SF, Hung CH, Chen CH, Lu SN. Is hepatitis C virus core antigen an adequate marker for community screening? *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):1989-93. doi: 10.1128/JCM.05175-11. Epub 2012 Mar 29.

Lakshmi, V., Sudha, T., Rakhi, D., Anilhumar, G., Dandona, L.. Application of Polymerase Chain Reaction to Detect HIV-1 DNA in Pools of Dried Blood Spots. *Indian J Microbiol* (Apr–June 2011) 51(2):147–152.

Lambert, N.. Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis. *Advances in Transfusion Safety*. V. 127: 113-121. 2007.

Lampe, E., Espirito-Santo, M. P., Martins, R. M. B., Bello, G.. Epidemic history of Hepatitis C virus in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 10 (2010) 886–895.

Lang, C., Sarrazin, P. Acute and Chronic Hepatitis C Diagnostic test. Chapter 12. *Hepatology: A clinical textbook*. Second Edition. 2010.

Lavanchy, D.. The global burden of hepatitis C. *Liver International*. V. 29 (s1): 74-81. 2009.

Lavanchy D. Evolving epidemiology hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 107-115.

Lemon, S.M., Walker, C. and Alter, Yi, M. (2007). Hepatitis C virus. In: D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*.

Mackiewicz V, Dussaix E, Le Petitcorps MF, Roque-Afonso AM. Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J Clin Microbiol.* 2004 Sep;42(9):4329-31.

Marques, B.L.C., Brandao, C. U., Silva, E. F., Marques, V. A., Villela-Nogueira, C.A., Do O, K.M.R, de Paula, M.T., Lewis-Ximenez, L.L., Lampe, E., Villar, L.M.. Dried Blood Spot Samples: Optimization of Commercial EIAs for Hepatitis C Antibody Detection and Stability Under Different Storage Conditions. *Journal of Medical Virology* 9999:1–8 (2012).

McCarron, B., Fox, R., Wilson, K., Cameron, S., MCmenamin, J., McGregor, G., Pithie, A., Goldberg, D.. Hepatitis C antibody detection in dried blood spots. *Journal of viral hepatitis.* V. 6(6):453-6. Nov. 1999.

McDade TW, Willians S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; 44: 889-925

McHutchison, J. G.. Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care.* 2004.

Mei, J. V., Alexander, R., Adam, B. W., Hannon, W. H.. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. *The Journal of Nutrition.* 2001. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > acesso em: Outubro, 2010.

Melnick, J. M., Howard, C. R.. Classification and taxonomy of hepatitis viruses. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, ed. NISHIOKA, K., SUZUKI, H., MISHIRO, S., ODA, T.: Springer-Verlag, p.47-49. 1994.

Mendy, M., Kirk, G. D., Van der Sande, M., Jeng-Barry, A., Lesi, O. A., Hainaut, P., Sam, O., McConkey, S., Whittle, H.. Hepatitis B surface antigenaemia and alpha-foetoprotein detection from dried blood spots: applications to field-based studies and to clinical care in hepatitis B virus endemic areas. *Journal of Viral Hepatitis.* V. 12(6):642-7. Nov. 2005.

Mercarder, S., Featherstone, D., Bellini, W. J.. Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. *Journal of Virology Methods.* V. 137: 140–149. 2006.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais. Ministério da Saúde. 2012.

Ministério da Saúde. Ministério da Saúde, Portaria N° 822. 2001. Disponível em: < <http://dtr2001.saude.gov.br> >

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Dados Epidemiológicos. Secretaria de Políticas de Saúde, Programa Nacional de Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Portaria Nº 151, de 14 de Outubro de 2009. Disponível em: < <http://bvsms.saude.gov.br>>.

Montebugnoli, L., Borea, G., Mineiro, R., Sprovieri, G.. A rapid test for the visual detection of anti-hepatitis C virus antibodies in whole blood. *Clinica Chimica Acta*. V. 288 (1-2):91-6. Oct. 1999.

Moradpour, D., Blum, H. E.. A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver International*. V. 24:519-525. 2004.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jun;5(6):453-63. Epub 2007 May 8. Review.

Moreira R, Pinho JR, Fares J, Oba IT, Cardoso MR, Saraceni CP, Granato C.. Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies. *Can J Microbiol*. 2003 Aug;49(8):503-7.

Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*; V. 47: 1-39. 1998.

Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol*. 2007 Apr;45(4):1102-12. Epub 2007 Feb 7.

Neogi U, Gupta S, Rodridges R, Sahoo PN, Rao SD, Rewari BB, Shastri S, Costa AD, Shet A. Dried blood spot HIV-1 RNA quantification: A useful tool for viral load monitoring among HIV-infected individuals in India. *Indian J Med Res*. 2012 ;136(6):956-62.

Novais, C. M., Pires-Alves, M., Silva, F. F.. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em cadeia da Polimerase. *Rev Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Edição 33°. 2004.

Pagani E, Huemer HP, Pasquetto V, Cemin C, Molon L, Rossi P, Larcher C. Comparison of hepatitis C virus subtyping by ns5b sequencing with 5'utr based methods. *Minerva Med*. 2012.

Parker SP, Cubitt WD. The use of dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol* 1999; 52: 633-639.

Parker, S. P., Cubitt W. D., Ades A. E.. A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *Journal of Virology Methods*. V. 68 (2):199-205. Nev. 1997.

Parker, S. P., Khan, H. I., Cubitt, W. D.. Detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spot samples from mothers and their offspring in Lahore, Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 37(6):2061-3. Jun. 1999.

Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, et al. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional HCV replication complexes. *J Virol* 2011; 85: 6963-6976.

Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima ML, Alencar LC, Costa M, dos Santos AA, Ximenes RA. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2013 Feb 1;13:60. doi: 10.1186/1471-2334-13-60.

Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* 2011; 7: 1-20.

Puig M, Mihalik K, Yu MY, Feinstone SM, Major ME. Sensitivity and reproducibility of HCV quantitation in chimpanzee sera using TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2002 Sep;105(2):253-63.

Ratcliff, R.M., Chang, G., TuckWeng, K., Sloots, T. P.. Molecular Diagnosis of Medical Viruses. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2007; 9: 87–102.

Romano KP, Laine JM, Deveau LM, Cao H, Massi F, Schiffer CA. Molecular mechanisms of viral and host-cell substrate recognition by HCV NS3/4A protease. *J Virol* 2011; 377-311.

Roy KM, Bagg J, McCarron B, Good T, Cameron S, Pithie A. Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol*. 1998; 54 (4):271-5.

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Santos, C., Reis, A., Santos, CV., Damas, C., Silve, M. H., Viana, M. V., Ferraz, M. L., Carnauba, D., El-Far, F., Serra, F., Diaz, R. S.. The use of real-time PCR to detect hepatitis C virus RNA in dried blood spots from Brazilian patients infected chronically. *Journal of Virological Methods* 179 (2012) 17– 20.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558–567. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70216-4.

Sherman GG, Cooper PA, Coovadia AH, Puren AJ, Jones SA, Mokhachane M, Bolton KD.. Polymerase chain reaction for diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infancy in low resource settings. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Nov;24(11):993-7.

Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. Non-A, non-B hepatitis: Ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979; 205: 197-200.

Simmonds, P.. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *Journal Gen Virology*. V.85(Pt 11):3173-88. Nov. 2004.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):962-73. Review.

Solmone, M., Girardi, E., Costa, F., Pucillo, L., Ippolito, G., Capobianchi, M. R. Simple and reliable method for detection and genotyping of hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature. *Journal Clin Microbiology*. V.40(9):3512-4. Sep. 2002.

Strauss, E. Hepatite C. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V.34(1):69-82. Jan-fev, 2001.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tappin DM, Greer K, Camaron S, Kennedy R, Brown AJ, Girwood RWA. Maternal antibody to hepatitis B core antigen detected in dried neonatal blood spot samples. *Epidemiol Infect* 1998; 121: 387-390.

Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis*. 2010;14(1):1–21. doi: 10.1016/j.cld.2009.11.009. vii.

Terrault, N. A..Treatment of recurrent hepatitis C in liver transplant recipients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005.

Toledo, A. C. JR, Januario, J. N., Rezende, R. M., Siqueira, A. L., Mello, B. F., Fialho, E. L., Ribeiro, R. A., Silva, H. L., Pires, E. C., Simões, T. C., Greco, D. B. Dried blood spots as a practical and inexpensive source for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus surveillance. *Memória Instituto Oswaldo Cruz*.;100(4):365-370. Jul, 2005.

Thompson JD, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:4876-4882.

Tuailon, E., Mondain, A. M., Meroueh, F., Ottomani, L., Picot, M. C., Nagot, N., Perre, P. Van de, Ducos, J.. Dried Blood Spot for Hepatitis C Virus Serology and Molecular Testing. *Hepatology*. 2010.

van der Eijk AA, Niesters HG, Hansen BE, Pas SD, Richardus JH, Mostert M, Janssen HL, Schalm SW, de Man RA. Paired, quantitative measurements of hepatitis

B virus DNA in saliva, urine and serum of chronic hepatitis B patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005

Villa E, Cartolari R, Bellentani S, Rivasi P, Casolo G, Manenti F. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research. *J. Clin Pathol* 1981; 34:809-812.

Villar LM, de Oliveira JC, Cruz HM, Yoshida CF, Lampe E, Lewis-Ximenez LL. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J Med Virol*. 2011 Sep;83(9):1522-9. doi: 10.1002/jmv.22138.

Wasmuth, J. C.. Hepatitis C: Epidemiology, transmission and natural history. Chapter 12. *Hepatology: A clinical textbook*. Second Edition. 2010.

Willians, I. T., Perz, J. F., Bell, B. P. Viral hepatitis transmission in ambulatory health care settings. *Clin Infectious Disease*; 38:1592-1598. 2004.

WHO. World Health Organization HCV Prevalence, 2012.

Yang JH, Lai JP, Douglas SD, Metzger D, Zhu XH, Ho WZ. Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods*. 2002 Apr;102(1-2):119-28.

You, S., Stump, D. D., Branch, A. D., Rice, C. M.. A cis-Acting Replication Element in the Sequence Encoding the NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase Is Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology*. 2004.

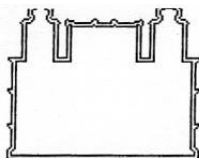
Zhao L, Feng Y, Xia XS. The different epidemic and evolution of HCV genotypes. *Yi Chuan*. 2012 Jun;34(6):666-72.

Zeisel, M. B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., Baumet, T. F.. Hepatitis C virus entry into hepatocyte: Molecular mechanisms and target for antiviral therapies. *Journal of Hepatology*. 2011.

Zhang EZ, Bartels DJ, Frantz JD, Seepersaud S, Lippke JA, Shames B, Zhou Y, Lin C, Kwong A, Kieffer TL. Development of a sensitive RT-PCR method for amplifying and sequencing near full-length HCV genotype 1 RNA from patient samples. *Virol J*. 2013 Feb 12;10:53.

ANEXOS

I- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2009.

PARECER

Título do Projeto original: "Avaliação de marcadores do vírus da Hepatite B obtidos em papel de filtro armazenadas em diferentes condições ambientais"

Título do Projeto: "Avaliação de marcadores do vírus da Hepatite B e C obtidos em papel de filtro armazenadas em diferentes condições ambientais"

Protocolo CEP: 459/08

Pesquisador Responsável: Lia Laura Lewis Ximenez S. Rodrigues

Instituição: IOC

Foram apresentados e submetidos à apreciação do CEP/FIOCRUZ o relatório parcial e emenda com alterações ao projeto original do projeto supra mencionado.

Trata-se de projeto de pesquisa iniciado em 2008 com o objetivo de caracterizar a estabilidade de amostras sanguíneas coletadas em papel de filtro para a realização de testes sorológicos para a hepatite B. O relatório parcial está em acordo com os objetivos e desenho experimental apresentados no projeto original e conta com a inclusão de 155 indivíduos até o presente.

A emenda proposta visa acrescentar a detecção sorológica para hepatite C nas mesmas amostras. Foram apresentadas alterações no título, projeto de pesquisa e TCLE.

Por se tratar da continuidade de um projeto e por não apresentar fatos novos que indiquem desacordos com a Resolução 196/96, foi aprovado o documento acima mencionado.



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ**

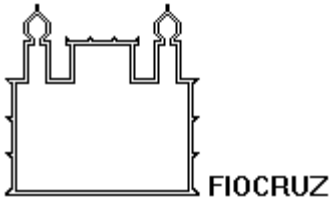
Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida à apreciação do CEP/FIOCRUZ.

Patry T. Bozza

Patricia T. Bozza
Coordenadora Interina do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz

II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hepatites Virais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz
Projeto de Pesquisa: Padronização De Testes De Diagnóstico Da Infecção Pelos Vírus Das Hepatites B e C Em Amostras De Saliva
Pesquisador: Dra. Lívia Melo Villar

Como voluntário, o (a) Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa realizada pelo Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz sob a coordenação da Dra. Lívia Melo Villar. O objetivo da pesquisa é padronizar o diagnóstico da infecção pelos vírus das hepatites B e C através de testes realizados em saliva e sangue em papel de filtro. Este documento pretende fornecer a (o) Sr. (a) informações sobre o problema de saúde em estudo, detalhando os procedimentos, exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais. O (a) Sr.(a) possui a liberdade de recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização e sem prejuízo ao seu cuidado.

Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante de informações obtidas durante o estudo. Os exames e procedimentos aplicados são gratuitos. O (a) Sr. (a) receberá todos os cuidados médicos adequados para o controle dos efeitos colaterais que possam ocorrer em consequência de sua participação na pesquisa.

Antes de assinar este termo, o Sr.(a) será informado plenamente sobre a pesquisa, não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes condições:

1. **Exames e procedimentos que serão realizados:** o voluntário será submetido à coleta de sangue e saliva. Serão coletados 8 mL de sangue por punção venosa periférica e 1 mL de saliva utilizando um coletor comercial pelos técnicos especializados do Grupo de Atendimento para Hepatites Virais (IOC/FIOCRUZ). Também serão coletados amostras de sangue em papel de filtro que serão coletadas por punção digital com lanceta e aplicadas em papel de filtro Whatmann 903. Alternativamente, as amostras de sangue total obtidas por punção venosa serão aplicadas em papel de filtro Whatmann 903.
2. **Benefícios:** Obter resultado de exames laboratoriais para Hepatite B e C que serão entregues acompanhados de esclarecimentos sobre o significado dos resultados de maneira confidencial. O (a) Sr. (a) também será encaminhado para unidades de saúde do Estado do Rio de Janeiro, nos casos em que o tratamento da hepatite se fizer necessário. Esta pesquisa poderá não trazer benefícios imediatos para o meu acompanhamento clínico, mas poderá auxiliar no desenvolvimento de métodos inovadores para o diagnóstico da infecção pelos vírus das hepatites B e C.

3. **Inconvenientes:** Caso seja necessário, o (a) Sr. (a) será contatado por um dos membros da pesquisa que irá perguntar se o (a) Sr. (a) está disposto a doar nova amostra de sangue. O (a) Sr. (a) estará livre para recusar esta solicitação.
4. **Riscos potenciais conhecidos até o dia de hoje:** Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou rouidão no local que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança.
5. **Garantia de esclarecimentos:** Todos os esclarecimentos sobre a metodologia da pesquisa antes e durante o desenvolvimento da mesma serão realizados pela equipe da Pesquisa.
6. **Utilização para estudos futuros:** O material biológico coletado, após exames, será estocado, podendo ser usado posteriormente, em outras pesquisas com fins semelhantes, mas somente após a avaliação, pelo Comitê de Ética em Pesquisa, que poderá dispensar a assinatura de um novo Termo de Consentimento, todavia mantendo sempre a identidade do doador em sigilo;

Eu, _____
 _____ (nome do(a) paciente), abaixo identificado(a) e firmado(a), declaro ter sido informado(a) claramente sobre todas as indicações e riscos relacionados à coleta de sangue e saliva.

Os termos médicos foram explicados e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pelo pesquisador _____ (nome do pesquisador).

Expresso também minha concordância e espontânea vontade em submeter-me ao referido procedimento (coleta de sangue e saliva).

Entendi que minhas informações pessoais poderão ser revistas por pessoas devidamente autorizadas para conduzir a pesquisa, porém serão estritamente **CONFIDENCIAIS** e, de forma alguma, poderão tornar-se públicas.

Assim, declaro que:

- Fui claramente informado a respeito dos benefícios que a pesquisa pode trazer na avaliação dos resultados dos exames usados no diagnóstico das hepatites virais.

- Fui também claramente informado a respeito dos potenciais riscos relacionados a coleta de sangue para a realização desses exames.

Paciente: _____ RG do paciente: _____

Sexo do paciente: () Masculino Idade: _____ Telefone: () _____
 () Feminino _____

Endereço: _____ Cidade: _____
 CEP: _____ - _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

RG do responsável legal: _____

Assinatura do paciente ou do responsável legal: _____

Pesquisador Responsável: Livia Melo Villar

RG:11403613-0/IFP

Caso tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato com o pesquisador relacionados acima:

Laboratório de Hepatites Virais, fone 2562-1918.

(local e data)

Testemunha: _____ (nome completo)

_____ (assinatura)

Assinatura do pesquisador responsável.