

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Danielle Copello Vigo

CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO ANTI-HCV

Rio de Janeiro

2012

Danielle Copello Vigo

CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO ANTI-HCV

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Orientadora: Helena Cristina B. Guedes Borges

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Vigo, Danielle Copello

Confecção de painel sorológico positivo anti-HCV / Danielle Copello Vigo. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2012.

60 f.: il.

Trabalho de conclusão do curso (Especialização em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientadora: Helena Cristina B. Guedes Borges

1. Hepatite C. 2. Kit de Reagentes para Diagnóstico. 3. Controle de Qualidade. I.
Titulo

Danielle Copello Vigo

CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO ANTI-HCV

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Helena Pereira da Silva Zamith
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Wlamir Correa de Moura
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a todos que trabalham
no Laboratório de Sangue e Hemoderivados e
a minha família que sempre foi meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo: sorrisos, lágrimas, vitórias e derrotas.

A minha família por todo apoio incondicional.

Ao meu filho Marco Paulo pelo seu sorriso pueril que ilumina todos os meus dias.

A Madeline ou Daniel, ainda no ventre, que já está somando e multiplicando a alegria da minha família.

A minha chefe Marisa C. Adati por todo ensinamento.

A Helena Guedes por toda ajuda e amizade.

A Margaret por ter muita paciência comigo como se minha mãe fosse.

A todos os colegas de trabalho.

RESUMO

O monitoramento efetivo dos conjuntos diagnósticos de uso “in vitro”, para fins de registro e consequente comercialização no país, se encontra regulamentado por força de legislação sanitária, tornando obrigatória a avaliação de sua qualidade antes dos mesmos serem comercializados no mercado nacional. A diversidade dos conjuntos diagnósticos disponibilizados a cada ano e sua variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade justificam a importância do controle da qualidade desses produtos. Neste contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) vem analisando sistematicamente conjuntos de diagnóstico de uso “in vitro” através de análise prévia, fiscal e de controle em atendimento a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o desafio de verificar a confiabilidade dos produtos comercializados e consequentemente a qualidade do sangue utilizado no país. Este trabalho teve por objetivo a confecção de um painel a ser empregado na avaliação da sensibilidade e especificidade clínica dos conjuntos de diagnóstico de uso “in vitro” utilizados na triagem e confirmação sorológica da Hepatite C. Para confecção do referido painel, foram utilizadas unidades de plasma obtidas no período de janeiro de 1996 a 2000, provenientes de Serviços de Hemoterapia das regiões Nordeste e Sudeste do país. A metodologia adotada foi a análise retrospectiva dos registros internos do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH). Das 1758 unidades de plasma encaminhadas ao INCQS, 126 estavam rotuladas pelo Serviço Hemoterápico de origem como reagentes para HCV e apenas 39 apresentaram resultados concordantes com a rotulagem. Após caracterização sorológica realizada pelo LSH, 25 das 1632 unidades de plasma, rotuladas para outros marcadores e/ou não apresentavam especificação da sorologia na rotulagem, apresentaram resultados reagentes para pesquisa de anticorpos para o vírus da Hepatite C. Portanto, 64 unidades seguiram um fluxo de ensaios, compreendendo na totalidade três testes ELISA, um ensaio de aglutinação e um ensaio de Imunoblot para melhor caracterização, confirmação e seleção para composição do painel e todas as 64 unidades tiveram seus resultados confirmados. Os resultados apresentados neste trabalho resultaram na confecção de um painel de 64 amostras de plasma reativas para pesquisa de anticorpos anti-HCV como uma ferramenta de uso potencial na implantação da capacidade analítica do LSH no controle de qualidade dos conjuntos para diagnóstico da Hepatite C.

PALAVRAS-CHAVE – Hepatite C, Conjuntos Diagnósticos, Controle da Qualidade, Painel.

ABSTRACT

The effective monitoring of diagnostic kits for "in vitro" use, for purposes of registration and subsequent marketing of the product in the country has been regulated under health legislation making it mandatory to evaluate their quality before they are marketed nationally. The diversity of diagnostic kits available each year and its variability in terms of sensitivity and specificity justify the importance of controlling the quality of these products. In this context, the Nacional Institute of Quality Control in Health (INCQS) has been systematically analyzing diagnostic kits for "in vitro" use through prior, control and fiscal analysis in response to demand from Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) to the challenge of ensuring the reliability of the products sold and therefore the quality of blood used in the country. This work aimed to the preparation of a panel to be used to check the sensitivity and specificity of clinical diagnostic kits for "in vitro" use applied in the screening and serological confirmation to Hepatitis C. For preparation of this panel, we used plasma units obtained from January 1996 to 2000, from the Hemotherapy Service of the Northeast and Southeast of Brazil. The methodology was a retrospective analysis of the internal records of Blood and Blood Products Laboratory (LSH). Of the 1758 units of plasma sent to Institute of Quality Control in Health, 126 were labeled by the origin Hemotherapy Service as reagents units for HCV and only 39 had identical results with labeling. After serological characterization performed by laboratory, 25 of 1632 plasma units labeled for other markers and/or had no specification of serologic results presented in the labeling for detection of anti-VHC. Therefore, 64 units followed a stream of essays, comprising in all three ELISAs, an agglutination assay and an immunoblot assay for further characterization, confirmation and composition of the selection panel and all 64 units had their results confirmed. The results presented in this work resulted in the production of a panel of 64 plasma samples for antibodies reactive anti-HCV as a tool of potential use in the implementation of LSH the analytical quality control of diagnostic kits for Hepatitis C.

KEYWORDS - Hepatitis C; Diagnostic Kits; Quality Control; Control Panel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	O vírus da Hepatite C	17
Figura 2	Organização do genoma do vírus da Hepatite C	18
Figura 3	Mapa de prevalência mundial da Hepatite C	20
Figura 4	Mapa de prevalência dos genótipos da hepatite C no Brasil	23
Figura 5	Janela imunológica do vírus da hepatite C (HCV) com os marcadores utilizados	28
Figura 6	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	29
Figura 7	Teste rápido	31
Figura 8	Ensaio de Aglutinação	32
Figura 9	Fitas de nitrocelulose para Immunoblot	33
Figura 10	Obtenção das unidades de plasma	38
Figura 11	Modelo de Cadastro no LSH das Unidades de Plasma	39
Figura 12	Processamento das Unidades de Plasma	40
Figura 13	Algoritmo utilizado para caracterização das Unidades de Plasma no LSH	42
Figura 14	Fluxo de testagem das amostras para composição do painel	43
Quadro 1	Conjuntos de diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica do HCV	43
Quadro 2	Interpretação do resultado por ensaio de aglutinação	45
Quadro 3	Interpretação do resultado por ensaio de imunoblot	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Taxa de detecção de Hepatite C em diferentes unidades federativas. Brasil, 2009	21
Gráfico 2	Números de óbitos por Hepatite C por região do Brasil, 2000-2010	22
Gráfico 3	Provável fonte de transmissão da Hepatite C no Brasil, 1999-2010	26
Gráfico 4	Casos confirmados de HCV segundo forma clínica, 1999-2010	27
Gráfico 5	Distribuição das unidades de plasma por região brasileira	46
Gráfico 6	Distribuição do registro da sorologia nas unidades de plasma	47
Gráfico 7	Identificação na rotulagem das unidades de plasma recebidas	49

LISTA DE SIGLAS

5 UTR	Região 5 não codificante
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
ALT	Alanina Amino Transferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b-DNA	DNA ramificado
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cDNA	Ácido Dextrorribonucleico complementar
CLIA	Ensaio de Quimiluminescência
CO	Cut-off (ponto de corte)
CPDA-1	Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina
D.O.	Densidade Ótica
E1; E2	Glicoproteína do envelope
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GEVIT	Gerência de Produtos para Diagnóstico in vitro
HAV	Vírus da Hepatite A
HBc	Anticorpo contra o vírus da Hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HDV	Vírus da Hepatite D
HEV	Vírus da Hepatite E
HFV	Vírus da Hepatite F
HGV	Vírus da Hepatite G
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LSH	Laboratório de Sangue e Hemoderivados
MS	Ministério da Saúde
NAT	Técnica de Amplificação Nucleica
NS	Não estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase Aberta de Leitura
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNHV	Programa de Prevenção e Controle das Hepatites Virais
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RLU	Unidades Relativas de Luz
RNA	Ácido ribonucleico
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SVS	Sistema de Vigilância Sanitária
TMA	Amplificação mediada por transcrição
UI/ml	Unidades Internacionais por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HISTÓRIA DA HEPATITE	12
1.2 O VIRUS DA HEPATITE C	17
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C	19
1.3.1 Distribuição geográfica dos genótipos do HCV	22
1.4 TRANSMISSÃO DO VIRUS DA HEPATITE C	24
1.5 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE C	26
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE C	27
1.6.1 Testes de Triagem	29
1.6.1.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	29
1.6.1.2 Ensaio de Quimioluminescência	30
1.6.1.3 Ensaio Imunocromatográfico (teste rápido)	30
1.6.1.4 Ensaio de Aglutinação	31
1.6.2 Teste Confirmatório	32
1.6.2.1 Ensaio de Immunoblot	32
1.6.3 Testes Moleculares	33
1.6.4 Características dos Testes Sorológicos	34
2 OBJETIVO GERAL	36
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 AS UNIDADES DE PLASMA	37
3.2 RECEBIMENTO, CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA	39
3.3 PROCESSAMENTO DAS UNIDADES DE PLASMA	39
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA	41
3.5 INTERPRETAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL	44
3.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	44
3.5.2 Ensaio de Aglutinação em Partículas	44
3.5.3 Ensaio Confirmatório (Imunoblot)	45
4 RESULTADOS	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS	46

4.1.1 Distribuição quanto a procedência das unidades de plasma	46
4.1.2 Integridade física e volume das unidades de plasma recebidas	46
4.1.3 Identificação da reatividade na rotulagem: registro de sorologia positiva	47
4.1.4 Resultados dos testes sorológicos realizados	47
4.1.5 Resultados sorológicos obtidos x Rotulagem	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
GLOSSÁRIO	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DA HEPATITE

A primeira definição de hepatite (icterícia epidêmica) foi atribuída a Hipócrates no século IV a.C em seus relatos. Entretanto, os babilônios já haviam feito referências a surtos epidêmicos de icterícia entre seu povo há cerca de 2500 anos e os chineses, há mais de 5000 anos (FONSECA, 2010).

Os quadros de icterícia epidêmica ocorreram por séculos e foram marcantes, sobretudo, nos períodos de guerras e catástrofes humanas devido a piora de condições sócio-higiênicas locais e as grandes epidemias quase sempre coincidiram com as guerras. Daí a origem das designações de "icterícia de campanha" em uso desde a Idade Média e de "doença do soldado", de introdução mais recente e naquela época, essas epidemias de icterícia influenciavam de modo desfavorável nas campanhas militares. Durante a Guerra de Secessão Americana (1861-1865), mais de 40000 soldados dos exércitos da União foram atingidos e mais de 16 milhões de soldados durante a Segunda Grande Guerra Mundial (FONSECA, 2010).

A partir de 1883, começaram a ser publicados relatos de casos de um tipo diferente de icterícia em indivíduos que receberam hemocomponentes e medicamentos injetáveis e compartilhavam material perfuro-cortante. Em 1885, foi documentado o primeiro episódio de uma epidemia em um estaleiro naval em Bremen, na Alemanha. Observou-se que 191 trabalhadores de um total de 1289 desenvolveram icterícia após 2 a 6 meses da inoculação de uma vacina contra varíola preparada com a linfa humana, o mesmo não ocorrendo entre aqueles que não foram vacinados (FONSECA, 2010). Este documento é importante porque aponta, pela primeira vez, para a exposição parenteral como uma possível via de transmissão da doença e representa, retrospectivamente, o reconhecimento da primeira epidemia de hepatite viral B. Em 1909, novos casos de icterícia foram associados ao uso de medicações injetáveis, sobretudo aos tratamentos relacionados às doenças sexualmente transmissíveis, como no caso da sífilis (FONSECA, 2010). Em 1922, com o advento da insulina parenteral, começaram a surgir casos de icterícia em pacientes diabéticos na Suécia. Foram analisados cuidadosamente os dados disponíveis, concluindo que a epidemia teria sido causada por uma

infecção viral transmitida de doente para doente pelas lancetas contaminadas que eram apenas limpas, rotina adotada naquela época. O volume de publicações a respeito da epidemiologia e história natural da doença já era suficiente para reconhecer que se tratava de um agente infeccioso viral que podia se apresentar sob duas formas clínicas semelhantes mas diferentes epidemiologicamente. Os primeiros relatos, já mencionados anteriormente, estão ligados às icterícias que coincidiram com períodos de calamidade pública e social, com deterioração das condições higiênicas da população, sobretudo, nos períodos das guerras. Os relatos seguintes apontavam notadamente para a associação da hepatite cuja forma de transmissão era a via parenteral (FONSECA, 2010).

Na fase seguinte, os estudos científicos passaram a abordar trabalhos realizados em voluntários. Em 1942, aconteceu a primeira transmissão de hepatite a voluntários: H. Voegt e três alunos de Medicina ingeriram suco duodenal de um doente com hepatite. Todos apresentaram os sintomas da doença de três a quatro semanas após a ingestão. Nessa linha de investigação, as maiores contribuições foram deixadas por MacCallum, na Inglaterra. A este pesquisador, que conduziu vários dos seus estudos em modelos experimentais humanos, se deve os termos hepatite A e B, para diferenciar a hepatite de transmissão orofecal da hepatite de transmissão parenteral a partir de 1947 (FONSECA, 2010).

Os trabalhos de investigação prosseguiram intensamente, buscando a identificação dos agentes infecciosos responsáveis pelas duas formas de hepatite. Em 1965, Baruch Blumberg, um geneticista do National Institute of Health (NIH), na Filadélfia, no decurso de outras investigações científicas do Instituto, descobriu um antígeno que reagia com o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos no soro de um aborígine australiano, a que foi atribuído o nome de antígeno Austrália. Este achado ocasional foi um marco no estudo das hepatites virais (BLUMBERG, ALTER, 1965 apud FONSECA, 2010).

Em 1968, Alfred Prince observou o desenvolvimento de hepatite pós transfusional em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. Os soros desses pacientes reagiram positivamente com o anti-soro de um hemofílico politransfundido e em um dos doentes, surgiu um aumento significativo das transaminases após 3 meses de cirurgia que necessitou de várias transfusões e quando realizada uma biopsia hepática, havia lesões compatíveis com hepatite viral aguda. O estudo das amostras dos soros colhidos mostrou que o doente passou a ser antígeno positivo várias semanas antes da doença se tornar evidente, negatizando alguns meses depois. Posteriormente, se evidenciou que o antígeno em questão era o australiano que passou a ser

designado de antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) (BLUMBERG et al, 1967 apud FONSECA, 2010). Na primeira metade da década de 70, já se sabia que a Hepatite B era transmissível pela saliva, sêmen e ao feto, pela placenta.

O vírus da Hepatite A (HAV) foi descoberto em 1973, oito anos após a descoberta do vírus da Hepatite B. Stephen Feinstone descreveu, pela primeira vez, a visualização, por microscopia eletrônica, de partículas virais nas fezes de voluntários em cárcere em Washington, nos quais havia sido inoculado o vírus. Uma vez que não existe o estado de portador crônico da hepatite A, os estudos em modelos animais e o cultivo celular foram de suma importância para o desenvolvimento de uma vacina com vírus atenuado no início da década de 80 (FEINSTONE, 1973 apud FONSECA, 2010).

Já o vírus da hepatite D (HDV) foi descoberto em 1977. Rizzetto e colaboradores estudaram biópsias hepáticas de doentes soropositivos para o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) através de imunofluorescência e identificaram um novo sistema antígeno/anticorpo, imunologicamente distinto dos sistemas da Hepatite B. Verificaram, ainda, que esse agente só aparecia em indivíduos HBsAg positivos. O agente Delta, que posteriormente passou a ser designado "vírus da hepatite D", é um vírus defeituoso, sem envelope próprio, cuja principal característica é utilizar o envelope do vírus da hepatite B para tornar viável a sua sobrevivência e replicação. No interior do envelope, não existe um capsídeo, mas uma proteína específica do vírus da hepatite, o Ag HD. O vírus D, para a sua replicação e expressão, necessita do auxílio do HBV, razão pela qual só infecta indivíduos HBsAg positivos. A infecção pode ocorrer na presença de infecção aguda ou crônica da hepatite B. O risco de evolução para um quadro crônico com cirrose hepática pode ser acelerado nos portadores crônicos da hepatite B. Até ao momento, não foi desenvolvida uma vacina contra a hepatite D (RIZETTO, 1990 apud FONSECA, 2010). A sua necessidade se limita aos portadores crônicos do HBV, uma vez que a vacina da Hepatite B previne simultaneamente a Hepatite D nos indivíduos soronegativos

Com a implementação de testes para pesquisa de HBsAg em sangue de doadores e com mudanças na política de doação, se esperava uma redução drástica nos números de casos de transmissão de hepatite pós transfusional. O risco de transmissão de hepatite B pós transfusional chegou a quase zero em países desenvolvidos no final da década de 70. Apesar das medidas implantadas, 5 a 10% dos receptores de sangue e seus derivados eram contaminados (FEINSTONE, 1975 apud FREITAS, 2010). Com a exclusão do vírus da

hepatite A como agente causador da infecção, esta doença foi identificada como hepatite viral pós-transfusional não A e não B em 1975. Com estudos experimentais em primatas contaminados com sangue de portadores da hepatite não A e não B em 1978, Bradley e colaboradores do Centro de Controle de Doença de Atlanta-EUA revelaram um agente revestido por uma camada lipoprotéica com genoma constituído de RNA e pertencente à família *Togaviridae*, atualmente, à família *Flaviridae* (BRADLEY; CAUSTLAND; COOK, 1985). Somente com os avanços da engenharia genética e da biologia molecular, em 1989, Houghton e colaboradores identificaram o genoma viral da hepatite não A e não B. Tal agente ficou conhecido como vírus da hepatite C (HCV).

Após a clonagem do HCV e uma seqüência de descobertas, como: desenvolvimento de testes que permitiram a detecção de anticorpos e a determinação da seqüência de suas bases nucleotídicas, foi possível conhecer os principais aspectos biológicos, epidemiológicos e a história natural da doença que atinge 3% da população mundial, segundo a OMS.

O vírus da hepatite E (HEV) foi descoberto por Reyes e colaboradores através de estudos experimentais em primatas e técnicas de clonagem em 1990. Entretanto, a primeira grande epidemia de que há referência desta hepatite ocorreu em New Delhi, na Índia, entre 1955 e 1956 (PURCELL, 1993 apud FREITAS, 2010). A hepatite E se trata de um vírus constituído de RNA, não envelopado, que apresenta semelhanças com os vírus da família *Caliciviridae*. Existem três genótipos classificados, porém se conhece pouco sobre a distribuição dos genótipos em todo o mundo (HARRISON, 1999 apud FREITAS, 2010). De uma maneira geral, a mortalidade por esta virose é baixa. A vacina contra HEV continua em fase de estudo experimental e clínico.

O vírus da hepatite F (HFV) foi descrito, por um grupo indiano em 1994, como um vírus esférico detectado nas fezes de doentes franceses e que foi possível transmitir ao macaco Rhesus. Pesquisas científicas revelam que este vírus não foi ainda bem caracterizado, nem foram apresentados testes sorológicos para a sua identificação (DEKA, 1994 apud FREITAS, 2010).

O vírus da Hepatite G (HGV) foi identificado em estudos com macacos em 1995 quando foi inoculado o plasma de um doente com uma presumível hepatite crônica pós-transfusional não A e não E. A hepatite desencadeada foi denominada hepatite G (KIN, 1995 apud FREITAS, 2010).

Na mesma época, o soro de um cirurgião de Chicago, com as iniciais GB, que tinha sofrido uma hepatite aguda não A e não E, foi inoculado no macaco sagüi, provocando hepatite aguda e posteriormente em um novo macaco tamarino. Por técnicas de biologia

molecular, foi possível identificar dois vírus da família dos flavivírus: VGB-A e VGB-B. Na seqüência dos estudos efetuados, viria a ser identificado um terceiro vírus que se revelou próximo do VGB-A, pelo que lhe foi atribuído o nome de VGB-C. Comparando a seqüência de nucleotídeos dos 3 agentes GB e do vírus G, se verificou que eram variantes do mesmo vírus (SIMONS, 1995 apud FREITAS, 2010).

A infecção pelo HGV e VGB-C está presente numa percentagem elevada de doadores de sangue voluntários e não é mais frequente nos doadores excluídos por apresentarem aumento da ALT (ALTER, 1997). Assim, não está ainda bem estabelecido se esses seriam vírus hepatotrópicos.

Durante as últimas quatro décadas, descobertas e progressos notáveis foram realizados em relação à patogênese, diagnóstico, tratamento e prevenção da hepatite viral. A implementação de políticas e estratégias sanitárias, destinadas a prevenir a infecção e a minimizar o impacto na saúde pública, contribuem cada vez mais para grandes mudanças na epidemiologia dessas doenças. Em consequência, as taxas mundiais de prevalência para as hepatites virais diminuíram nos últimos 30 anos mas ainda há relatos de casos de surtos e mortes.

Nos Estados Unidos, foram estimadas 18.000 novas infecções agudas pelo HCV. Apesar da redução em números de casos notificados para a hepatite viral aguda, no período de 1995 a 2009, no país, os dados para hepatite crônica são alarmantes. Estima-se que 2,7 a 3,9 milhões de norte-americanos sejam portadores crônicos de HCV. Em 2007, uma taxa de óbito de 4,6 por 100.000 habitantes foi registrada para a hepatite C (CDC, 2009).

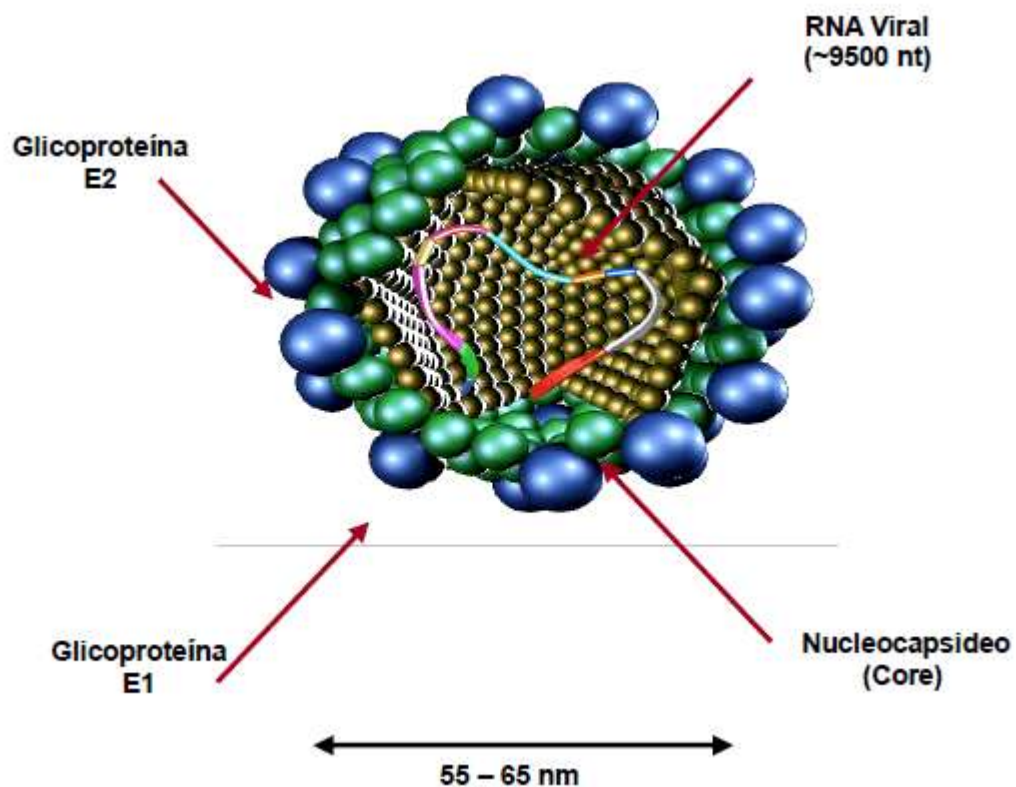
Assim, as hepatites virais são um grave problema de saúde pública mundial. Elas tem grande importância pelo número de indivíduos atingidos e pela possibilidade de complicações, passando da forma aguda para a crônica.

No Brasil, de acordo com o inquérito de hepatites virais, publicado em 2011, a taxa de prevalência nacional para Hepatite C é 1,38%. Segundo dados preliminares do censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a população brasileira contabilizada é de aproximadamente 191 milhões de brasileiros, logo 2,5 milhões de pessoas são portadoras do vírus da Hepatite C.

1.2 O VÍRUS DA HEPATITE C

O vírus da Hepatite C foi primeiramente identificado pela clonagem de cDNA do plasma de um chimpanzé infectado com fator XIII contaminado (ZEIN, 2000). É pertencente à família *Flaviridae* com homologia à família *Pestiviridae* (MILLER; PURCELL, 1990) e atualmente foi classificado como um gênero distinto dentro da família, chamado de *Hepacivirus* (ICTV, 2009). A partícula viral apresenta uma cadeia única de RNA com polaridade positiva com um genoma de aproximadamente 9600 nucleotídeos, um capsídeo de simetria icosaédrica e um envelope lipídico (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2007) (Figura 1).

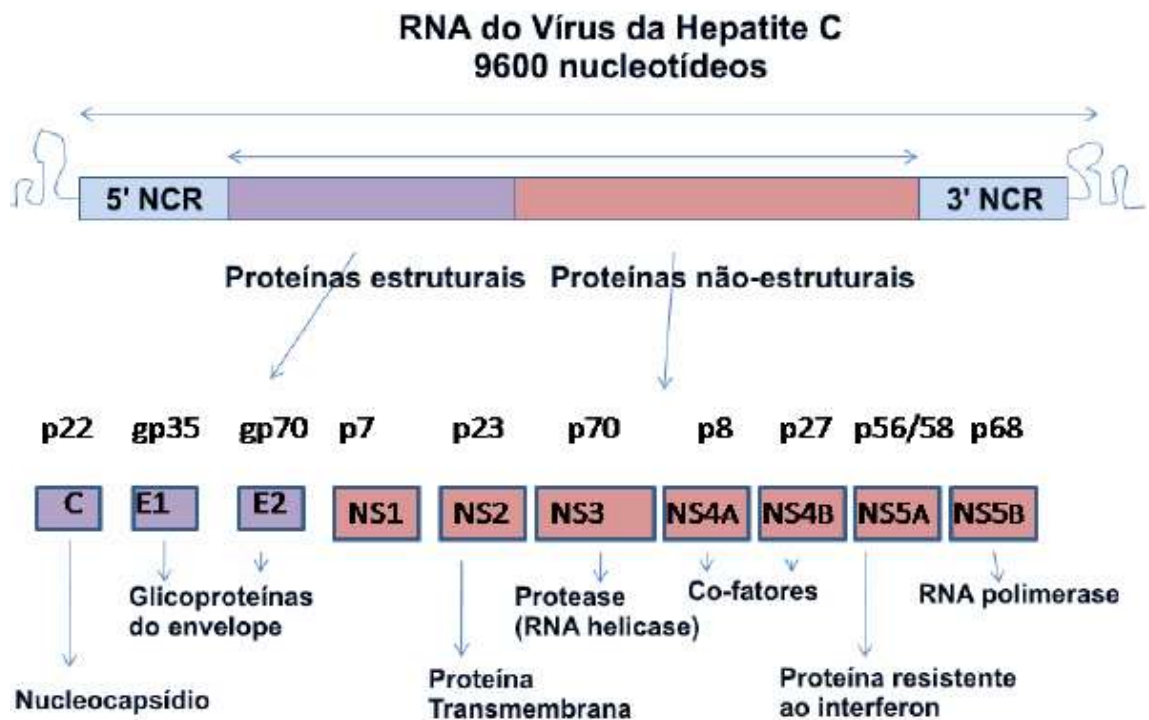
Figura 1- O vírus da Hepatite C



Fonte: SILVA, 2008

O genoma viral apresenta duas regiões não traduzidas (UTR-untranslated region) nas extremidades 5' e 3', flanqueada por uma única fase aberta de leitura (ORF-open reading frame) cuja região codificante traduz uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos. Antes e após a tradução, esta poliproteína é clivada, por proteases virais e celulares, em proteínas estruturais (core, E1, E2) e as não estruturais ou NS (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (ZEIN, 2000) (Figura 2).

Figura 2- Organização do genoma do vírus da Hepatite C



Fonte: SILVA,2008

As proteínas estruturais estão localizadas na porção amino-terminal 5', sendo a proteína do core a principal constituinte do nucleocapsídeo. As proteínas E1 e E2, altamente glicosiladas, são formadoras do envelope e responsáveis pela entrada da partícula viral no hepatócito (DUBUISSON,2007). Entretanto, NS1, localizada no término da E2, é um polipeptídeo altamente hidrofóbico de função desconhecida mas estudos recentes sugerem que a p7 é importante para montagem e liberação eficientes de virions (STEINMANN et al, 2007). As proteínas não estruturais, como o termo indica, não são constituintes da partícula

viral, porém são importantes na replicação do RNA viral (BARTENSCHAGER; LOHMANN, 2000).

O vírus da hepatite C, por ser constituído de RNA, apresenta uma grande variabilidade genética. A taxa de mutação foi estimada em $1,9 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos por sítio por ano (LYRA; FAN; BISCEGLIE, 2004; MAGIORKINIS et al, 2009). Depois que o genoma completo do HCV foi determinado por Choo et al em 1989, sequências nucleotídicas de diferentes isolados e de diferentes regiões geográficas foram sequenciadas e comparadas. Diante da comparação de análise filogenética parcial e total em todo o genoma viral, foram identificados 6 genótipos principais, numerados em algarismos arábicos, que diferem em 33% em suas sequências de nucleotídeos cuja variabilidade ocorre em toda extensão do genoma, incluindo a região 5'UTR, a mais conservada, e a região hipervariável E. Dentro dos genótipos, foram identificados subtipos que apresentam uma variabilidade nucleotídica em torno de 20% e são classificados por letras minúsculas com base em suas sequências das regiões core, E1 e NS5B (LYRA;FAN;BISCEGLIE, 2004; SIMMONDS et al, 1994, 2005).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

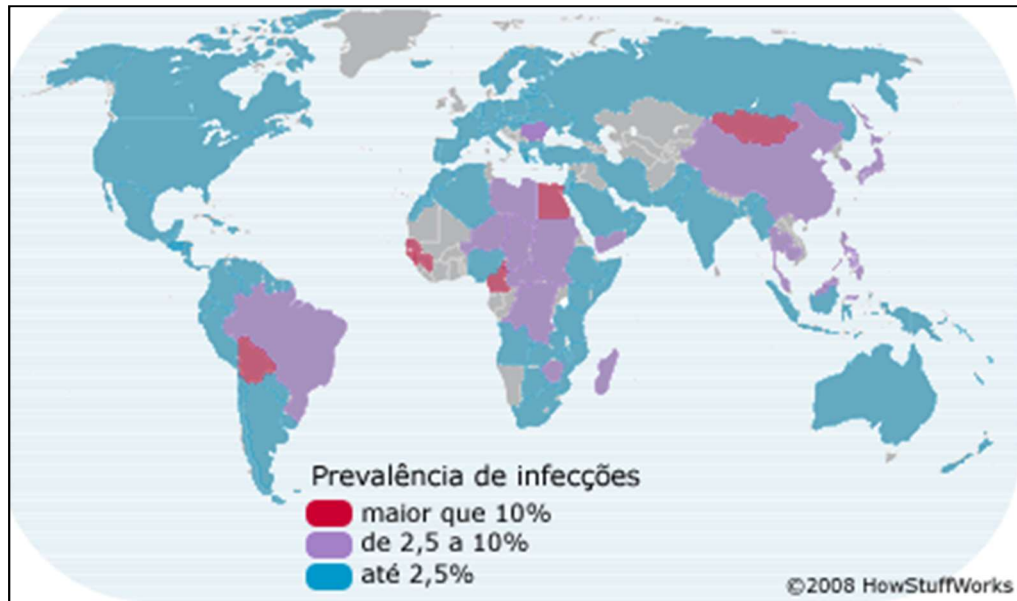
Desde a descoberta da Hepatite C, em 1989, esta passou a ter especial relevância entre as principais causas de doenças hepáticas crônicas. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), se estima que 3% da população mundial sejam portadores do HCV. Portanto, aproximadamente 170 milhões de pessoas são soropositivas para a hepatite C, 60 a 80% evoluem para a forma crônica e 20% destes desenvolvem cirrose hepática no período de 20 anos (CHUAN-MO LEE et al, 2008). Cerca de 350.000 pessoas morrem por hepatite C anualmente (OMS, 2011).

A distribuição das hepatites virais é universal, sendo que a prevalência dos diferentes tipos varia de região para região e no Brasil, também há essa variação regional.

Como a incidência de Hepatite C numa escala não é bem conhecida uma vez que a maioria dos portadores é assintomática, a OMS acredita que há 5 a 10 milhões de portadores na Europa Ocidental, 2 a 4 milhões nos EUA e cerca de 12 milhões na Índia. Segundo Chuan-

Mo Lee et al (2008, p.17, grifo nosso), “**em alguns vilarejos Tawanenses, 50% da população é positiva para HCV**”. As estimativas da OMS consideram o Brasil como um país de endemicidade intermediária com prevalência entre 2,5 e 10% (OMS apud MS, 2011) (Figura 3).

Figura 3 – Mapa de prevalência mundial da Hepatite C



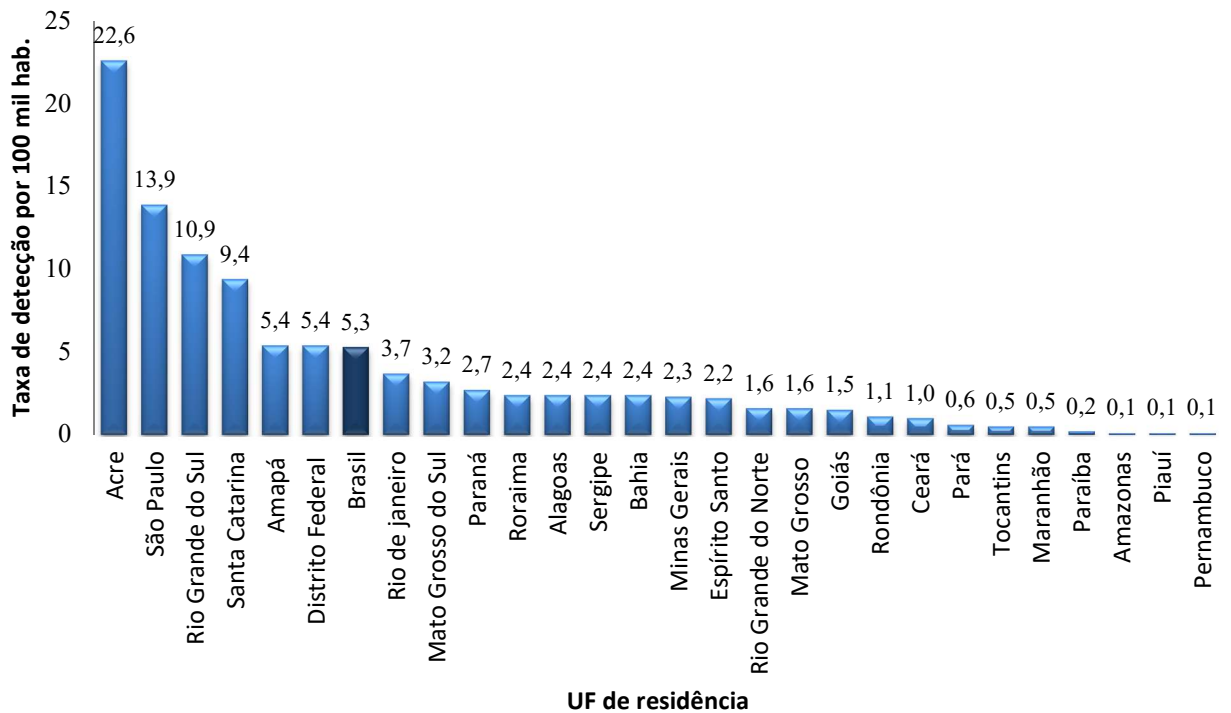
Fonte: howstuffworks. Disponível em: <<http://viagem.hsw.uol.com.br/vacinacao-viagens4.htm>>

Em 2002, no Brasil, foi implantado o Programa para Prevenção e Controle das Hepatites Virais (PNHV) e recentemente, este programa foi integrado ao Departamento de DST e Aids da Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde, passando a ser designado de Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, por considerar a necessidade de desenvolver estratégias eficazes no controle e prevenção das hepatites. O Brasil adota o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) que é alimentado pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos que constam da lista nacional de doenças de notificação compulsória, conforme preconizado pela Portaria GM/MS Nº 104, de 25 de janeiro de 2011.

De acordo com o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais de 2011, no período de 1999 a 2010, 69.952 casos de Hepatite C confirmados foram registrados no SINAN, sendo que 90% dos casos correspondem as regiões Sul e Sudeste. Assim, a taxa de prevalência de HCV no país é de 1,38%, inferior a estimada pela OMS.

A taxa de detecção nacional de Hepatite C confirmada foi de 5,3 em 100 mil habitantes no ano de 2009 com destaque para o estado do Acre que apresenta uma taxa de 22,6, superando os estados São Paulo e Rio Grande do Sul com taxas de 13,9 e 10,9, respectivamente (Gráfico 1).

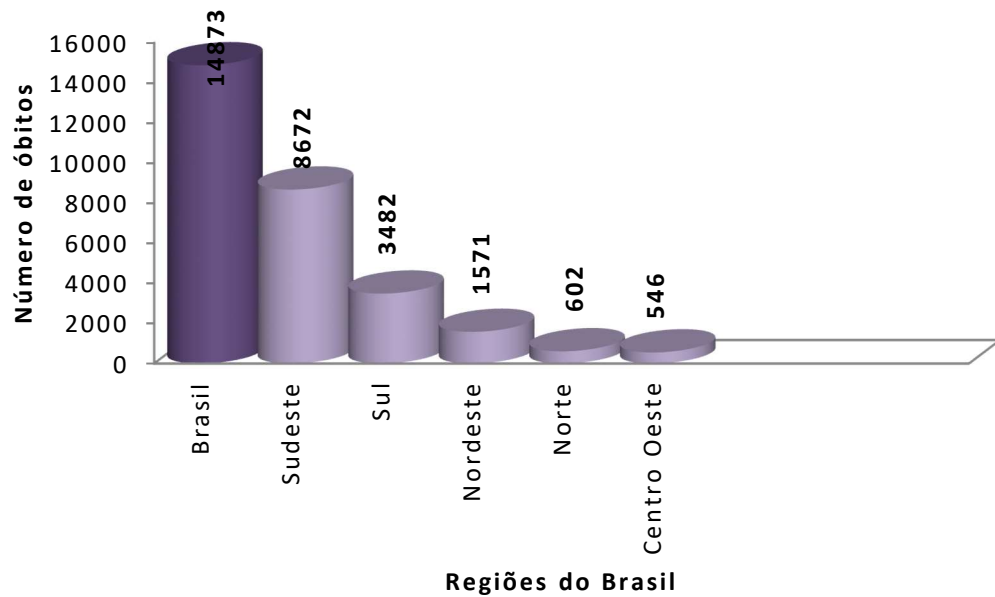
Gráfico 1- Taxa de detecção de Hepatite C em diferentes unidades federativas. Brasil, 2009



Fonte: BRASIL, 2011.

Dentre os óbitos atribuídos à hepatite C como causa principal, o Brasil registrou 14.873 eventos no período de 2000 a 2010, contudo, quando são analisadas as causas associadas às mortes, há um aumento de 83%. As regiões Sul e Sudeste, além de apresentarem as maiores taxas de detecção de HCV, também concentram as maiores taxas de mortalidade (BRASIL, 2011).

Gráfico 2- Números de óbitos por Hepatite C por região do Brasil, 2000-2010.



Fonte: BRASIL, 2011.

1.3.1 Distribuição geográfica dos genótipos do HCV

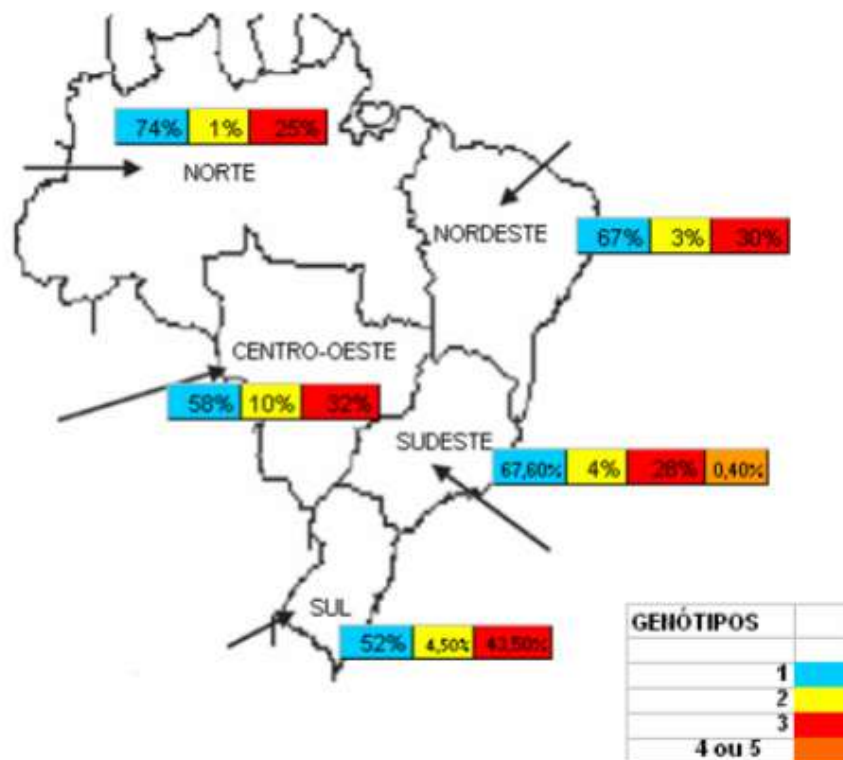
A distribuição geográfica dos genótipos e seus subtipos apresenta uma significativa variação na frequência com que são observados. Os genótipos 1, 2 e 3 tem uma distribuição universal, representando 60% das infecções em todo o mundo (OMS, 1999) enquanto que os genótipos 4 e 5 aparecem predominantemente na África e o genótipo 6, na Ásia (SETO et al, 2010).

Nos Estados Unidos e Europa, os subtipos 1a e 1b são predominantes, enquanto que o 1b é responsável por mais de 73% dos casos de infecção por hepatite C no Japão. Em relação ao genótipo 2, os subtipos 2a e 2b são comuns na América do Norte, Europa e Japão enquanto que o 2c é comumente encontrado no norte da Itália (ZEIN, 2000). No Egito, o subtipo 4a é generalizado (SETO et al, 2010).

No Brasil, Campiotto e colaboradores (2005) fizeram um estudo sobre a distribuição geográfica dos genótipos da Hepatite C com amostras coletadas de pacientes cronicamente infectados de diversas regiões brasileiras. Na população estudada, foram achados os genótipos 1, 2, 3, 4 e 5 com uma frequência de 64,9% para o genótipo 1, 4,6% para o genótipo 2, 30,2% para genótipo 3, 0,2% para genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5. Em todas as regiões, o

genótipo 1 foi o mais frequente, principalmente na região Norte do país. O genótipo 2 prevalece na região Centro-Oeste, especialmente no Mato Grosso. A frequência do genótipo 3 foi maior na região Sul (Figura 4). Os genótipos 4 e 5 foram achados raros e detectados apenas no estado de São Paulo (CAMPIOTTO et al, 2005). Entretanto, foi confirmado um caso de genótipo 4, subtipo 4c/d em Salvador, Bahia (ZARIFE et al, 2006).

Figura 4- Mapa de prevalência dos genótipos da hepatite C no Brasil



Fonte: SILVA, 2008.

Os pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) realizaram recentemente um estudo pioneiro para investigar a história da hepatite C no Brasil, constatando que os subtipos 1a, 1b e 3a prevalecem e que “começaram a circular no país na segunda metade do século XX, coincidindo com a introdução da prática de transfusão sanguínea” (FIOCRUZ, 2011).

A genotipagem tem-se mostrado muito relevante na epidemiologia, história natural e evolução da doença, principalmente na área clínica em relação ao protocolo de tratamento e a taxa de resposta sustentada à terapia (BRANDÃO et al, 2001).

1.4 TRANSMISSÃO DO VIRUS DA HEPATITE C

A transmissão do HCV ocorre por várias vias, contudo a maioria das infecções se dá pela forma parenteral. Assim, o HCV é transmitido pelo contato com sangue infectado em virtude de exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemocomponentes e transplante de órgãos de doadores infectados. Outras rotas importantes de transmissão são a perinatal, exposição ocupacional, o uso de drogas ilícitas, principalmente as injetáveis e o uso de equipamentos não seguros em terapias invasivas e para fins estéticos, culturais e religiosos, como: tatuagem; piercing; rituais de escarificação; circuncisão e acupuntura (MARTINS; SCHIAVON; SCHIAVON, 2011). A transmissão sexual e o compartilhamento de itens em ambiente domiciliar são meios de transmissão menos eficientes (CDC, 1998).

A transfusão de sangue e de hemocomponentes foi a principal fonte de transmissão do HCV no período de 1960 a 1990. Estima-se que 5% a 15% dos receptores de sangue e hemocomponentes foram contaminados no mundo (DONAHUE et al, 1992). Com a introdução dos testes de diagnóstico para Hepatite C na triagem do doador em 1990, o risco de infecção pós transfusional apresentou relevante queda, principalmente nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, o declínio registrado foi de 0,45% para 0,03 por unidade de sangue transfundida (DONAHUE et al, 1992) e com a melhoria na sensibilidade dos kits de diagnóstico, o risco é estimado em 0,001% /por unidade transfundida (CDC, 1998). No entanto, ainda há registros de altos índices de transmissão do HCV por transfusão em outras áreas do mundo. No Chile, em estudo realizado com portadores de infecção crônica por HCV, 54% destes tiveram a transfusão sanguínea como via de contaminação (SY; JAMAL 2006) e o mesmo ocorre no Brasil. Segundo Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, publicado em 2011, 15,8% dos 69.952 casos confirmados de Hepatite C, no período de 1999 a 2010, tiveram a via transfusional como fonte de infecção.

Em relação aos pacientes com coagulopatias, a taxa de prevalência chegou a 90% quando tratados com medicamentos derivados do plasma humano, antes da introdução do

procedimento de inativação viral na década de 80 (CDC, 1998). Recentemente, a OMS publicou diretrizes sobre controle, produção e regulação do plasma humano para fracionamento como matéria-prima de produtos industrializados (OMS, 2007).

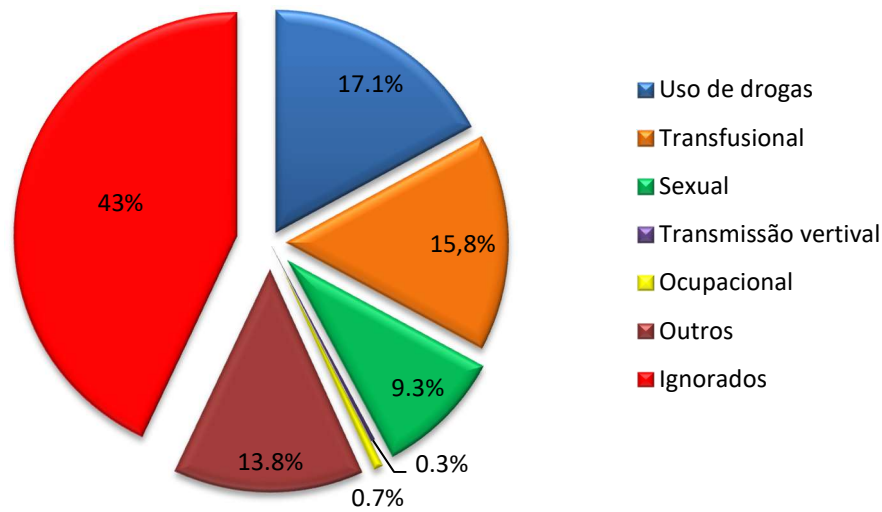
Outra forma de infecção por HCV é por acidente de trabalho entre os profissionais da saúde que varia de 2% a 10%, associando o risco de contágio, o tempo de serviço, realização de procedimentos invasivos e ocorrência de acidentes percutâneos (CIORLIA; ZANETTA, 2007). Os ferimentos com perfuro cortantes são uma das principais fontes de infecção, causando aproximadamente 39% das infecções neste grupo de risco e isso equivale a 16.000 novos casos por ano no mundo (OMS, 2003). No Brasil, a taxa por perfurocortante detectada foi em torno de 0,7% (BRASIL, 2011).

A taxa mundial de transmissão vertical é de 5%, podendo chegar a 20% quando a mãe possui carga viral alta no momento do parto (acima de 10^6 cópias/ml) ou quando há coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (MARTINS; SCHIAVON; SCHIAVON, 2011). Em estudo realizado na cidade de Campo Grande, Mato Grosso, a taxa de transmissão vertical encontrada foi de 13% (GARDENAL et al, 2007). Em Inquérito Epidemiológico Nacional, esta forma de transmissão apresentou um percentual de 0,7% dos casos confirmados no Brasil no período de 1999 a 2010 (BRASIL, 2011). Estudos sobre tipo de parto e aleitamento materno de mães portadoras de HCV como fatores de riscos para transmissão vertical ainda são inconsistentes mas a duração do trabalho de parto com ruptura da bolsa está associado ao risco de transmissão do HCV de mãe para filho (ALTER, 2007).

Após a redução na transmissão do HCV por transfusão de sangue e hemoderivados, o compartilhamento de material contaminado pelos usuários de drogas injetáveis se tornou o maior fator de risco para transmissão desta doença. Em estudo recente, realizado em mais de 150 países do mundo, a prevalência de HCV variou de 60 a 80% neste grupo (NELSON et al, 2011). No Brasil, 17% dos 69.952 casos confirmados, no período de 1999 a 2010 tiveram o uso de drogas como provável fonte de transmissão (Gráfico 3). Na cidade do Rio de Janeiro, foi detectada uma prevalência de 16,8% para anti-HCV entre os usuários de drogas (OLIVEIRA et al, 2005).

A transmissão do HCV pela via sexual ainda não está esclarecida, pois alguns estudos a consideram via de baixa efetividade de infecção. Entretanto, número de parceiros sexuais, tipo de prática sexual e co-infecção com doenças sexualmente transmissíveis podem aumentar a eficiência de transmissão por este tipo de via (CAVALHEIRO, 2007).

Gráfico 3- Provável fonte de transmissão da Hepatite C no Brasil, 1999-2010



Fonte: BRASIL, 2011

1.5 MANIFESTÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE C

Sabe-se que as manifestações clínicas do HCV são bastante variáveis desde formas assintomáticas e anictérica com enzimas normais como alanina amino transferase (ALT) até a hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma. Logo, cerca de 80% dos portadores evoluem lentamente da forma aguda para crônica ao longo de 20 anos.

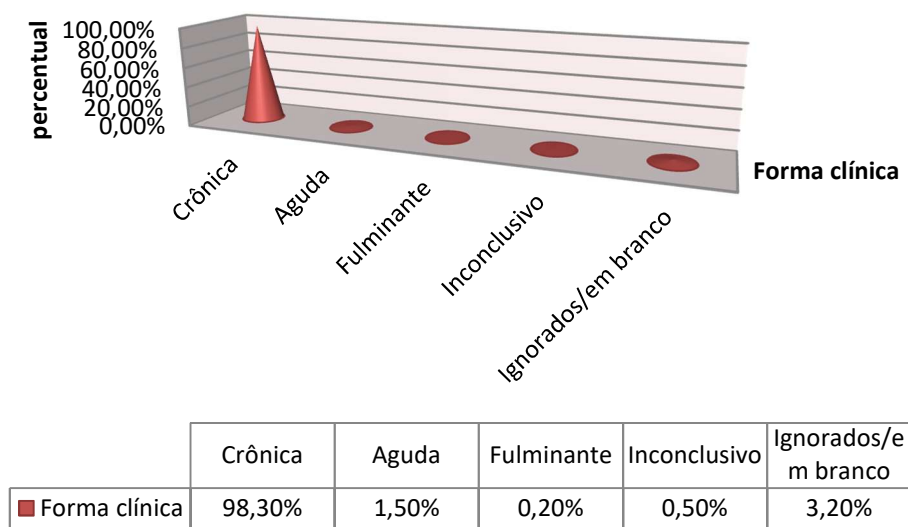
Os sintomas de infecção aguda podem ter início cerca de 6 a 12 semanas após a exposição ao HCV. Aproximadamente 20 a 30% dos casos apresentam icterícia e 10 a 20% apresentam sintomas como náuseas, dor abdominal e mal estar e em apenas 20% dos pacientes sintomáticos, o início dos sintomas precede a soroconversão, a qual raramente ocorre em período superior a 6 meses. Depois de 2 semanas após a exposição, o RNA viral pode ser detectado no soro antes da presença dos anticorpos (ALTER, 1997). O nível do HCV-RNA aumenta rapidamente durante as primeiras semanas, atingindo seus níveis máximos entre 10^5 e 10^7 UI/mL.

Habitualmente, a Hepatite C é diagnosticada em sua fase crônica e como os sintomas são inespecíficos, a doença pode evoluir décadas sem diagnóstico. Nos casos mais graves, ocorre a progressão para cirrose e descompensação hepática. Na ausência de tratamento, 60 a

85% dos casos cronicam, 20% podem evoluir para cirrose em 20 anos e 1 a 5% desenvolvem carcinoma hepatocelular (BRASIL, 2011).

No Brasil, a forma clínica predominante dos casos de Hepatite C confirmados entre 1999 e 2010 é a crônica com 98,3% dos casos e a aguda apresenta uma taxa de 1,5% (BRASIL, 2011) (Gráfico 4).

Gráfico 4- Casos confirmados de HCV segundo forma clínica, 1999 - 2010



fonte: BRASIL, 2011.

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE C

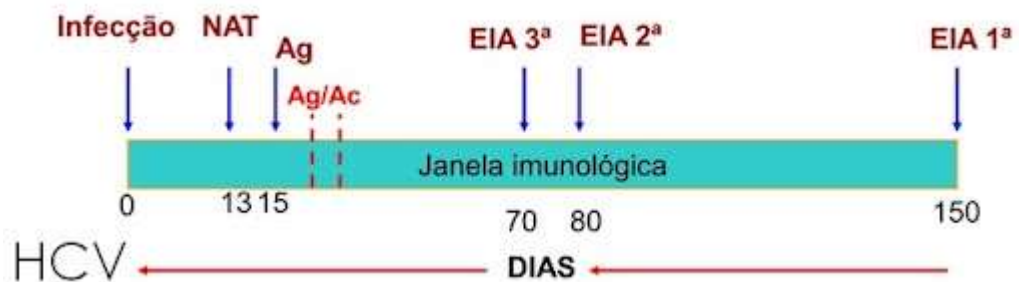
Em 1990, foram disponibilizados os primeiros kits de diagnóstico de triagem e confirmatório para HCV (BRANDÃO, 2001). No Brasil, em 1993, foi promulgada a Portaria Nº1376/93-SVS/MS que tornou obrigatório o teste anti-HCV na triagem sorológica dos doadores de sangue nos Serviços de Hemoterapia. Os testes de triagem para HCV são empregados na identificação da infecção na prática clínica e hemoterápica.

O diagnóstico da Hepatite C é baseado em testes sorológicos e moleculares que são empregados na detecção da infecção e no monitoramento da resposta terapêutica.

Atualmente, são disponibilizados testes de triagem de diferentes metodologias empregados no diagnóstico da infecção pelo HCV. São eles: ensaio imunocromatográfico (teste rápido), ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de aglutinação e ensaio de quimioluminescência e para confirmação da infecção por HCV, é utilizado o ensaio de imunoblot ou western blot.

Com a evolução tecnológica, antígenos de diferentes regiões do genoma viral foram impregnados nos suportes de ensaios, objetivando a melhoria da sensibilidade e especificidade dos kits de diagnóstico de uso *in vitro* e redução da janela imunológica. Esta passou de 150 para 30 dias, quando comparados os primeiros testes disponibilizados e os testes combinados, respectivamente (POZZOBON; BECK; CECCIM, 2011) (Figura 5).

Figura 5 – Janela imunológica do vírus da hepatite C (HCV) com os marcadores utilizados



fonte: site da Biomedicina

No mercado brasileiro, existem os testes para detecção de anticorpos anti-HCV, que utilizam proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos e os testes combinados que detectam anticorpos e antígenos virais circulantes, os quais só aparecem na fase aguda da infecção.

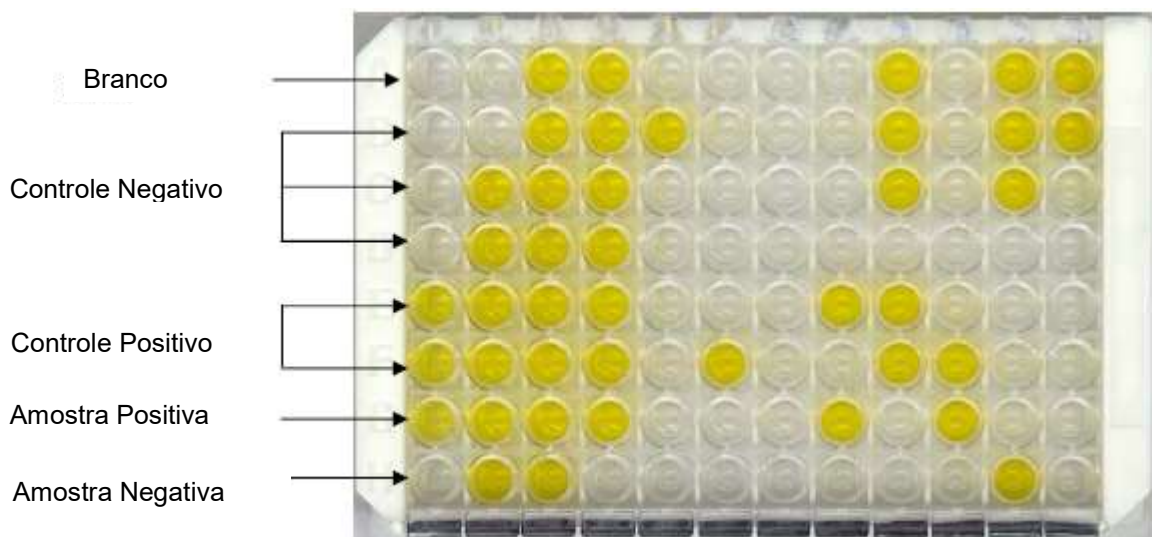
Atualmente, é obrigatório a realização de um teste de pesquisa de anticorpo anti-HCV ou anticorpo/antígeno nas amostras dos doadores para liberação de bolsa de sangue e hemocomponentes nos Serviços de Hemoterapia Brasileiros, conforme preconizado na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 57 de 16 de dezembro de 2010.

1.6.1 Testes de triagem

1.6.1.1 *Ensaio Imunoenzimático (ELISA)*

O enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) é a metodologia mais empregada para detecção de antígenos e/ou anticorpos anti-HCV por apresentar vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade, custo relativamente baixo e seu formato é o mais apropriado para a triagem de um grande número de amostras clínicas ou de doadores (Figura 6). Esta técnica emprega antígenos e/ou anticorpos ligados à fase sólida, que podem ser detectados por um antígeno ou anticorpo complementar marcado com uma enzima, capaz de reagir com um substrato cromogênico. A presença de antígenos ou anticorpos pode ser detectada pelo desenvolvimento de um produto final colorido, cuja intensidade é medida por leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda indicado pelo fabricante. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à presença de antígenos/anticorpos na amostra (BORDIN; JÚNIOR; COVAS, 2007).

Figura 6 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)



Fonte: LSH.

1.6.1.2 *Ensaio de Quimioluminescência*

O ensaio de quimioluminescência (CLIA) se baseia no mesmo princípio metodológico do ELISA, entretanto a reação é evidenciada pela ação de um reagente capaz de emitir fluorescência. A reação quimioluminescente final é medida por equipamento específico e o resultado é expresso em unidades relativas de luz (RLU) que são diretamente proporcionais a quantidade de anticorpos anti-HCV presentes nas amostras de soro ou plasma. O teste automatizado por quimioluminescência vem substituindo o ELISA por sua praticidade e sensibilidade e especificidade similares ao mesmo, sendo utilizado principalmente em laboratórios com grandes rotinas (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

1.6.1.3 *Ensaio Imunocromatográfico (teste rápido)*

Além dos testes sorológicos convencionais empregados no diagnóstico da infecção pelo HCV, foram desenvolvidos os chamados “Testes Rápidos”, cuja reação é evidenciada em cerca de trinta (30) minutos. Os testes imunocromatográficos empregam geralmente membranas pré cobertas com antígenos virais. Os anticorpos anti-HCV, quando presentes nas amostras de soro, plasma ou sangue total humanos, se ligam ao conjugado ouro coloidal e migram pela membrana. A formação do complexo anticorpo-antígeno determina o aparecimento de uma banda colorida na área teste. São de simples execução e possuem sensibilidade comparável aos testes ELISA (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Testes rápidos e simples possuem um sistema fácil de leitura visual, o que dispensa o uso de equipamento laboratorial, facilitando sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos e em laboratórios de pequeno porte (Figura 7).

Figura 7 - Teste rápido

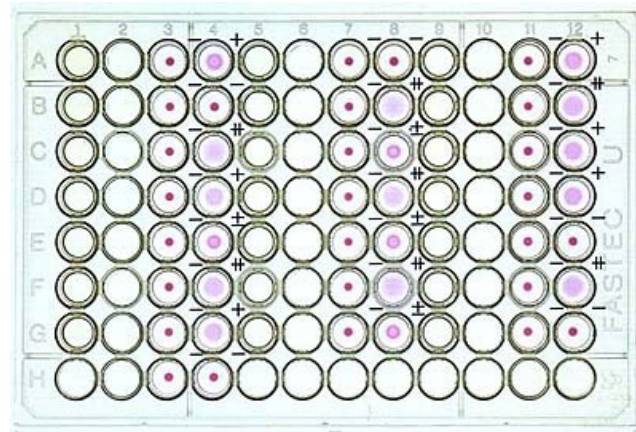


Fonte: <http://portuguese.alibaba.com/product-free/hcg-lh-hiv-hbsag-hcv-test-kit-104905270.html>

1.6.1.4 *Ensaio de aglutinação*

Dentro do contexto de metodologias aplicáveis a triagem sorológica, está o ensaio de aglutinação, considerado um teste simples por não necessitar de equipamento para sua leitura (FERREIRA; ÁVILA,2001). O teste é baseado na aglutinação de partículas de gelatina sensibilizadas com antígenos do HCV. Essas partículas se aglutinam na presença de anticorpos anti-HCV em amostras de soro ou plasma (Figura 8).

Figura 8 – Ensaio de Aglutinação



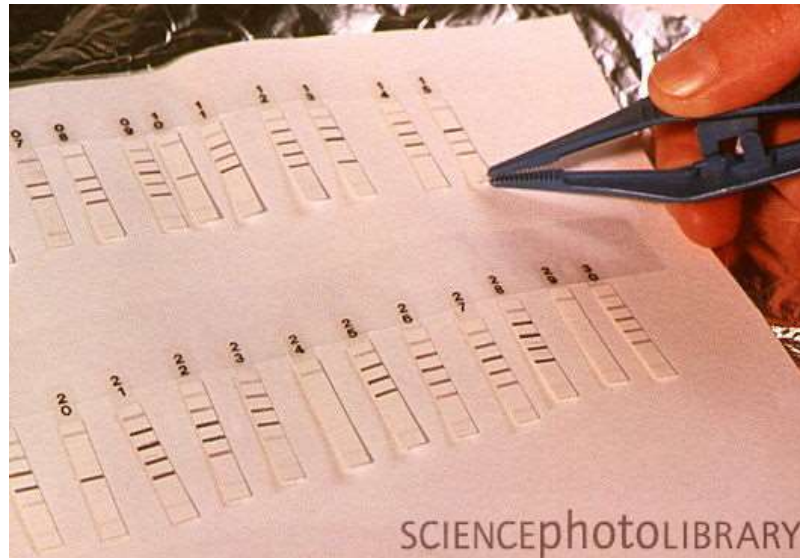
Fonte: LSH

1.6.2 Teste Confirmatório

1.6.2.1 *Ensaio de Immunoblot*

O immunoblot consiste em um ensaio imunoenzimático utilizado como um valioso recurso na caracterização de frações antigênicas imunodominantes como bandas individuais em tiras. A detecção de anticorpos anti-HCV por immunoblot é baseada nas técnicas tradicionais de “western blot”, nas quais poliproteínas antigênicas codificadas pelo genoma do HCV são imobilizadas sobre um suporte de membrana. A visualização da reatividade dos anticorpos anti-HCV nas amostras com as proteínas individuais codificadas do HCV das tiras segue o mesmo princípio do ELISA (FERREIRA; ÁVILA, 2001). O teste confirmatório é indicado para avaliar, com maior especificidade, amostras que se apresentam repetidamente reativas ou indeterminadas nos testes de triagem (Figura 9).

Figura 9- Fitas de nitrocelulose para Immunoblot



Fonte: site da sciencephotolibrary

1.6.3 Testes Moleculares

Os testes de ácido nucleico (NAT) são capazes de detectar o RNA do HCV, quantificar a carga viral e indicar o genótipo do vírus em amostras de soro/plasma humanos. Essa metodologia é considerada padrão ouro para o diagnóstico da infecção por Hepatite C. O método utiliza sondas de ácidos nucleicos que são fragmentos de DNA ou RNA com estrutura complementar a uma sequência do ácido nucleico a ser detectado. Esse é amplificado por PCR (polymerase chain reaction-reação em cadeia da polimerase), hibridização (b-DNA) ou sequenciamento TMA (transcription mediated amplification-amplificação mediada pela transcrição).

Os testes qualitativos apenas indicam a presença ou ausência do RNA viral. São indicados para: confirmar o diagnóstico de hepatite C; detectar viremia por HCV antes da soroconversão em casos de infecções agudas e em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos; caracterizar transmissão vertical e ocupacional e monitorar a resposta terapêutica (ZEIN, 2000).

Os testes quantitativos refletem as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro. As principais indicações são a definição do tempo de tratamento e o monitoramento da resposta virológica frente a medicação (BRANDÃO, 2001).

A determinação do genótipo em amostras de soro/plasma de pacientes é realizada por testes moleculares ou sorológicos. Os testes moleculares utilizam a técnica de PCR, possibilitando a identificação do subtipo viral. Os testes sorológicos se baseiam na detecção de anticorpos genótipo-específicos por ELISA ou por Immunoblot com as vantagens do baixo custo e maior facilidade de realização. A caracterização genotípica complementa a avaliação clínico-laboratorial na definição da estratégia de tratamento da Hepatite C.

1.6.4 Características dos Testes Sorológicos

Os testes que detectam antígenos e anticorpos do HCV devem possuir alta sensibilidade (100%) e especificidade ($>$ ou $=$ a 99%) a fim de impedir a ocorrência resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Resultados falso-negativos acarretam risco sanitário, constituindo agravo à saúde e resultados falso-positivos expressam prejuízo social ao paciente e ao doador .

A sensibilidade diagnóstica é avaliada pela incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em questão. A especificidade diagnóstica é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente não reagentes para a doença em questão (FERREIRA; ÁVILA, 2001) . Em resumo, a segurança e confiabilidade dos testes para diagnóstico sorológico do HCV dependem, entre outros parâmetros, da sua sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2006).

O monitoramento efetivo dos conjuntos para diagnóstico de uso “in vitro” para a detecção do HCV se encontra regulamentado por força de legislação sanitária, tornando obrigatória a avaliação da qualidade antes dos mesmos serem disponibilizados no mercado (BRASIL, 1976, 2006).

A diversidade dos kits empregados na triagem e confirmação sorológica do HCV e a variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade justificam a importância do controle da qualidade desses produtos.

Um dos alicerces em que o trabalho do Laboratório de Sangue e Hemoderivados do Instituto Nacional de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz

(LSH/INCQS/FIOCRUZ) se baseia é, justamente, o de assegurar a qualidade de kits diagnóstico de uso *in vitro* para a triagem sorológica do HCV e de outras patologias previamente à sua colocação no mercado e/ou comprovar a conformidade dos mesmos durante a comercialização.

Neste contexto, o INCQS vem analisando sistematicamente a sensibilidade e especificidade dos conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* através de análises prévia, fiscal e controle, em atendimento a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério Saúde. Para averiguar a qualidade dos mesmos, são empregados painéis sorológicos com amostras verdadeiramente positivas e negativas para HCV e a confecção de painéis é o objeto deste trabalho.

2 OBJETIVO GERAL

Compor painel sorológico positivo anti-HCV a ser utilizado na avaliação dos Kits de Diagnóstico de uso *in vitro*, empregados na triagem e/ou confirmação diagnóstica da infecção pelo HCV.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar unidades de plasmas para diferentes marcadores (HIV; HTLV; Sífilis; Doença de Chagas; HCV; HBC e HBsAg);
- ✓ Confirmar sorologia das amostras reagentes para HCV após caracterização;
- ✓ Implantar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH) do Departamento de Imunologia do INCQS no controle da qualidade dos conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* para detecção de anticorpos/antígenos em suas diferentes metodologias.

3 METODOLOGIA

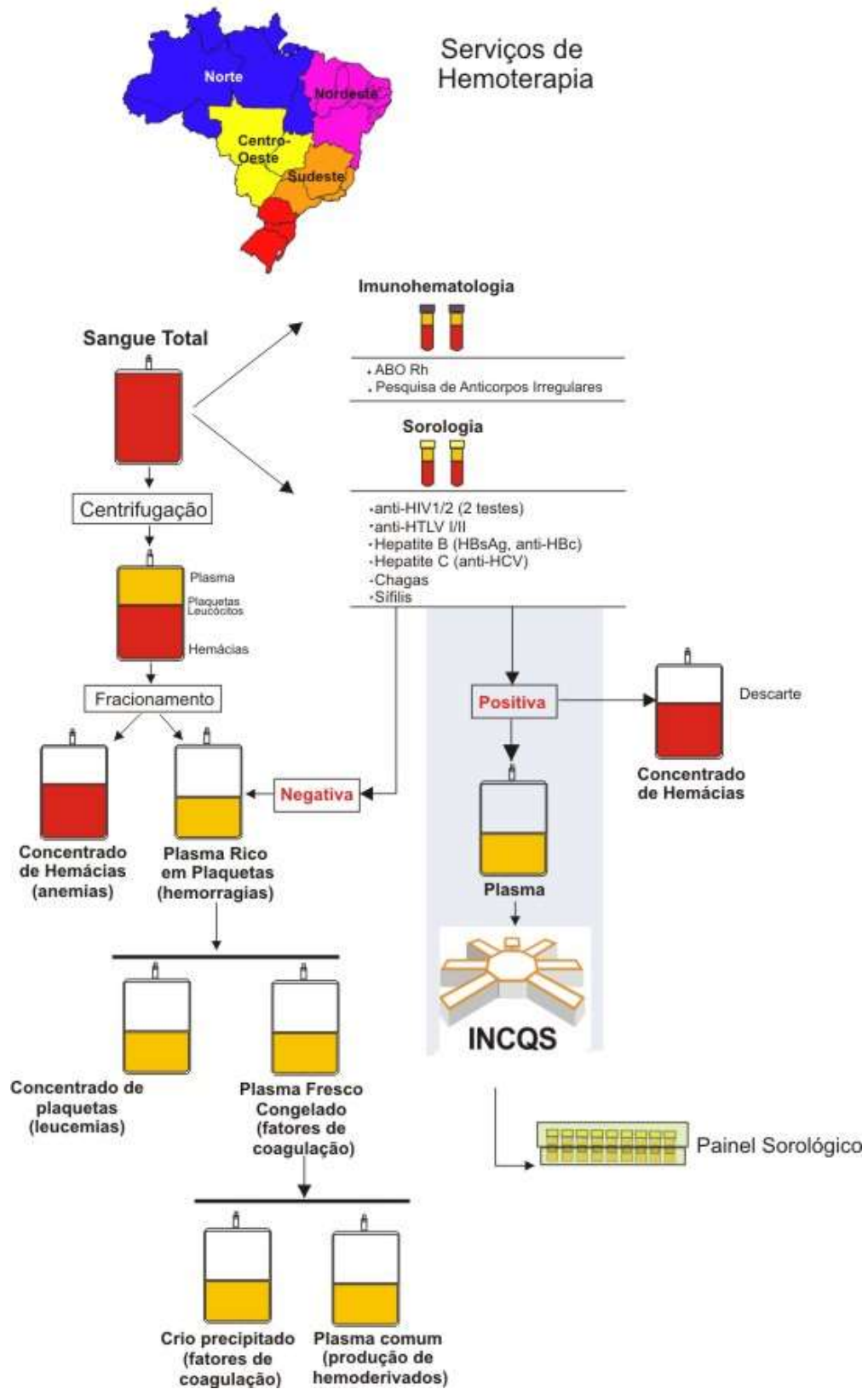
3.1 AS UNIDADES DE PLASMA

No período de 1996 a 2000, 1758 unidades de plasma foram encaminhadas ao LSH para confecção de painéis sorológicos positivos para diferentes patologias (HIV, HTLV, Hepatite B (anti-HBc e HBsAg) e Hepatite C, Chagas e Sífilis), provenientes de Serviços de Hemoterapia das regiões Nordeste e Sudeste do país.

Através de solicitação formal, os Serviços de Hemoterapia foram contactados para envio de unidades de plasma que seriam descartadas por resultados reagentes para um ou mais marcadores na triagem sorológica dos doadores conforme preconizado pela Portaria Nº 1376/93-SVS/MS naquela época. Estas unidades, consideradas impróprias para o uso terapêutico, foram obtidas a partir do fracionamento do sangue total de doadores, colhido com anticoagulante CPDA – 1. (Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina) (Figura 10).

Atualmente, o LSH possui 5226 unidades de plasmas cadastradas provenientes de todas as regiões brasileiras.

Figura 10 - Obtenção das unidades de plasma.



Fonte: LSH

3.2 RECEBIMENTO, CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA

As unidades de plasma foram encaminhadas congeladas ao LSH/INCQS, acondicionadas em caixas térmicas, acompanhadas de documentação pertinente, constando: nome da instituição, data da coleta, iniciais do doador, volume aproximado de plasma e resultados da sorologia, quando aplicável. No ato do recebimento, as unidades foram cadastradas em caderno ata de acordo com o preconizado no POP número 65.3420.013 do LSH/INCQS.

Finalizado o cadastro, as unidades receberam identificação alfanumérica própria do LSH (Figura 11) e foram ainda analisadas quanto a integridade física, volume e identificação da reatividade.

Figura 11 - Modelo de Cadastro no LSH das Unidades de Plasma



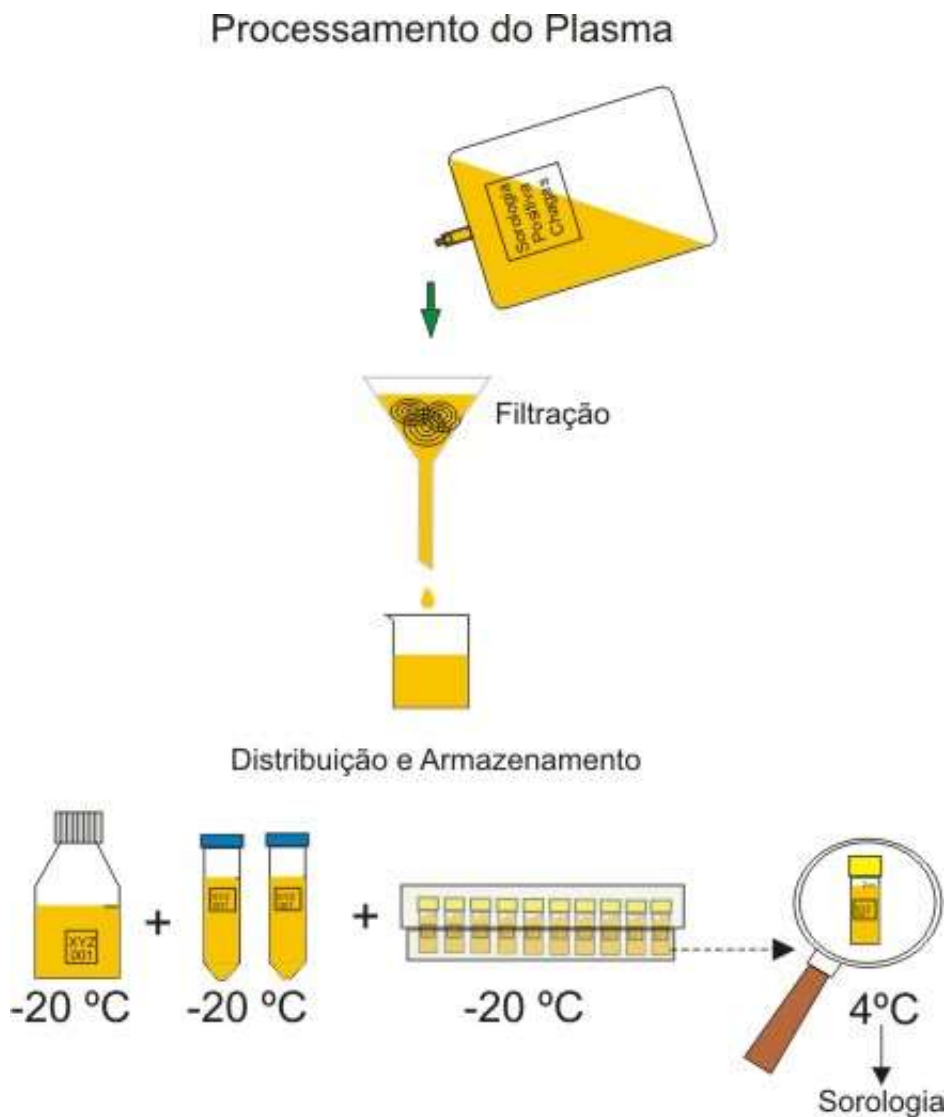
Fonte : LSH

3.3 PROCESSAMENTO DAS UNIDADES DE PLASMA

Somente as unidades de plasma com volume aproximado ou superior a 200 ml foram selecionadas para processamento. As unidades foram descongeladas a temperatura ambiente e seu conteúdo filtrado, individualmente, em gaze hidrófila (09 fios/cm², 5 dobras – 8 camadas) para redução de fibrina. As unidades de plasma fracionadas não receberam nenhum tipo de solução conservante ou passaram por processo de recalcificação. Após filtração, as unidades foram distribuídas e estocadas da seguinte forma:

- aproximadamente 100 ml em garrafas Nalgene™ com capacidade para 250 ml, estocadas a temperatura igual ou inferior a -20°C ;
- 40 ml em dois tubos Falcon™ com capacidade para 50 ml cada, estocados a temperatura igual ou inferior -20°C e;
- 20 ml distribuídos em 10 criotubos com volume aproximado de 2,0 ml cada. Um total de 9 criotubos foram estocados a temperatura igual ou inferior a -20°C e 1 criotubo estocado a 4°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Este utilizado para realização dos testes sorológicos para caracterização da amostra no LSH (Figura 12).

Figura 12 - Processamento das Unidades de Plasma



3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA

Além do algoritmo preconizado na testagem obrigatória realizada pelos Serviços de Hemoterapia, conforme determinado pela Portaria N° 1376/93-SVS/MS, legislação vigente no período estudado, foi adotado o procedimento de realizar testes adicionais para caracterização de todas as unidades de plasma encaminhadas, utilizando diferentes metodologias e conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado nacional, conforme descrito abaixo:

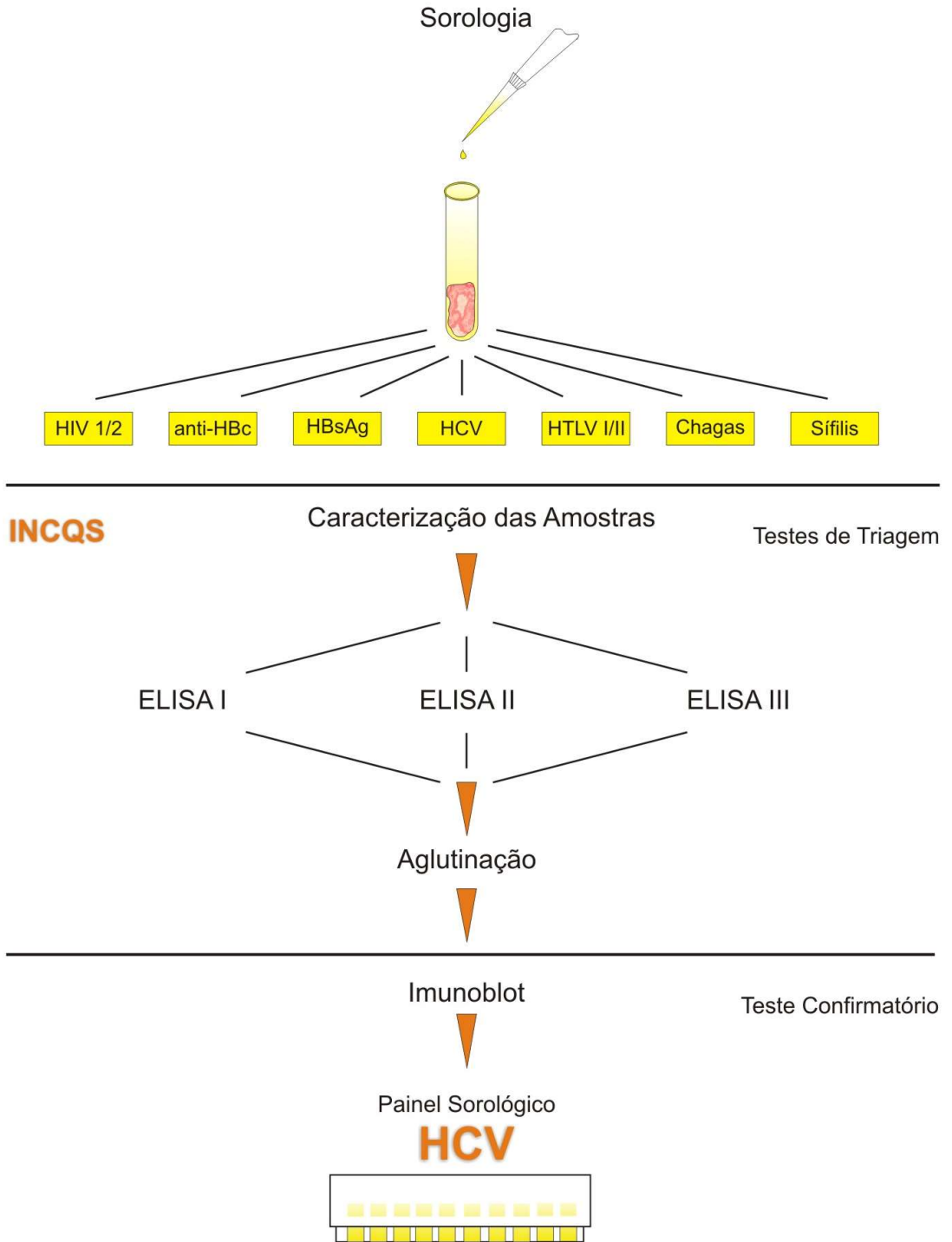
- ✓ 01(um) ensaio por ELISA para: Hepatite B (HBsAg, anti-HBc), HTLV/II, Doença de Chagas, HIV/II e Sífilis;
- ✓ 03(três) ensaios distintos por ELISA para HCV;
- ✓ 01(um) ensaio por aglutinação para HCV;
- ✓ 01(um) ensaio confirmatório por Westernblot/Immunoblot para HCV;

Os testes realizados seguiram rigorosamente as instruções de uso dos fabricantes. Todos os conjuntos diagnósticos utilizados possuíam registro na ANVISA/MS e foram acondicionados de acordo com a temperatura recomendada pelo fabricante.

O algoritmo preconizado para caracterização das unidades de plasma nas suas diferentes etapas de triagem e confirmação sorológica realizadas no LSH está representado na Figura 13.

Figura 13- Algoritmo utilizado para caracterização das Unidades de Plasma no LSH.

Unidade Hemoterápica



As unidades de plasma reativas para anti-HCV no ensaio imunoenzimático utilizado na etapa de caracterização (ELISA I) foram avaliadas frente a dois outros ensaios imunoenzimáticos (ELISAs II e III), empregando diferentes antígenos (Quadro 1). Com objetivo de compor um painel sorológico positivo anti-HCV com amostras caracterizadas em todas as metodologias disponíveis no ano de 2000, foram realizados ainda: 01 (um) ensaio de aglutinação de partículas e 01 (um) ensaio confirmatório – Imunoblot (figura 14).

Quadro 1- Conjuntos de diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica do HCV

Metodologia	Sensibilização (antígeno)
ELISA I	Proteínas recombinantes (NS3 e NS5) e peptídeos sintéticos (core e NS4)
ELISA II	Antígenicos recombinantes (core, NS3 e NS5) derivados de levedura
ELISA III	Três antígenos recombinantes purificados do HCV
Aglutinação	Partículas de gelatina sensibilizadas com antígenos do HCV
Imunoblot	Antígenos recombinantes das regiões core, NS3, NS4 e NS5

Figura 14 - Fluxo de testagem das amostras para composição do painel

ELISA I → ELISA II → ELISA III → Aglutinação → Imunoblot

Fonte: LSH

3.5 INTERPRETAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL

3.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Conforme o procedimento adotado no LSH, a interpretação dos testes ELISAs (I, II, III), empregados na caracterização das unidades de plasma para as diferentes patologias, foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelos fabricantes para validação do ensaio e cálculo do ponto de corte (cut-off).

Para padronização de resultados obtidos nos diferentes ensaios imunoenzimáticos, a reatividade foi determinada pela razão dos valores de densidade ótica (D.O.) entre os plasmas avaliados e o “cut-off” (ponto de corte), denominada de Racio.

$$\frac{\text{D.O do plasma teste}}{\text{“ Cut-off ” (ponto de corte)}} = \text{Racio}$$

As amostras de plasma que apresentaram valores de racio superiores ou iguais a 1,0 foram consideradas positivas e valores inferiores, negativas.

3.5.2 Ensaio de Aglutinação em Partículas

As amostras de plasma reativas para HCV nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA I, II e III) foram submetidas ao ensaio de aglutinação para uma melhor caracterização. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o critério estabelecido no manual de instrução do Kit de diagnóstico empregado (Quadro 2).

Quadro 2 – Interpretação do resultado por ensaio de aglutinação

Padrão das Partículas	Interpretação
Botão redondo e liso no centro do poço	Negativo
Partículas aglutinadas espalhadas, cobrindo o fundo do poço	Positivo
Outro perfil	Indeterminado

3.5.3 Ensaio Confirmatório (Immunoblot)

O ensaio de immunoblot foi utilizado na confirmação dos resultados obtidos nos testes de triagem (ELISA e aglutinação). A interpretação das bandas detectadas neste tipo de ensaio foi realizada conforme orientação do manual de instrução do conjunto diagnóstico empregado (Quadro 3).

Quadro 3 – Interpretação do resultado por ensaio de immunoblot

Padrão da tira	Interpretação
Ausência de banda de HCV	Negativa
Pelo menos duas bandas de HCV > controle positivo fraco	Positiva
Outro perfil	Indeterminado

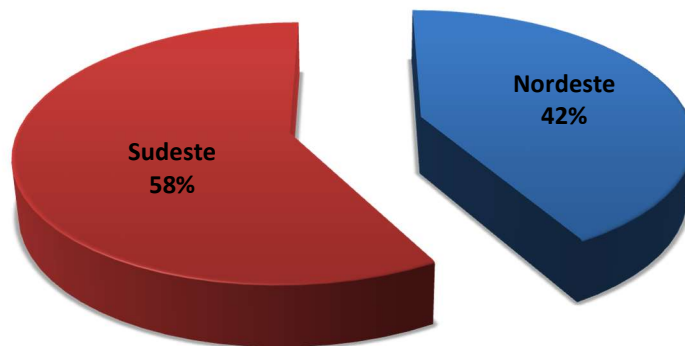
4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS

4.1.1 Distribuição quanto à procedência das unidades de plasma

Das 1758 unidades de plasma recebidas pelo LSH no período estudado (1996 a 2000), 735 (42%) unidades foram oriundas da região Nordeste e 1023 (58%) da região Sudeste do país (Gráfico 5).

Gráfico 5- Distribuição das unidades de plasma por região brasileira



Fonte: LSH

4.1.2 Integridade física e volume das unidades de plasma recebidas

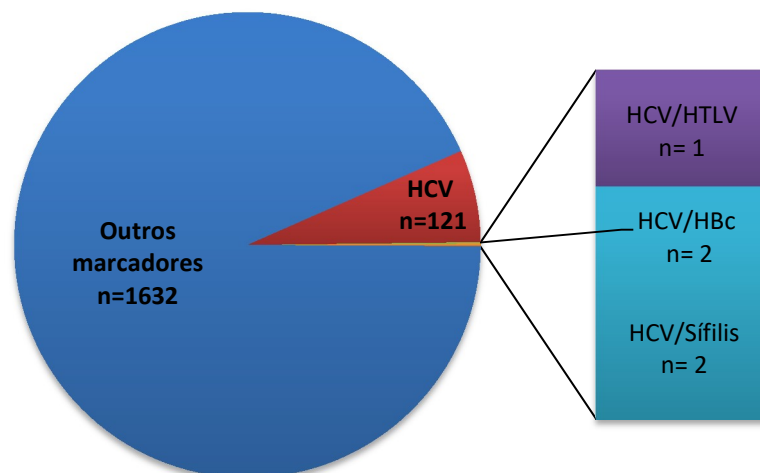
As unidades de plasma foram avaliadas quanto à sua integridade física e volume. Não houve danos ou perdas significativas de volume do plasma após descongelamento das

mesmas. Portanto, 100% (n=1758) das unidades de plasma foram distribuídas em alíquotas e seguiram para processamento e caracterização.

4.1.3 Identificação da reatividade na rotulagem: registro de sorologia positiva

Um total de 126 (7,2%) das 1758 unidades de plasma encaminhadas foi identificado pelos Serviços de Hemoterapia como sorologia reagente para HCV ou HCV associado a outros marcadores. As 1632 restantes (92,8%) foram encaminhadas com sorologia reagente para os seguintes marcadores: HIV, HBsAg, HBc, HTLV, Chagas e Sífilis ou não apresentavam identificação da sorologia reagente em suas rotulagens (Gráfico 6). Das 126 unidades rotuladas, 121 (96,0%) eram reagentes somente HCV, 02 (1,6%) para HCV/HBc, 02 (1,6%) para HCV/Sífilis e 01 (0,8%) para HCV/HTLV.

Gráfico 06 – Distribuição do registro da sorologia nas unidades de plasma



Fonte: LSH.

4.1.4 Resultados dos testes sorológicos realizados

Após ensaios realizados pelo LSH, apenas 39 (30,95%) das 126 unidades de plasma rotuladas como reagentes para HCV foram confirmadas frente aos resultados sorológicos obtidos na caracterização. Portanto, 87 (69,05%) unidades de plasma cadastradas como reagentes para HCV não tiveram a sorologia positiva confirmada de acordo com a rotulagem.

Além disso, todas as 1758 unidades foram testadas no LSH para os seguintes marcadores: HIV, HTLV, HBsAg, HBc, HCV, Doença de Chagas e Sífilis. A partir da caracterização inicial, 64 das 1758 unidades de plasma apresentaram resultado reagente nos 03(três) ensaios de ELISA (I, II e III) realizados para pesquisa de anticorpos anti-HCV, representando 3,64% do total de unidades caracterizadas. Os valores de rácio das unidades encontrados nos ensaios (ELISA I, II e III) foram de 7,05, 3,79 e 7,73, respectivamente. O perfil apresentado demonstrou que as unidades analisadas são de média a alta reatividade.

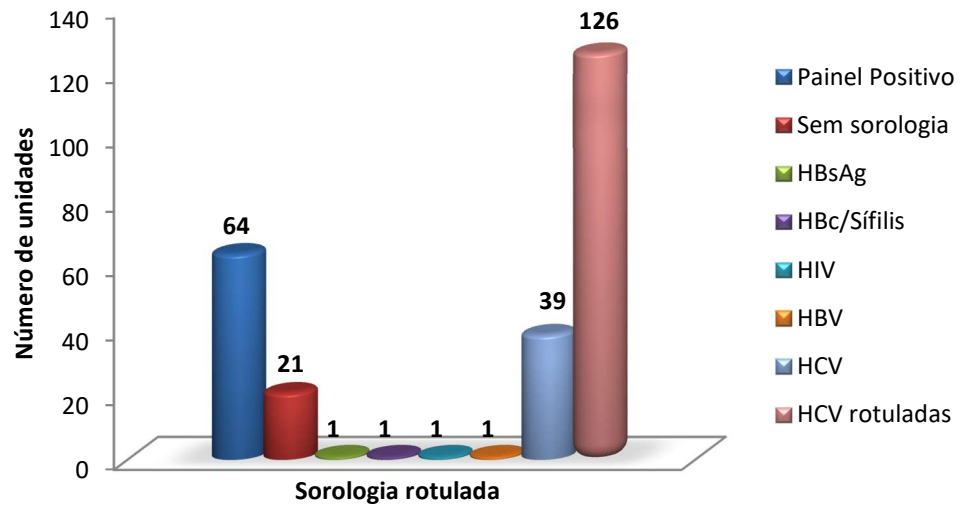
Desta forma, seguiram para melhor caracterização, confirmação e seleção para composição do painel 64 amostras que foram submetidas a ensaio por aglutinação e confirmação pela técnica de Imunoblot.

Todas as 64 (100%) unidades foram reagentes nos testes de aglutinação e a reatividade foi confirmada em 63 (98,44%) das 64 amostras analisadas para presença de bandas específicas de acordo com os critérios de positividade determinados pelo fabricante do conjunto diagnóstico utilizado. Uma amostra (1,56%) apresentou resultado indeterminado mas foi incluída por ter um perfil de soroconversão. Logo, 64 unidades de plasma foram selecionadas para compor o painel sorológico positivo anti-HCV.

4.1.5 Resultados sorológicos obtidos x Rotulagem

Da análise referente aos dados de cadastros das 64 unidades de plasma selecionadas para composição do painel positivo para HCV, 21 (32,81%) unidades não apresentavam a reatividade pela qual foram excluídas na rotulagem, 01 (1,56%) unidade estava rotulada para HBsAg, 01 (1,56%) unidade para HBc/Sífilis, 01 (1,56%) unidade para HIV, 01 (1,56%) unidade para HBc e 39 (60,95%) para HCV (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Identificação na Rotulagem das Unidades de Plasma Recebidas



Fonte: LSH

5 DISCUSSÃO

A pesquisa de anticorpos anti-HCV em amostras de doadores de sangue passou a ser obrigatória em 1993 através da Portaria Nº 1376/93-SVS/MS. Apesar das mudanças ocorridas na legislação sanitária pertinente a triagem sorológica do doador, permanece a obrigatoriedade na realização de 01(um) teste para detecção de anti-HCV na triagem do doador com emprego de testes de alta sensibilidade e especificidade (BRASIL, 1993, 2002, 2004, 2010).

A possibilidade de um resultado falso negativo, tanto em laboratórios clínicos quanto em Serviços de Hemoterapia, representa um sério risco sanitário e um resultado falso positivo pode implicar em problemas pessoais e sociais.

Quando analisados o número de conjuntos disponibilizados anualmente no mercado nacional e a importância da manutenção da qualidade dos mesmos, se torna necessária a manutenção efetiva do controle da qualidade destes produtos antes de sua liberação para o mercado nacional (BRASIL, 1976).

Diante da demanda gerada pela Gerência de Produtos para Diagnóstico "in vitro" da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (GEVIT/ANVISA/MS) e Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), entre outros, no contexto das análises prévias, fiscais e de controle, conforme preconizado na Lei nº 6360/76, surgiu a necessidade de implantar um painel sorológico positivo anti-HCV. Logo, unidades de plasma reativas para diferentes marcadores sorológicos foram encaminhadas ao LSH através de solicitações para Serviços de Hemoterapia de diferentes regiões do país no período de 1996 a 2000. Somente as regiões Nordeste e Sudeste atenderam a solicitação de envio de unidades de plasma no período em estudo. Algumas unidades de plasma enviadas não identificavam, na rotulagem, a sorologia para qual foram reativas. Tal fato, não constitui não conformidade do Serviço de Hemoterapia frente à legislação sanitária, uma vez que em seus registros internos consta o real motivo de descarte destas unidades. Atualmente, grande parte dos Serviços de Hemoterapia no Brasil dispõe de sistema informatizado que disponibiliza etiquetas para identificação da reatividade da unidade de plasma que levou ao bloqueio e conseqüente motivo do descarte. (BRASIL, 2004).

As 1758 unidades cadastradas no período estudado foram processadas e caracterizadas para os seguintes marcadores: HIV, HTLV, HBsAg, HBc, HCV, Sífilis e Doença de Chagas.

Das 126 unidades de plasma caracterizadas na sua origem como reagentes para HCV, apenas 39 unidades (30,95%) foram unidades verdadeiramente positivas para pesquisa de

anticorpos anti-HCV e destas, 01 unidade confirmou coinfeção para HTLV. Como a associação de dois ou mais marcadores em uma única amostra não acarreta interferência na exatidão, precisão, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade dos Conjuntos de Kits de Diagnósticos de uso *in vitro*, esta foi incluída no painel positivo anti-HCV já que o resultado para HTLV foi indeterminado na técnica de westernblot.

Além dessas, após a caracterização realizada no LSH, foi constatado que 25 das 1632 unidades de plasma, não rotuladas para HCV, foram reagentes nos testes para pesquisa de anticorpos anti-HCV. Dessas, 21 unidades não apresentavam resultado do marcador sorológico reagente em suas rotulagens e 04 unidades estavam rotuladas como reagentes para HBsAg, HIV, HBc e HBc/Sífilis. Esse fato não indica erro na triagem sorológica do doador realizada pelo Serviço de Hemoterapia de origem uma vez que, diante de um resultado repetidamente reagente/inconclusivo para um dos marcadores a serem testados nas amostras dos doadores, não é necessário seguir com o algoritmo de testagem. Outro fato a ser considerado é que os Serviços Hemoterápicos trabalham com uma margem de segurança de 10 a 20% do valor do cut-off nos ensaios imunoenzimáticos e não lhes compete confirmar os resultados obtidos na triagem do doador (BRASIL, 1993). Portanto, é possível que sejam recebidas unidades de plasma rotuladas como reagentes para algum marcador e que seus resultados não sejam confirmados na caracterização realizada pelo LSH.

Logo, 64 unidades de plasma verdadeiramente positivas para anti-HCV foram selecionadas para compor o painel anti-HCV, com valores de raios de média a alta reatividade nos três ensaios imunoenzimáticos (ELISA) realizados. Assim, foram submetidas a ensaio de aglutinação, apresentando resultados concordantes com os ELISAs, os quais foram confirmados pela de técnica de imunoblot, exceto por 01 unidade que foi considerada indeterminada mas foi mantida na constituição do painel já que indica a possibilidade de soroconversão. Portanto, as 64 unidades selecionadas para o painel anti-HCV apresentaram resultados padronizados, lineares e reprodutíveis frente a diferentes metodologias, sensibilização e fabricantes dos Conjuntos Diagnósticos para pesquisa de anticorpos anti-HCV.

Por se tratar de material esgotável, a inserção de unidades de plasma no painel é realizada de forma randômica, uma vez que não é preconizado um número máximo de unidades de plasma para composição do painel na literatura. As unidades de plasma são recebidas, caracterizadas e adicionadas ao painel a medida que atendem as especificações para composição do mesmo, contribuindo para melhoria contínua da capacidade analítica do LSH.

6 CONCLUSÃO

No período de 1996 a 2000, 1758 unidades de plasma, consideradas impróprias para uso terapêutico, foram enviadas pelas Unidades Hemoterápicas das regiões Nordeste e Sudeste do país para o Laboratório de Sangue e Hemoderivados – INCQS/FIOCRUZ. Após a caracterização sorológica realizada pelo LSH, 64 unidades de plasma foram selecionadas para compor o painel positivo anti-HCV a ser empregado na implantação e melhoria da capacidade analítica do Laboratório (LSH) no controle da qualidade de conjuntos diagnósticos de uso *in vitro* para pesquisa de anticorpos/antígenos do HCV para atender a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/MS. A análise da sensibilidade e especificidade dos conjuntos diagnósticos de uso *in vitro* para HCV é de suma importância para saúde pública uma vez que esses são utilizados no diagnóstico da infecção por HCV em laboratórios clínicos e na triagem sorológica dos doadores de sangue em Serviços Hemoterápicos.

REFERÊNCIAS

- ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.17, p.2436-2441, 2007. Disponível em:< <http://www.wjgnet.com>. Acesso em: fev.2012.
- ALTER, M.J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **Clin. Liver Dis.**, v.1, n.3, p. 559-569, 1997. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089326105703214>. Acesso em: fev.2012
- BARTENSCHAGER, J.; LOHMANN, V. Replication of Hepatitis C Virus. **Journal of General Virology**, v.81, p. 1631-1648, 2000.
- BORDIN, J.O; JÚNIOR, D.M.L.; COVAS, D.T. **Hemoterapia: Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.
- BRADLEY, D.W.; MC CAUSTLAND, K.A.; COOK, E.H. Pos-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: psystcochemical evidence that the tubule forming agent is a smoli, enveloped virus. **Gastroenterology**, v. 88, p. 773-779, 1985.
- BRANDÃO, A.B.M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.9, n.3, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais**. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas `para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília, 2011.
- BRASIL.Ministério da Saúde .PORTARIA nº1376 de 03 de novembro de 1993. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 02 dez.1993. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.
- BRASIL.Ministério da Saúde .Resolução RDC nº 153 de 14 de junho de 2004. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.
- BRASIL.Ministério da Saúde .Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 17 dez.2010. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.

BRASIL.Ministério da Saúde .Resolução RDC nº 206 de 17 de novembro de 2006. . **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 20 nov.2006. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.

BRASIL.Ministério da Saúde .Resolução RDC nº 343, de 13 de dezembro de 2002. . **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 17 jan.2003. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.

BRASIL.Ministério da Saúde.PORTARIA nº 08 de 23 de janeiro de 1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 13 mai.1996. Seção 1 ,p. 8.202. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.

BRASIL.Ministério da Saúde.PORTARIA nº 6360 de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 24 set.1976. Seção 1 ,p. 12647. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan.2012.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis c virus genotypes in Brazil. **Braz. J. Med. Res.**, v. 38, p. 1, p. 41-49, jan, 2005.

CAVALHEIRO, N.P. A transmissão sexual da hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, São Paulo, v.49, n.5, p. 271-277, out.2007. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003646652007000500001&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: fev.2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Viral Hepatitis |Surveillance**. United States, 2009. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/hepatitis/Statistics/2009Surveillance/Commentary.htm#analysesA>>. Acesso em : jan.2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Recomendações para a Prevenção e Controle do Vírus da Hepatite C (HCV) e HCV relacionado a Doença Crônica**. 1998. 39p

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.M. Hepatitis C Virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World Journal Gastroentology**, v. 13, n.17, p.2461-2466, maio, 2007.

CHOO Q.L, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, 1989.

CHUAN-MO Lee, M.D et al. Hepatitis C Virus Genotypes: Clinical Relevance and Therapeutic Implications. **Chang Gung Med. Journal**, v.31, n.1, p.16-24, fev, 2008.

CIORLIA, L.A.S; ZANETTA, D.M.T. Hepatite C em profissionais da saúde:prevalência e associação com fatores de risco. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n.2, abr. 2007. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102007000200009>>. Acesso em: fev.2012.

DONAHUE, J.G. et al. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**. v 327, p.369-373, 1992. Disponível em:< <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199208063270601#t=articleTop>>. Acersso em: jan.2012.

DUBUISSON, J. Hepatitis C Virus proteins. **World Journal Gastroentology**, v. 13, n.17, p.2406-2415, maio, 2007. Disponível em: < <http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2406.asp>>. Acesso em : jan.2012.

FERREIRA, A.W; ÁVILA S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guabanara Koogan, 2001.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Mapa da Hepatite C. **Revista de Manguinhos**, outubro.2011. Disponível em: < http://www.fiocruz.br/ccs/media/rev23_hepatitec.pdf>. Acesso em: jan.2012

FONSECA, J.C.F. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n. 3, jun.2010.

FREITAS, J. Hepatites Víricas: Perspectivas históricas. Disponível em: <http://www.aidsportugal.com/Modules/WebC_Docs/GetDocument.aspx?DocumentId=256&Version=2>. Acesso em: jan.2012.

GARDENAL, R.V.C. et al. Hepatite C e gestação: análise de fatores associados a transmissão vertical. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, v.44, n.1, p.43-47, fev.2007. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000100011. Acesso em: fev.2012

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus Taxonomy**. 2009. Disponível em: < <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: jan. 2012.

LYRA, A.C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A.M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v.37, n.5, p691-695, maio, 2004. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/bjmb/v37n5/5291.pdf>>. Acesso em: jan.2012.

MAGIORKINIS, G. et al. The Global Spread of Hepatitis C Virus 1a and 1b: A Phylodynamic and Phylogeographic Analysis. **PLoS Med**, v. 6, n.12, dez, 2009. Disponível em:<<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000198>>. Acesso em: jan.2012.

MARTINS, T; SCHIAVON, J.L.N;SCHIAVON, L.L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Ver. Assoc. Med.Bras**, São Paulo,v.57, n.1, fev.2011. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000100024>. Acesso em: jan.2012.

MILLER, R.H; PURCELL, R.H. Hepatitis C virus shares with Pestviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 87, p. 2057-2061,1990.

NELSON, P.K. et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. **The Lancet**, v.378, n.9791, p.571-583, ago.2011. Disponível em: < [http://www.lancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(11\)61097-0/fulltext](http://www.lancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(11)61097-0/fulltext). Acesso em: fev.2012.

OLIVEIRA, M. L. A. et al. Primeira injeção de drogas e hepatite C: achados preliminares. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 235-237, out./dez. 2005. Disponível em: <<http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/pc/portal/ess/v14n4/pdf/v14n4a04.pdf>>. Acesso em: fev.2012.

POZZOBON, R.C.R; BECK, S.T; CECCIM, A.D.F. Desempenho de um método para detecção simultânea de antígenos e anticorpos para o vírus da Hepatite C em doadores de sangue. **RBAC**, v. 43, n. 1, p. 003-006, 2011. Disponível em: < http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_43_01/rbac_43_01_01.pdf>. Acesso em: dez. 2011.

REYES G.R; PURDY M.A; KIM J.P; LUK K.C; YOUNG L.M, FRY K.E, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Science** 247: 1335-1339,1990.

SETO, W.W, et al. Natural History of Chronic Hepatitis C: Genotype 1 versus Genotype 6. **Journal of Hepatology**, v.53, n.3, p.444-448, set, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827810004563>>. Acesso em: fev.2012.

SILVA, K. L.T. **Caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em doadores de sangue do estado do Amazonas**. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-25062009-092024/fr.php>>. Acesso em: dez. 2011.

SIMMONDS, P. et al. A proposed system of nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**, v. 19, p.1321-1324, 1994.

SIMMONDS, P. et al. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**, v. 42, n.4, p.963-973, 2005.

STEINMANN, E. et al. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. **PLoS Pathog**, v.3, n.7, july,2007. Disponível em: < <http://www.plospathogens.org>>. Acesso em: jan.2012.

SY, T; JAMAL,M.M. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. **Int J Med Sci** , Califórnia, v.3, n.2, p. 41-46, 2006. Disponível em:< <http://www.medsci.org/v03p0041.htm>>. Acesso em: jan.2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Hepatitis C - Global prevalence (update)**. **Weekly Epidemiological Record**, v.74, p. 425-427, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Hepatitis C**. Fact sheet n° 164. Jun, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Hepatitis C-2002: Surveillance-control** 2002. Geneva, 2003. Disponível em:

< <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index.html>>. Acesso em: jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Technical Report Series. Annex 4: Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation**. Geneva, n.941, 2007. Disponível em :<

<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index.html>>. Acesso em: jan. 2012.

ZARIFE, M.A.S.A. et al. Detecção do genótipo 4 do vírus da hepatite C em Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.6, dez.2006.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822006000600012&script=sci_arttext>. Acesso em: jan. 2012

ZEIN, N.N. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.2, p.223-235, abr.2000.

GLOSSÁRIO

Análise Prévia – efetuada em determinados produtos sob o regime de Vigilância Sanitária, a fim de ser verificado se os mesmos podem ser objeto de registro.

Análise Fiscal – efetuada sobre os produtos submetidos ao sistema instituído pelo Regulamento, em caráter de rotina, para a apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual.

Análise Controle – efetuada em produtos sob regime de vigilância sanitária, após sua entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro.

Controle de Qualidade – conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos abrangidos por esta legislação, para que satisfaçam às normas de atividades, pureza, eficácia e inocuidade.

Plasma - porção líquida remanescente após separação física dos elementos celulares do sangue total, através de processos de sedimentação, centrifugação ou obtida por plasmaferese.

Registro de produto - inscrição, em livro próprio, após o despacho concessivo do dirigente do órgão do Ministério da Saúde, sob número de ordem, dos produtos de que se trata a lei, com a indicação do nome, fabricante, procedência, finalidade e dos outros elementos que os caracterizam.

Especificidade Clínica ou Diagnóstica - incidência de resultados verdadeiramente negativos, obtidos quando o teste é aplicado em indivíduo sabidamente não portadores da doença em estudo.

Falso Negativo (FN) - ensaio com resultado negativo obtido de amostra de indivíduo infectado.

Falso Positivo (FP) - ensaio com resultado positivo obtido de amostra de indivíduo não infectado.

Janela imunológica - o tempo entre a infecção pelo HIV e a produção de anticorpos suficientes para positivar um teste sorológico de detecção de anticorpos do HIV.

Ponto de corte (“cut-off”- CO) - corresponde à média das leituras dos resultados negativos mais dois ou três desvios padrão.

Sensibilidade Clínica ou Diagnóstica - incidência de resultados verdadeiramente positivos, obtidos quando um teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em estudo.

Serviço de Hemoterapia - entidade com a finalidade de prestar assistência e apoio hemoterápico e/ou hematológico à rede de serviços de saúde.

Verdadeiro Positivo (VP) - ensaios sucessivos com resultados positivos obtido de uma amostra de indivíduo infectado.

Verdadeiro Negativo (VN) - ensaios sucessivos com resultados negativos obtido de uma amostra de indivíduo não infectado.

Testes Confirmatórios - quando um teste suplementar é utilizado para confirmar um diagnóstico inicial positivo para a infecção do HCV

