



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**



**FIOCRUZ**

## **Dissertação de Mestrado**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C  
(VHC) EM PORTADORES DO ANTICORPO ANTI-VHC NA  
CIDADE DO SALVADOR - BA**

**LUCIANO KALABRIC SILVA**

Salvador - Bahia - Brasil

1998



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C  
(VHC) EM PORTADORES DO ANTICORPO ANTI-VHC NA  
CIDADE DO SALVADOR-BA**

**LUCIANO KALABRIC SILVA**  
Biólogo, Inst. de Biologia da UCSal, 1993.

Professor-orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil  
1998



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Silva, Luciano Kalabric  
S586d Detecção e genotipagem do vírus da hepatite C (VHC) em portadores  
do anticorpo anti-VHC na cidade do Salvador-BA. / Luciano Kalabric  
Silva. \_\_ Salvador: UFBA-FIOCRUZ, 1998.  
92p.: il.

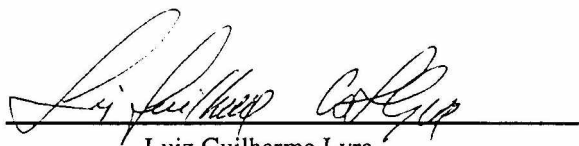
Dissertação (Mestrado em Patologia) – UFBA-FIOCRUZ, 1998.

1. Vírus da Hepatite C (VHC). 2. Genótipos. 3. Anticorpo anti-VHC.  
4. Bahia. I. Título.

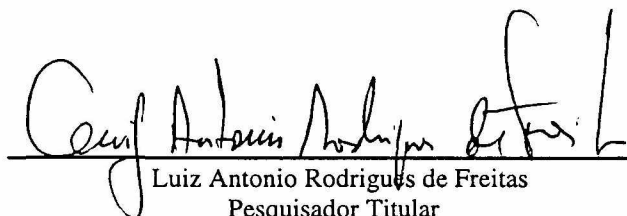
CDU 616.36-002: 575.22 (813.8)

FOLHA DE APROVAÇÃO

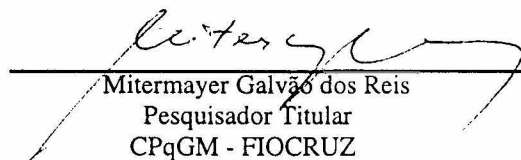
COMISSÃO EXAMINADORA



Luiz Guilherme Lyra  
Prof. Adjunto  
Faculdade de Medicina - UFBA



Luiz Antonio Rodrigues de Freitas  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ

A ciência tem raízes amargas, porém os seus frutos são doces.

*Aristóteles*

*Aos meus pais, Joel e Elizabeth, pela dedicação de uma vida de esforços na minha criação e educação.*

*Aos meus irmãos, Karine e Gustavo, pela amizade fraterna sempre imprescindível.*

*À minha esposa Soraia e a sementinha que plantamos juntos, Lucas, pela motivação adicional na etapa final deste trabalho.*

*A todos os amigos que participaram da minha vida pela troca de experiências fundamentais na formação da minha personalidade.*

## FONTES DE FINANCIAMENTO

---

- Bolsa de Formação Tecnológica RHAE-CNPq, modalidade DTI, processo institucional n<sup>o</sup>. 610.350/94-3, processo individual n<sup>o</sup>. 360.850/95-2 (NV), nov. 95-nov. 97.
- Programa de Colaboração Científica FIOCRUZ-INSERM U271, Lyon/FRA, set. 97- nov. 97.
- Bolsa CAPES, dez. 97-fev. 98.
- PRONEX, PV97/376, mar. 98-ago. 98.

## AGRADECIMENTOS

---

- Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pessoa da mais profunda dignidade que tive a oportunidade de ter como orientador, pelo suporte no Lab. de Pat. e Biol. Molecular/CPqGM, seus proveitosos ensinamentos e amizade.
- Ao Dr. Luiz Guilherme Lyra e demais integrantes do Grupo de Estudos e Pesquisas em Hepatite - GEPH (Anexo IV), pela colaboração que garante maior credibilidade a este trabalho. Especial, ao Dr. Raimundo Paraná pela co-orientação, fornecimento dos controles positivos e negativos para a padronização das técnicas e pelo esforço para minha indicação ao estágio internacional no *Institut National da la Santé e de la Recherche Médical/FRA* unidade 271, Lyon/FRA (INSERM U271).
- Ao Dr. Zilton Andrade, representante do lado brasileiro no Programa de Colaboração FIOCRUZ-INSERM U271, Lyon/FRA, pelo apoio e viabilização da minha ida o este instituto.
- Ao Dr. Christian Trepó, Sra. Ludmila Trepó, Dra. Pascale Bertillon e demais membros do INSERM U271, pela boa acolhida, suporte, amparo técnico e pessoal durante minha estadia no INSERM U271, Lyon/FRA. Especialmente, ao Dr. Alan Kay, a quem devo pelos meus primeiros passos no aprendizado das técnicas moleculares aplicadas na pesquisa do VHC e a Sra. Françoise Berby pelo acompanhamento e ajuda nas fases mais difíceis durante a aplicação da técnica de genotipagem.
- Aos demais colegas HUPES/UFBA, médicos e residentes do Serviço de Hepatologia e funcionários do Laboratório da Gastroenterologia e Hepatologia, pelo ajuda, preponderante, no encaminhamento e coleta de sangue dos participantes deste estudo. Especial a Dra. Nelma Santana pela presteza com que acolheu este trabalho e contribuiu no encaminhamento de pacientes.
- Aos Drs. Manoel Barral Neto e Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, coordenadores do Mestrado e Doutorado em Patologia FIOCRUZ-UFBA, pela presteza e competência com que têm conduzido este curso. Aos demais professores, colegas do Mestrado que ingressaram comigo, Carla Patrícia, Cláudia Dias, Edson Camandaroba, Gilberto Cafezeiro, Joice Neves, Luciana Silva, Márcia Souza, Valdevez Sousa e Virgínia Freitas e, especialmente, à secretária do curso, Sra. Rosália Oliveira, pela dedicação e competência com que vem exercendo suas atividades.
- Aos pesquisadores do Lab. de Pat. e Biol. Molecular, Albert Ko, Eliana Reis, e Dra. Marilda Gonçalves, pelo apoio profissional, consultoria e amizade.
- Ao estudante de iniciação científica Sérgio Pinto de Souza, pela participação ativa e entusiasmo demonstrado, lado a lado, na execução das tarefas do laboratório.
- Aos demais colegas do Lab. de Patologia e Biol. Molecular/CPqGM, Daniela Sant'Anna, Ísis Magalhães, Kátia Mota, Theomira Carmo, pelo convívio diário na rotina do laboratório e pela amizade sempre presente.
- À Sra. Ana Maria Fiscina, pela normalização desse trabalho e revisão das referências bibliográficas.
- A Itamar Bastos Crispim e Tânia de Faria, do setor de Comunicação Visual e Documentação Científica do CPqGM, pela diagramação de faixas e *posters*, encadernação das versões preliminares da Dissertação e pela preparação dos meus diapositivos.
- Aos participantes do estudo pelo consentimento e aceitação à esta pesquisa.
- A todos aqueles que, embora não citados nominalmente, também contribuíram de alguma forma para o nosso êxito.

"A Deus por me colocar sempre como um servo de seus desejos."



# SUMÁRIO

---

	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	10
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	12
	LISTA DE ANEXOS .....	13
	RESUMO .....	14
	ABSTRACT .....	15
1	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	16
2	<b><u>REVISÃO DA LITERATURA</u></b> .....	17
2.1	<b>HEPATITES VIRAIS</b> .....	17
2.1.1	<u>Vírus da hepatite A (VHA)</u> .....	17
2.1.2	<u>Vírus da hepatite B (VHB)</u> .....	18
2.1.3	<u>Vírus da hepatite D (VHD)</u> .....	19
2.1.4	<u>Vírus da hepatite E (VHE)</u> .....	20
2.1.5	<u>Vírus da hepatite G (VHG)</u> .....	20
2.2	<b>VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)</b> .....	22
2.2.1	<u>Organização genômica</u> .....	22
2.2.1.1	Proteínas estruturais .....	23
2.2.1.2	Proteínas não estruturais .....	23
2.2.1.3	Regiões terminais não codificadas .....	25
2.2.2	<u>Variações genômicas do VHC: genotipagem</u> .....	26
2.2.3	<u>Clínica e resposta terapêutica</u> .....	28
2.2.4	<u>Aspectos epidemiológicos</u> .....	33
2.2.4.1	Prevalência .....	33

2.2.4.2	Distribuição Genotípica .....	34
2.2.4.3	Transmissão .....	35
2.3	<b>MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VHC</b> .....	36
2.3.1	<u>Diagnóstico sorológico</u> .....	37
2.3.2	<u>Teste de confirmação</u> .....	38
2.3.3	<u>Sorotipagem</u> .....	38
2.3.4	<u>Detecção do VHC-RNA (RT-PCR)</u> .....	39
2.3.5	<u>Genotipagem</u> .....	40
2.3.6	<u>Quantificação</u> .....	41
3	<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	43
4	<b><u>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</u></b> .....	44
5	<b><u>CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</u></b> .....	46
5.1	<b>PARTICIPANTES</b> .....	46
5.1.1	<u>Critérios de inclusão</u> .....	46
5.1.2	<u>Critérios de exclusão</u> .....	46
5.1.3	<u>Desenho do estudo</u> .....	46
5.2	<b>MÉTODOS</b> .....	47
5.2.1	<u>Coleta dos dados e amostras</u> .....	47
5.2.2	<u>Ensaio Molecular</u> .....	48
5.2.2.1	Extração do VHC-RNA do soro e síntese do cDNA (RT) .....	48
5.2.2.2	Amplificação do VHC-cDNA (PCR) .....	50
5.2.2.3	<i>Southern blot</i> .....	51
5.2.2.4	Genotipagem ( <i>nested</i> RT-PCR) .....	53
5.2.2.5	Análise dos produtos das PCR .....	54
5.2.3	<u>Análises estatísticas</u> .....	55

6	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	56
6.1	<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS PARTICIPANTES</b> .....	56
6.2	<b>PADRONIZAÇÃO E RESULTADOS DOS ENSAIOS MOLECULARES ...</b>	58
6.2.1	<u>Detecção do VHC-RNA</u> .....	58
6.2.2	<u>Genotipagem</u> .....	60
7	<b><u>DISCUSSÃO</u></b> .....	62
8	<b><u>CONCLUSÕES</u></b> .....	70
9	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	71
	<b><u>ANEXOS</u></b> .....	86

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

AgHBs	antígeno de superfície do VHB
água DEPC	água tratada com dietil pirocarbonato
anti-HBs	anticorpo contra o antígeno de superfície do VHB
anti-HBc	anticorpo contra o antígeno do core do VHB
anti-VHA IgG	anticorpo contra o vírus da hepatite A (sugere infecção pregressa)
anti-VHC	anticorpo contra o vírus da hepatite C
bDNA	DNA ramificado
cDNA	DNA complementar
cols.	colaboradores
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos
fd	fita dupla
fs	fita simples
gama-GT	gama-glutamil transferase
GEPH-BA	Grupo de Estudos e Pesquisas em Hepatites-BA
gp	glicoproteína(s)
HVR(s)	região(ões) hipervariável(is)
IFN	interferon
INSERM U271	<i>Institut National da la Santé e de la Recherche Médical</i> Unidade 271, Lyon/FRA
Kb	Quilo base(s)
mEq VHC-RNA	miliequivalente(s) genômico(s)
NANB	não-A-não-B
NS	não estrutural(is)

nt.	nucleotídeo(s)
LiPA	teste de hibridização diferencial
pb	pares de base
RIBA	ensaio imunoblote recombinante
RFLP	polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
RM	mistura de reação (do inglês, <i>reaction mix</i> )
RNA	ácido ribonucléico
SOD	superóxido desmutase
SDS	dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecil sulfato</i> )
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
SSC	solução neutra de citrato de sódio
Taq DNA	DNA polimerase do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
TGO (AST)	aminotransferase glutâmica oxaloacética (aspartato amino transferase)
TGP (ALT)	aminotransferase glutâmica pirúvica (alanina amino transferase)
UDI	usuário(s) de drogas intravenosas
UV	luz ultravioleta
VHA	vírus da hepatite A
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
VHC-RNA	ácido ribonucléico do vírus da hepatite C
VHD	vírus da hepatite D
VHE	vírus da hepatite E
VHG	vírus da hepatite G
VHG-RNA	ácido ribonucléico do vírus da hepatite G
VR	valor de referência

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

Figura 1. Esquema da organização genômica do VHC. ....	23
Quadro 1. Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC. ....	27
Figura 2. Quatro classes hierárquicas do VHC. ....	29
Figura 3. Desenho do estudo. ....	47
Quadro 2. Seqüência dos nucleotídeos dos <i>primers</i> e da sonda para a detecção do VHC-RNA. ....	50
Quadro 3. Seqüência dos nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para a genotipagem do VHC. ....	53
Quadro 4. Combinações dos <i>primers</i> , tamanhos dos produtos e tipos/subtipos correspondentes. ....	54
Gráfico 1. Outras infecções detectadas entre os portadores do anti-VHC (n = 127). ....	56
Tabela 1. Características da população. ....	57
Tabela 2. Resultados preliminares na detecção do VHC-RNA em soros-padrões. ....	58
Tabela 3. Resultados na detecção do VHC-RNA conforme o Centro de Pesquisas. ....	59
Figura 4. Sensibilidade do <i>Southern blot</i> utilizando-se sonda biotilada ou sonda marcada com <sup>32</sup> P. ....	59
Tabela 4. Correlação entre a positividade do VHC-RNA e alterações nos níveis de TGO/TGP seguidos por 6 meses (n = 65). ....	60
Figura 5. Seqüências amplificadas de diferentes genótipos e subtipos do VHC pela técnica da PCR com <i>primers</i> genótipo-específicos. ....	61
Gráfico 2. Distribuição de freqüência dos subtipos do VHC entre os casos VHC-RNA positivos (n = 83). ....	61

## LISTA DE ANEXOS

---

ANEXO I - Termo de consentimento pós-informado. ....	86
ANEXO II – Ficha de cadastramento. ....	88
ANEXO III - Lista de reagentes. ....	91
ANEXO IV - Equipe do GEPH-BA por órgão e função. ....	92

## RESUMO

---

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) EM PORTADORES DO ANTICORPO ANTI-VHC NA CIDADE DO SALVADOR-BA. **LUCIANO KALABRIC SILVA.** O VHC é um vírus RNA (VHC-RNA) hepatotrópico associado com um alto risco à cronificação, cirrose e carcinoma hepatocelular. Nos últimos anos, técnicas moleculares para a detecção do VHC-RNA e a genotipagem têm se tornado ferramentas indispensáveis para a avaliação de pacientes com hepatite crônica C. Com o objetivo de verificar a positividade do VHC-RNA em portadores do anticorpo anti-VHC e determinar os genótipos do VHC nesta população, entre maio e setembro de 1997, 127 portadores do anti-VHC pelo método ELISA de 2<sup>a</sup>/3<sup>a</sup> geração, atendidos no Serviço de Hepatologia do HUPES/UFBA, foram randomizados para o estudo. Após consentimento informado, foram obtidas amostras de sangue para os ensaios moleculares e dados demográficos e laboratoriais mediante entrevista e consulta dos prontuários. O VHC-RNA foi detectado no soro pela técnica da RT-PCR utilizando-se *primers* deduzidos da 5' NCR sendo confirmados por *Southern blot* e hibridização com sonda marcada com <sup>32</sup>P. Nas amostras VHC-RNA positivas foi realizada a genotipagem pela técnica da RT-PCR, utilizando-se *primers* genótipo-específicos 1a, 1b, 2, 3a e 4 deduzidos da região do core. Neste estudo, o VHC-RNA foi detectado em 65,4 % (83/127) das amostras testadas. A positividade do VHC-RNA foi mais significativa entre os indivíduos com alterações nos níveis de TGO/TGP séricas, acompanhados no período de 6 meses do início da admissão no serviço ( $p < 0,05$ ). A distribuição genotípica foi 24,1 % do subtipo 1a, 38,6 % do subtipo 1b, 3,6 % do tipo 2, 21,7 % do subtipo 3a, e 12,0 % de genótipos mistos. Portanto, a positividade do VHC-RNA no soro de portadores do anti-VHC selecionados no Serviço de Hepatologia do HUPES-UFBA foi de 65,4 %. Na Bahia, predomina o genótipo 1 (62,7 %) seguido do 3 (21,7 %) e 2 (3,6 %).



## ABSTRACT

---

DETECTION AND GENOTYPING OF THE HEPATITIS C VIRUS (HCV) IN ANTI-VHC ANTIBODY CARRIERS FROM SALVADOR-BA. **LUCIANO KALABRIC SILVA**. HCV is an hepatotropic RNA virus (HCV RNA) associated with chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In the last few years, the development of molecular methods to detect HCV RNA and perform genotyping have become indispensable in the evaluation of patients with chronic hepatitis C. The objectives of this study included (1) to test for the presence of HCV RNA in anti-HCV antibody carriers and (2) to determine the genotypes of HCV in this population. Between May and September of 1997, 127 carriers attending in the hepatology service of the HUPES/UFBA, who tested positive by anti-HCV ELISA (2<sup>nd</sup>/3<sup>rd</sup> generation), in at least two tests, were selected for this study. After informed consent, blood samples were obtained for molecular assays and the patients were interviewed to obtain demographic data. Data from laboratory tests were obtained from the patients' records. HCV RNA was detected in serum by RT-PCR using primers designed from the 5' NCR sequence. The presence of HCV RNA was confirmed by Southern blot hybridization with a <sup>32</sup>P-labelled probe. In HCV RNA positive samples, genotyping was performed by RT-PCR using genotype-specific primers deduced from the core regions of genotypes 1a, 1b, 2, 3a and 4. HCV RNA was detected in 65,4 % (83/127) of the samples tested. HCV RNA positivity was associated with ALT/AST alterations in the period of 6 months following registration in the hepatology service ( $p < 0,05$ ). The genotype distribution was 24,1 % subtype 1a, 38,6 % subtype 1b, 3,6 % type 2, 21,7 % subtype 3a, and 12,0 % of mixed genotype. So, HCV RNA positivity in circulating serum was 65,4 % among anti-HCV antibody positive patients selected in the hepatology service of the HUPES-UFBA. In Bahia, genotype 1 was most prevalent (62,7 %), followed by genotype 3 (21,7 %), with few genotype 2 isolates (3,6 %).

# 1 INTRODUÇÃO

---

Atualmente, seis agentes virais identificados com tropismo hepático causam hepatites (vírus hepatotrópicos). Conforme foram sendo melhor caracterizados, tanto na sua biologia quanto na evolução das formas clínicas, foram designados através das letras do alfabeto em: A, B, C, D, E e G. Com exceção dos vírus C e G que pertencem a mesma família, os demais vírus são distintos e não demonstram qualquer homologia quanto à família e o ciclo evolutivo. Todos podem induzir hepatite aguda, mas somente quatro deles, o B, C, D e G, podem induzir a uma infecção crônica. Na fase aguda, as hepatites virais são muito similares, não podendo ser, confiavelmente, distinguidas apenas por características clínicas ou pela histologia.

O presente trabalho teve como principal objetivo determinar a positividade do genoma viral (VHC-RNA) em portadores do anticorpo contra o VHC (anti-VHC) e genotipar os isolados encontrados. Para tanto, foi necessário a padronização de duas técnicas inexistentes em nosso meio. A primeira delas, baseia-se na detecção do RNA circulante no soro pela extração deste ácido nucléico e RT-PCR utilizando-se *primers* deduzidos de regiões conservadas do vírus. Esta técnica é considerada padrão-ouro para a confirmação do diagnóstico sorológico, além de ser utilizada no acompanhamento de pacientes sob tratamento com drogas antivirais para se avaliar a eficiência do medicamento na eliminação da viremia. A segunda, utilizada para a identificação molecular dos diferentes tipos e subtipos do VHC, permite avaliar a influência dos genótipos do VHC na evolução clínica da doença e resposta terapêutica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 HEPATITES VIRAIS

#### 2.1.1 Vírus da Hepatite A (VHA)

O VHA pertence à família Picornaviridae, por apresentar um pequeno genoma RNA de fita simples de 7,5 Kb de tamanho. Seu genoma é linear, de polaridade positiva, possuindo uma cauda poli-A na região 3' terminal, semelhante às moléculas de RNAm de eucariontes. Como consequência, o genoma do VHA é capaz de servir como molde para a tradução de proteínas específicas do vírus imediatamente após a infecção, não dependendo de replicação ou transcrição viral (MILLER, 1991).

O VHA é um vírus desprovido de envelope, transmitido pela via oral-fecal. A hepatite pelo VHA tem um quadro clínico extremamente variado, desde a ausência ou poucos sintomas a, raramente, formas fulminantes. A infecção é auto-limitada, não existindo evidências de infecção crônica ou latente. Além disso, não se têm relatos de carcinoma hepatocelular associados especificamente à infecção pelo VHA.

Sua distribuição é cosmopolita, caracteriza-se quase que como uma doença universal entre crianças em países subdesenvolvidos (QUEIRÓZ e cols., 1995a; 1995b), muito embora também seja causa freqüente de doença esporádica ou epidêmica, em países mais industrializados (HADLER, 1991). Em Salvador, BORGES (1985) demonstrou uma prevalência de 97,4 % do anticorpo IgG contra o VHA (anti-VHA IgG) em mulheres gestantes de baixo poder aquisitivo (idade média de 25,6 anos). Consecutivamente, em São Paulo, PANNUTI e cols. (1985) demonstraram o anti-VHA IgG estava presente em 75 % das crianças de 2-11 anos e 100 % em adultos de baixo poder aquisitivo, enquanto que em

indivíduos com nível sócio-econômico médio observaram prevalências mais baixas (40,3 % nas crianças de 2-11 anos e 91,9 % nos adultos). Estes dados indicam que já no final da segunda década de vida quase não há indivíduos suscetíveis a adquirir a infecção pelo VHA no Brasil. Num estudo de colaboração entre diversas instituições ligadas à Saúde no Estado da Bahia (SESAB, FAMED/UFBA, CPgGM/FIOCRUZ), com casos agudos ictericos em Salvador, foi demonstrado que o VHA é a principal causa de hepatite aguda sendo responsável por 38 % de todos os casos (GEPH-BA, 1996; 1997 - dados não publicados).

### 2.1.2 Vírus da hepatite B (VHB)

O VHB pertence à família Hepadnaviridae e é o único membro, dentre os vírus que causam hepatites virais, a apresentar um genoma formado por DNA. Tem a peculiaridade de possuir um genoma composto de DNA em fita dupla circular incompleto de 3,2 Kb de tamanho. Durante sua replicação, há transcrição reversa com síntese de um RNA intermediário de fita positiva de 3,5 Kb por um processo muito semelhante àquele utilizado pelos retrovírus.

O VHB possui um envelope e um nucleocapsídeo. Sua transmissão se dá por via parenteral, vertical (SILVA, 1985) e sexual, sendo considerado uma DST pela OMS, assim como a sífilis, a SIDA e outras. As manifestações clínicas variam desde forma anictérica até hepatite aguda ou fulminante, hepatite crônica e cirrose. Existe um alto risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes com infecção persistente (COTRIM e cols., 1992).

No Brasil, o Estado do Amazonas é considerado de elevada prevalência para o VHB, afetando principalmente crianças menores de 10 anos de idade (BENSABATH e cols., 1987). ARBOLEDA e cols. (1995) demonstraram que a prevalência da infecção pelo VHB, pela avaliação dos marcadores AgHBs, anti-HBs e anti-HBc, numa região do Amazonas sem

qualquer intervenção vacinal prévia, foi de 24,6%. Os autores relataram que não há qualquer diferença no padrão epidemiológico da infecção em áreas urbanas ou rurais, apesar de existir uma nítida tendência para a elevação da prevalência com o aumento da idade. Estes dados se assemelham aos apresentados anteriormente por LYRA e cols. (1986) para a cidade de Salvador. Grupos de risco são bem conhecidos: indivíduos com alta promiscuidade, homossexuais, recém-nascidos de mães infectadas, etc (SILVA, 1985; VARELA, 1986).

No Rio de Janeiro, VACONCELOS e cols. (1994), investigando 5.000 doadores de sangue, relataram que a prevalência da infecção pelo VHB é de 0,78 %, superior à do HIV, 0,28 %, mas inferior à do VHC, 1,14 %.

### 2.1.3 Vírus da hepatite D (VHD)

O VHD foi inicialmente descrito na Itália por RIZZETO e cols. (1977). Anteriormente conhecido como agente delta, possui um genoma formado por uma molécula de RNA circular de 1,7 Kb com polaridade negativa, além de caracterizar-se por possuir um significativo número de estruturas secundárias e assumir uma conformação filamentosa em condições fisiológicas normais (MILLER, 1991).

Este vírus possui uma replicação peculiar, dependendo do VHB e, até o momento, só foi observado em pacientes infectados por este vírus (RIZZETO e cols., 1991). Quando em superinfecção com o VHB produz uma doença mais grave que aquela provocada exclusivamente pelo VHB (HADLER e cols., 1984; SMEDILE e cols., 1982). A sua transmissão ocorre através das vias parenteral e sexual.

Do ponto de vista de sua distribuição mundial, o VHD predomina na Bacia Mediterrânea da Europa e sobretudo no Norte da África. Na América do Sul, a infecção pelo VHD está restrita à região Amazônica onde existem áreas hiperendêmicas para o VHB (GERIN, 1994; LYRA e cols., 1991).

#### 2.1.4 Vírus da hepatite E (VHE)

O VHE é um Calicivírus e possui um genoma formado por uma molécula de RNA poliadenilada, de aproximadamente 7,6 Kb. Como no VHA, seu genoma é linear em conformação e polaridade positiva.

Trata-se de um vírus de transmissão oral-fecal, prevalente em áreas que carecem de serviços públicos básicos, tais como sistemas de água e esgoto. Difere do VHA pela existência de uma baixa mortalidade, devido a evolução de formas agudas para formas fulminantes (NANDA e cols., 1994). Além disso, existem evidências de formas graves da doença em mulheres grávidas no último trimestre de gestação (PURDY & KRAWCZINSKY, 1994). A sua evolução para uma hepatite crônica não foi demonstrada. É endêmico no Oriente Médio, na Ásia e em algumas regiões da África, sobretudo na costa Mediterrânea Africana (PURCELL & TICEHURST, 1988). Na América Latina, foi, inicialmente, descrito no México (REYES, 1993) e, posteriormente, no Brasil (PARANÁ, 1995). Os primeiros casos relatados em Salvador ocorreram em pacientes com hepatite aguda não-A-não-B (NANB) esporádica (PARANÁ e cols., 1997a). Acredita-se que 3,4 % das hepatites agudas nesta cidade sejam de etiologia pelo VHE (PARANÁ, 1997b). PANG e cols. (1995) e SOUTO e cols. (1997) também descreveram casos na Amazônia brasileira.

#### 2.1.5 Vírus da hepatite G (VHG)

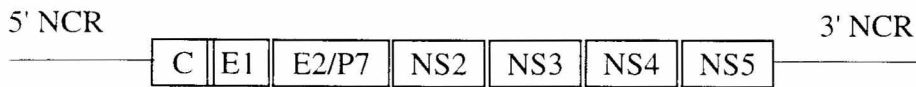
Recentemente, três novos vírus da família Flaviviridae (GB-A, GB-B e GB-C) foram identificados (SIMONS e cols., 1995a;b). A relação evolutiva entre os vírus GB e o VHC foi determinada pela análise filogenética à partir do alinhamento das seqüências das proteínas virais. Eles apresentam pelo menos 70 % de homologia da seqüência de aminoácidos entre si e mais de 32 % como o VHC. O VHG, embora o seu hepatotropismo

não esteja claramente demonstrado, foi reconhecido no Egito e Indonésia e identificado como o próprio vírus GB-C (LINNEN e cols., 1996).

O genoma do VHG é constituído por uma molécula de RNA fita simples de aproximadamente 9,4 Kb de extensão, contendo um único códon de iniciação que codifica uma poliproteína simples. Sua presença tem sido demonstrada em pacientes portadores de outras hepatites virais, bem como em usuários de drogas intravenosas e receptores de sangue e órgãos. Atualmente, é bem clara a importância da transmissão parenteral. Apesar de guardar alguma semelhança com o VHC, o VHG apresenta várias peculiaridades. O VHG-RNA já foi encontrado em sêmen humano, o que sugere uma possível transmissão sexual (SEMPRINI e cols., 1998). Além disso, LOPÉZ-ALCOROCHO e cols. (1997) demonstraram altíssima homologia entre os genomas de VHG presentes em mães e filhos o que sugere a transmissão vertical. Quanto à sua epidemiologia, o VHG, normalmente, tem sido detectado em indivíduos com faixa etária menor que os infectados pelo VHC. Poucos são os achados clínicos característicos da hepatite pelo VHG. Os níveis de aminotransferases tendem a se manter normais e aparentemente não têm associação com evolução para quadros clínicos mais graves. Os primeiros estudos com aplicação de interferon (IFN) demonstram que o VHG é sensível ao medicamento, entretanto a interrupção do tratamento permite uma retomada da replicação viral.

Apesar da aparente não virulência do VHG, KANDA e cols. (1997) reportam o envolvimento do VHG como sendo um dos principais agentes não-A-E associados às hepatites fulminantes no Japão. No Rio de Janeiro, LAMPE e cols. (1997) utilizaram a RT-PCR para detectar o VHG-RNA e verificaram a prevalência de 15 % em hemodialisados, 19 % em pacientes com hepatite crônica criptogênica e em 11 % em portadores assintomáticos. Atualmente, pela sua distribuição cosmopolita, o VHG tem sido considerado um problema de saúde pública mundial (CORWIN e cols., 1997).

Figura 1. Esquema da organização genômica do VHC.



Fonte: CLARKE, B. (1997).

### 2.2.1.1 Proteínas estruturais

Além do genoma RNA (VHC-RNA), o vírion do VHC é constituído por uma proteína do capsídeo C e pelo menos duas glicoproteínas do envelope E1 e E2 (gp35 e gp70, respectivamente). A proteína C, é uma molécula básica RNA-ligante, o maior constituinte do capsídeo do VHC. As proteínas glicosiladas E1 e E2 são elementos importantes do vírion que podem ser alvo de neutralização por anticorpos (DUSHEIKO, 1995). Segundo CLARKE (1997), a proteína E2 é algumas vezes encontrada estendida na sua terminação carboxi para incluir uma pequena proteína conhecida como p7 de tal maneira que múltiplas espécies da proteína E2 podem ser observadas após a expressão em sistemas eucariontes. Esta região anteriormente era considerada como sendo a região NS1, ou seja, a primeira região não-estrutural. A função biológica dessa região e das diversas espécies de E2 no momento é desconhecida. O gene que codifica E2 representa a porção mais variável do genoma do VHC, apresentando duas regiões hipervariáveis (HVR) (WEINER e cols., 1991).

### 2.2.1.2 Proteínas não-estruturais

A maior parte do VHC-RNA codifica proteínas não-estruturais (NS), denominadas NS2, NS3, NS4, NS5, envolvidas na replicação viral. Muitos peptídeos sintéticos, produzidos destas regiões, são atualmente utilizados no teste diagnóstico por ELISA de 3<sup>a</sup> geração.



Uma proteína sinalizadora do hospedeiro inicia o processamento da região NS, clivando as proteínas NS2/3. A proteína NS2 constitui-se numa proteinase e juntamente com o domínio amino-terminal da proteína NS3 participa do processamento das demais proteínas virais. A proteína NS3 é uma molécula bifuncional com o domínio amino-terminal constituído de uma serina proteinase e o domínio carboxi-terminal com atividade NTPase /RNA helicase. A atividade de clivagem da proteinase NS3 é altamente intensificada pelo cofator NS4A. Ambas formam um complexo estável, pelo qual os resíduos 22 da NS3 e a região central da NS4A são exigidos. Embora esta interação seja essencial para a clivagem dos sítios NS3/4A, NS4A/4B e NS4B/5A, o processamento entre NS5A e NS5B pode ser mediado pela proteinase NS3 na ausência da NS4A, embora com baixa eficiência (KOCH & BARTENSCHLAGER, 1997).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína conjugada a uma serina contendo uma seqüência de sinalização para localização nuclear que tem sido encontrada em frações de membranas periplasmáticas nucleares o que indica que esta proteína pode ter um papel importante na transcrição ou tradução. Ensaio, realizado por KATO e cols. (1997), demonstrou que uma porção da proteína NS5A é um potente ativador transcricional pela presença de dois domínios ácidos e um domínio rico em prolinas (frações de consenso para domínios com esta propriedade). Apesar da patogenicidade do VHC ainda ser desconhecida, especula-se a possibilidade desta porção estar envolvida na hepatocarcinogênese, uma vez que muitas outras proteínas virais, envolvidas em carcinogênese, funcionam como ativadores transcricionais (SCHWARZ e cols., 1985; SEIKI e cols., 1986). ENOMOTO e cols. (1996) demonstraram também que a proteína NS5A apresenta uma região denominada "região de determinação de sensibilidade ao IFN" (ISDR, do inglês *Interferon sensibility-determining region*) que afeta a resposta ao IFN e os níveis de VHC-RNA no soro de pacientes com hepatite crônica. Isto pode significar que a proteína NS5A afeta estes mecanismos através da

ativação transcricional, por regular a transcrição de certos fatores celulares que tenham uma função antiviral ou desempenhem papel importante na replicação do vírus. A proteína NS5B é a RNA polimerase RNA-dependente, responsável pela replicação do genoma viral.

### 2.2.1.3 Regiões terminais não codificadas

O VHC apresenta na extremidade do seu genoma regiões 5' e 3' não-codificadas (NCR ou UTR, do inglês *non-coded region* ou *untranslated region*). A 5' NCR de 324 a 341 nucleotídeos precede a grande seqüência de codificação e contém 3 ou 4 códons de iniciação que poderiam codificar peptídeos de aproximadamente 28 aminoácidos, cada um começando com um resíduo de metionina. Não se sabe se os ribossomos traduzem esses pequenos fragmentos 5' antes da tradução do polipeptídeo (HOUGHTON e cols., 1991). Particularmente, esta região é a mais conservada do VHC-RNA, apresentando uma divergência de no máximo 6 % entre os diversos espécimens estudados (BUKH e cols., 1992; KATO e cols., 1990). Sua estrutura primária caracteriza-se por apresentar seqüências palindrônicas que estabelecem múltiplas estruturas secundárias estáveis em forma de alça (HAN e cols., 1991). Tudo indica que esta estrutura secundária em alça é responsável pela grande homologia desta região, pois mutações devem ocorrer apenas com a dupla substituição das bases complementares que formam o alça (OKAMOTO e cols., 1990). Esta característica determinou a escolha da 5' NCR como alvo preferencial em diversos métodos moleculares para o diagnóstico do VHC em pacientes cronicamente infectados. Do ponto de vista funcional, acredita-se que a estrutura secundária da 5' NCR contribui na formação de um sítio de entrada interna para ribossomos mediando uma tradução *cap*-independente, o que pode ser importante para desempenhar um papel regulatório durante a replicação viral, talvez ao nível da tradução (TSUKIYAMA-KOHARA e cols., 1992)

A 3' NCR também caracteriza-se por ser bem conservada. Os primeiros estudos sugeriam a possibilidade da presença de uma cauda poli-A, o que estabeleceria um paralelo com a estrutura geral de RNAm positivos de eucariontes (HAN e cols., 1991). Todavia, isto não foi confirmado pelos trabalhos mais recentes. BLIGHT & RICE (1997) descreveram que a estrutura completa da 3' NCR apresenta 98 nt. e revela duas porções, uma extremidade 3' de 46 nt., que forma uma estrutura secundária estável em alça, em contraste com a extremidade 5' de 52 nt., com estrutura menos estável permitindo múltiplas conformações.

### 2.2.2 Variações genômicas do VHC: genotipagem

Pela ausência de sistemas de cultivo que permitissem estudar aspectos fenotípicos do vírus, recorreu-se amplamente ao estudo das variações genômicas ou genotipagem. A genotipagem consiste em avaliar o grau de homologia das seqüências de nucleotídeos dos diversos espécimens isolados e estabelecer uma relação de proximidade evolutiva.

Em 1989, KUBO e cols. isolaram, paralelamente, o primeiro VHC-RNA à partir de pacientes japoneses, denominado-o de VHC-J1. Com o isolamento e estudo separado do VHC nos EUA e no Japão, as primeiras comparações genotípicas foram inevitáveis. Em seu trabalho, KUBO demonstrou que o espécimen VHC-J1 apresentava uma homologia de 79,8 % na seqüência de nucleotídeos e 92,2 % na seqüência de aminoácidos quando comparado com o protótipo americano (PT) (CHOO e cols., 1989).

Efetivamente, coube a ENOMOTO e cols. (1990) realizarem um dos primeiros estudos de genotipagem ao comparar seqüências do gene que codificam a região NS5 entre pacientes japoneses. À partir desta análise, chegou-se à conclusão de que no Japão existia pelo menos dois tipos diferentes de VHC, denominados tipos K1 e K2 que apresentavam uma homologia, respectivamente, de 80 % e 67 % com o PT.

CHAN e cols. (1992), comparando os resultados de seqüenciamento, observaram que diferentes regiões, por si só, permitem uma boa caracterização genômica representativa do todo, tendo a vantagem de facilitar o trabalho na genotipagem. Todavia, cada região possui propriedades que melhor se assemelharam com os resultados obtidos pelo seqüenciamento dependendo da técnica empregada. Por exemplo, a análise baseada na 5' NCR permite a tipagem molecular, porém não garante a distinção de subtipos da maioria dos genótipos atualmente conhecidos.

Subseqüentemente, outros trabalhos identificaram novos genótipos à partir da análise de regiões diversas do genoma, surgindo uma nomenclatura diversificada criada por cada autor (BUKH e cols., 1993; CHA e cols., 1992; OKAMOTO e cols., 1992; 1993). Das áreas sub-genômicas mais estudadas destacam-se a 5' NCR e as regiões que codificam as proteínas C, E1 e NS5B.

Quadro 1. Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC.

Nomenclatura Proposto por SIMMONDS	Isolados	ENOMOTO / NAKAO	CHA / URDEA	MORI / OKAMOTO
1a	VHC-1	K-PT	I	I
1b	VHC-J, -BK	K-1	II	II
1c	EG-28, HC-J9	sc	sc	sc
2a	HC-J6	K-2a	III	III
2b	HC-J8	K-2b	III	IV
2c	T0983, ARG6	sc	III	sc
3a	E-b1, Ta	sc	IV	V
3b	Tb, Tr(V)	sc	IV	VI
4	EG-16, 29, 33	sc	sc	sc
5a	SA1-11, SA3, 4	sc	V	sc
6a	HK1-4, HK2	sc	sc	sc

Nota: Nomenclatura proposta para as seqüências de VHC publicadas e uma comparação com esquemas existentes (ENOMOTO e cols., 1990; CHA e cols., 1992; MORI e cols., 1992; OKAMOTO e cols., 1992). O sistema proposto reduz a relação tipo/subtipo entre as seqüências de VHC para através de uma análise de filogenética dos nucleotídeos da região NS5 e outras regiões codificadas. Seqüências sem correspondências na classificação dos outros autores estão indicadas como "sc" (DUSHEIKO & SIMMONDS, 1994a; SIMMONDS e cols., 1995).

SIMMONDS e cols. (1993b) uniformizaram a nomenclatura internacional para a classificação do VHC. Neste trabalho, o gene que corresponde a região NS5 de 76 isolados de diferentes áreas geográficas foi seqüenciado e, após o alinhamento das seqüências e a análise da homologia aos pares de seqüências, foi possível estabelecer as associações evolutivas entre as diversas variantes. Baseado-se nos resultados, foram propostos três níveis hierárquicos: tipos (similaridade entre 56 a 72 %), subtipos (similaridade entre 74 a 86 %) e isolados (similaridade entre 88 e 100 %). Atualmente, os isolados do VHC estão classificados em 6 tipos e pelo menos 24 subtipos representados respectivamente por números em ordem crescentes (1 a 6) e letras (a,b,c,...) (Quadro 1). Este sistema de classificação, além de permitir a padronização das classificações anteriores, também eliminou o inconveniente de alguns sistemas que não permitiam expansões para genótipos novos. Posteriormente, SIMMONDS e cols. (1994) confirmaram seu sistema utilizando outras regiões sub-genômicas. Em 1995, numa revisão sobre a variabilidade genômica do VHC, SIMMONDS sugeriu que qualquer região codificada do vírus poderia produzir relações equivalentes entre os genótipos e que para a criação de um novo genótipo fosse estabelecido a análise filogenética de pelo menos duas regiões sub-genômicas com demonstração de ramos filéticos distintos. A padronização eliminou a necessidade da utilização da técnica de seqüenciamento e abriu perspectivas para uma melhor compreensão do papel da genotipagem em estudos populacionais mais amplos.

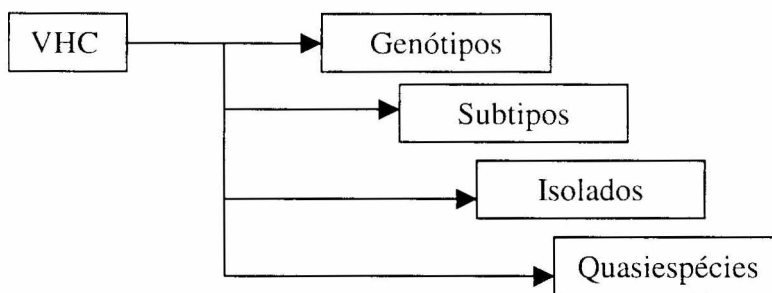
### 2.2.3 Clínica e resposta terapêutica

A infecção aguda pelo VHC pode ser completamente assintomática. Todavia, a hepatite crônica provocada pelo VHC é estável e lentamente progressiva, podendo agravar-se muitas vezes na presença de outros fatores associados (COELHO e cols., 1998). Estima-se que mais de 50 % dos portadores do anticorpo anti-VHC mantenham a infecção num curso

benigno que varia entre 10 a 20 anos. Em torno de 15-20 % dos pacientes infectados pelo VHC progridem para um estágio-terminal de doença de fígado e são aconselhados ao transplante. O VHC também está associada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular podendo acometer até 30 % dos casos com doença avançada (SAITO e cols., 1990). O tratamento com IFN-alfa tem sido o tratamento de escolha para a infecção crônica pelo VHC, com normalização dos níveis das aminotransferases séricas em 50 % dos pacientes, muito embora, exista uma alta taxa de reincidência após a descontinuidade da terapia.

Por ser um vírus RNA, o VHC possui um elevado grau de mutações espontâneas com uma frequência estimada de 1,4 a  $1,9 \times 10^{-3}$  mutações por nucleotídeo por ano, determinando a existência de grupos heterogêneos do vírus que compartilham de aproximadamente 70 % de homologia, "quasiespécies" (Figura 2).

Figura 2. Quatro classes hierárquicas do VHC. Os vírus isolados, provenientes de "quasiespécies" presentes em indivíduos infectados, são denominados de subtipos ou subgrupos, os quais são classificados em tipos ou grupos.



Fonte: Adaptado de BASSIT & SAÉZ-ALQUÉSAR (1995).

Aspectos inerentes ao vírus são importantes para a manutenção e persistência da infecção. A alta heterogeneidade do genoma viral pode levar a comportamentos diferentes, da interação vírus/hospedeiro de acordo com o genótipo do VHC infectante, mostrando

diferenças quanto ao grau de patogenicidade e, também, na evolução da doença e resposta terapêutica (SHINDO e cols., 1996).

SAKAMOTO e cols. (1995) demonstraram que a diversidade dos quasiespécies encontrados no plasma e no fígado são as mesmas, o que indica que a rápida mutação do vírus imediatamente repopoa o fígado. KAO e cols. (1995) associaram o aumento da heterogeneidade dos quasiespécies no soro à exacerbações agudas da doença subsequentes a picos abruptos de TGO. Talvez, a natureza de quasiespécie do VHC tenha um significado adaptativo importante por causa da coexistência de múltiplas variantes genômicas, que permitem uma rápida seleção de mutações para garantir o escape à resposta imune do hospedeiro, causando uma infecção persistente. LAWAL e cols. (1997), investigando a HVR-1 do genoma do VHC em duas populações distintas, uma de pacientes imunossuprimidos com indicação para o transplante de fígado e a outra formada por portadores assintomáticos sem tratamento, sugeriram que a diversificação do VHC é bastante potencializada sob a pressão do próprio sistema imune do hospedeiro e que a utilização de rotinas de imunossupressão determinam uma replicação preferencial que seleciona e limita a diversidade viral.

Também, muito tem sido discutido a respeito da influência da carga viral na agressividade da doença. SMITH e cols. (1996) descreveram que em pacientes assintomáticos triados em bancos de sangue, a carga viral foi semelhante entre os diversos tipos e subtipos. Todavia, CHAN e cols. (1995) descreveram que, durante a fase aguda da infecção, os títulos do VHC-RNA são também similares em pacientes com diferentes genótipos, embora, com o curso da doença para a fase crônica, os pacientes com o genótipo 1b mantenham um título sustentado mais alto que os pacientes com o genótipos 2a. Segundo NGUYEN e cols. (1994), a carga viral permanece praticamente inalterada quando se acompanham pacientes crônicos sem tratamento por um período de 14 meses.

SUZUKI e cols. (1995) avaliaram a importância da genotipagem e da dosagem da carga viral no início do tratamento, para determinar a capacidade preditiva destes testes para a resposta de pacientes crônicos à terapia com IFN (neste estudo foi utilizado o equivalente recombinante IFN  $\alpha$ 2a). Segundo os autores, carga viral no início do tratamento, genótipo e achados histológicos são independentemente associados com a resposta terapêutica, utilizando-se IFN. Em particular, uma baixa carga, associada com o genótipo 2, e um baixo escore de Knodell (KNODELL e cols., 1981).

ZEIN e cols. (1996) sugeriram que os níveis de RNA viral circulantes poderiam modular a sensibilidade dos genótipos do VHC ao tratamento com IFN. Todavia, TALIANI e cols. (1997), acompanhando pacientes crônicos não cirróticos, demonstraram que a resposta ao IFN foi significativamente mais importante entre os indivíduos infectados por genótipos diferentes do tipo 1. Muito embora os pacientes respondedores apresentassem títulos iniciais de RNA mais baixos, esta diferença não era significativa quando se estratificava de acordo com os genótipos. Por exemplo, pacientes infectados com o tipo 2 apresentavam maior resposta mesmo tendo títulos virais equivalentes aos pacientes infectados pelo tipo 1a. Estes achados demonstram que entre os indivíduos crônicos sem cirrose, o principal elemento preditivo para a resposta ao IFN é o genótipo do VHC, independentemente da carga viral.

FÉRAY e cols. (1995) trouxeram enorme contribuição ao examinar, prospectivamente, pacientes com hepatite pelo VHC, antes e após transplante de fígado. Eles observaram que ao longo de três anos houve uma maior recorrência da doença de fígado nos pacientes com o genótipo 1b antes do transplante. Além disso, não foi notada nenhuma diferença quanto à importância da carga viral antes e após o transplante. Estes dados indicam que o genótipo 1b estava associado a uma maior agressividade da doença no fígado quando comparado com outros genótipos. PRATI e cols. (1996) demonstraram que os níveis de TGO, TGP e gama-GT foram significativamente superiores entre os pacientes com VHC tipo 1



quando comparados com aqueles infectados pelo genótipo 2. O potencial de cronificação não diferiu entre os genótipos 1 e 2.

A gravidade da hepatite causada pelo VHC também parece estar associada com achados histológicos no início do acompanhamento. O escore de KNOVELL tem sido indicado pelo seu poder em descrever o prognóstico dos pacientes. Em um estudo prospectivo, através de biópsia seriadas de pacientes crônicos, YANO e cols. (1996) descreveram que todos os pacientes com um alto grau final no escore de KNOVELL e fibrose septal com nodularidade incompleta, inequivocamente desenvolvem cirrose após acompanhamento por 10 anos e 96 % dos pacientes com um grau final intermediário desenvolveram cirrose após 17 anos. Além disso, CHO e cols. (1996) demonstraram que a detecção in situ do VHC-RNA está associada com o grau da lesão.

Finalmente, o *background* genético do indivíduo ou de grupos raciais parece Ter importância no curso da infecção pelo VHC. Por exemplo, trabalho recentemente realizado por KUSUSHITA e cols. (1996) demonstrou uma frequência significativamente maior do alelo HLA DR13 em portadores assintomáticos em relação a pacientes com hepatite crônica C. MINTON e cols. (1998) em um estudo com vários alelos classe I e II do HLA não encontram qualquer associação desses alelos com a severidade da doença, não obstante, os alelos classe II DRB1\*11 e DQB1\*0301 estivessem associados com a eliminação do VHC-RNA do soro em portadores do anti-VHC.

Portanto, a variação genômica do VHC parece desempenhar um papel importante. Existe um certo consenso de que a infecção pelo subtipo 1b está relacionada a pior prognóstico da doença, predispondo ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Além do genótipo, a carga viral, os resultados histológicos iniciais, o início precoce do tratamento e, possivelmente, o HLA são variáveis que podem indicar uma melhor ou pior resposta ao tratamento com IFN (SIMMONDS, 1997).

## 2.2.4 Aspectos epidemiológicos

### 2.2.4.1 Prevalência

Segundo dados da OMS, o VHC afeta 150 milhões de pessoas em todo o mundo. O entendimento da epidemiologia do VHC, baseado na detecção do anticorpo contra o VHC (anti-VHC) pelo teste de ELISA, está mudando tão rapidamente quanto mais eficiente está este teste diagnóstico, seja na população em geral, seja em populações de risco (AOKI e cols., 1994). Poucos são os trabalhos que descrevem a prevalência da hepatite por vírus C na população em geral e inúmeras informações vêm se baseando em amostras de conveniência, tais como indivíduos triados em bancos de sangue, pacientes crônicos e hemodialisados.

Baseando-se em dados de bancos de sangue e estudos populacionais, RALL & DIENSTAG (1995) descreveram que a prevalência mundial da infecção pelo VHC aproxima-se de 1 %, embora variações geográficas existam: 0,4 % a 1,1 % na América do Norte, 0,4 % na América Central, 2,6 % a 2,9 % na América do Sul, 0,3 % a 0,7 % no norte da Europa, 1,1 % a 1,5 % no sul da Europa, 9,6 % a 13,6 % no norte da África, 0,9 % a 7,9 % na região africana sub-Saara, 3,2 % no Oriente Médio e 1,2 a 3,0 % na Ásia. Todavia, estes dados tendem a subestimar algumas informações locais.

GUADAGNINO e cols. (1997) determinaram uma prevalência de 12,6 % na população em geral em uma cidade no sul da Itália, demonstrando uma alta prevalência na região mediterrânea. Seus dados demonstraram também que a prevalência do anti-VHC na região é crescente de 1,3 %, entre jovens com idade inferior a 30 anos, a 33,1 % em maiores de 60 anos. Na Índia, PANIGRAHI e cols. (1997) demonstraram uma prevalência de 1,8 % em doadores de sangue, 13,8 % em pacientes com doença crônica de fígado e 9 % em pacientes com hepatite viral aguda. Investigando usuários de drogas intravenosas na

Inglaterra. MAJID e cols. (1995) demonstraram uma prevalência de 59 %, número extremamente superior aos de VHB (22 %) e HIV (1 %).

No Brasil, a prevalência do VHC é da ordem de 1,5 %. Estima-se que mais de 2 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus (Ministério da Saúde, 1993). SILVA e cols. (1995) demonstraram a soroprevalência geral em duas populações, urbana e rural, com características distintas: Salvador, capital do Estado da Bahia, e Castro Alves, zona rural autóctone. Os resultados sugeriram uma disseminação eminentemente urbana (1,25 %) com prevalência pouco inferior às relatadas por SANTANA, N. e cols. (1994; 1995) em doadores de sangue de Salvador (1,7 %). Estes dados são inferiores aos descritos para doadores de sangue na cidade do Rio de Janeiro, 3,1 % (LEITE e cols., 1992), e superiores aos encontrados em Florianópolis, 1,14 % (VASCONCELOS e cols., 1994). O que chama a atenção nestes trabalhos com doadores de sangue é a associação entre a positividade do anti-VHC e alterações dos níveis de TGO.

SANTANA, G. (1995) demonstrou uma soroprevalência de 23,8 % em dialisados na cidade de Salvador. Esta frequência foi 14 vezes superior à encontrada entre os doadores de sangue desta mesma cidade (SANTANA, N. , 1994). Em Goiânia, esta proporção foi quase 20 vezes superior (MARTINS e cols., 1994; NAGHETTINI e cols., 1997) enquanto que, no Rio de Janeiro, a soropositividade foi de 65% (VANDERBORGHT e cols., 1995). A história de transfusão sangüínea e a duração do tratamento com hemodiálise estavam associadas à alta soroprevalência. (NAGHETTINI e cols., 1997; SANTANA, G., 1995; YOSHIDA e cols., 1993).

#### 2.2.4.2 Distribuição Genotípica

A distribuição genotípica mundial do VHC varia conforme as áreas geográficas: os tipos 1, 2 e 3 são encontrados mais predominantemente na Europa, Japão e Estados Unidos

(BASSIT & SAÉZ-ALQUÉSAR, 1995); o tipo 4 no Centro-Norte da África e no Oriente Médio (DUSHEIKO e cols., 1994b); o tipo 5 na África do Sul (SMUTS & KANNEMEYER, 1995); e o tipo 6 em Hong Kong (PRESCOTT e cols., 1996).

VIAZOV e cols. (1997) determinaram a distribuição genotípica em pacientes crônicos de regiões diversas da antiga União Soviética e demonstraram um predomínio do genótipo 1 e 3, não obstante, em algumas regiões, o genótipo 2 chegou a 9 %. NIU e cols. (1995) relataram a presença dos genótipos 1 e 2 na China. No Vietnã, Hong Kong, Macau, Tailândia e Burma foram ainda descritos os genótipos 1 e 6 (MELLOR e cols., 1996).

No Marrocos, Portugal e Espanha prevalece o genótipo 1 (DUSHEIKO e cols., 1994b). BENANI e cols. (1997) descreveram uma predominância dos genótipos 1 e 2 em pacientes crônicos e apenas o genótipo 1 em pacientes hemodialisados no Marrocos. Estes dados demonstram não somente uma peculiaridade local, mas também uma nítida influência na disseminação do VHC nesta região, que, contrariamente, difere dos genótipos predominantes da África.

Em São Paulo, BASSIT e cols. (1994) demonstraram que o genótipo 1b é o mais freqüente entre doadores de sangue (52 %), seguido dos subtipos 1a (20 %), 3a (20 %), 2a (4 %) e 2b (4 %). Estes dados são semelhantes aos obtidos por STUYVER e cols. (1993) em amostras do Rio de Janeiro. No sul do país, KRUG e cols. (1996) descrevem uma distribuição semelhante, porém sem encontrar nenhuma amostra com genótipo "misto". De qualquer forma, o genótipo 1 é descrito como o mais prevalente no país, seguido pelo genótipo 3 e 2.

#### 2.2.4.3 Transmissão

A principal via de transmissão do VHC é a parenteral percutânea, muito embora situações não percutâneas, como a transmissão vertical (THALER e cols., 1991) e perinatal, possam ocorrer. Alguns grupos de risco são, portanto, bem conhecidos: transfundidos (POEL

e cols., 1989), transplantados, hemodialisados, UDI (MAJID e cols., 1995), indivíduos tatuados, e trabalhadores do Setor de Saúde. Existe também uma via esporádica, onde não ocorrem fatores de risco identificáveis. Esta forma esporádica é observada em 50 % dos casos de hepatite crônica C (RALL & DIENSTAG, 1995). Neste sentido, pouco tem sido feito no sentido de investigar a transmissão pelo uso de serviços gerais, tais como odontológico, manicures, barbearias etc. Além disso, os trabalhos que relatam transmissão domiciliar e/ou sexual ainda são controversos. Muitos investigadores demonstraram que existe uma baixa prevalência do anti-VHC em parceiros sexuais de indivíduos infectados pelo VHC (BRESTERS e cols., 1993; HALLAN e col., 1993). Não obstante, EDELENYI-PINTO e cols. (1993), num estudo com populações de alto risco por transmissão sexual do Rio de Janeiro, reportaram esta via como a responsável pela manutenção da endemicidade do VHC na população local. De forma semelhante, MESQUITA e cols. (1997), num estudo com prostitutas da cidade de Santos, descreveram uma soropositividade de 10,9 % com elevação do risco conforme o tempo de prostituição. A dificuldade em se confirmar a transmissão sexual atualmente esbarra na inabilidade da detecção do VHC-RNA em amostras de sêmen.

## **2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VHC**

Os métodos utilizados para o diagnóstico se fundamentam na identificação de anticorpos contra diferentes antígenos do vírus ou na detecção qualitativa do RNA viral. A tipagem, por sua vez, restringe-se a identificação de variantes genotípicas do VHC-RNA mediante comparação da homologia em seqüências genômicas ou sub-genômicas representativas. Estas variações têm implicações tanto geográficas quanto clínico-epidemiológicas na disseminação do VHC. Por fim, a avaliação da carga viral vem sendo

realizada a partir da determinação direta, ou comparada com padrões, dos níveis do VHC-RNA circulantes no soro.

### 2.3.1 Diagnóstico sorológico

O primeiro teste desenvolvido para o diagnóstico do VHC baseava-se em um ELISA de captura, utilizando-se um antígeno sintético, produzido pela técnica do DNA recombinante em clones de leveduras, referido C100-3. Segundo KUO e cols. (1989), de cada 8 pacientes capazes de transmitir a doença a chimpanzés, 7 foram positivos para este teste de primeira geração. Além disso, 90 % (9/10) dos pacientes que desenvolveram hepatite viral NANB após transfusão de sangue também foram positivos. Cerca de 80 % dos pacientes crônicos na Itália e Japão apresentaram o anticorpo circulante. Apenas 15 % dos casos agudos foram positivos e 58 % dos pacientes americanos sem fatores de risco associado apresentaram resultados positivos.

Esta técnica começou a ser empregada para triagem de pacientes no início dos anos 90 com o chamado teste de primeira geração (EIA1 ou ELISA1), o qual pesquisava anticorpos diretos contra a porção NS4 do vírus. Já em 1992, YOSHIDA e cols. investigaram a eficiência deste teste em pacientes com suspeita de infecção por outras flavivirose, tais como a Dengue e Febre Amarela provenientes do Rio de Janeiro. Seus resultados demonstraram uma especificidade de 100 % o que indica que o teste não somente confirma o anti-VHC mas também diferencia a infecção e portanto pode ser empregado em regiões onde outras flavivirose são endêmicas.

O teste de segunda geração incorporou os antígenos sintéticos do core (C22) e da região NS3 (C33c), bem como o C100-3, detectando anticorpos mais precocemente que os testes de primeira geração. Os ELISA de terceira geração, atualmente, incluem além dos outros antígenos já mencionados, os antígenos da região NS5, com a vantagem da diminuição

da janela imunológica em cerca de 7 a 10 semanas quando comparados aos ELISA de segunda geração, mas com inconveniente de resultados falsos positivos mais frequentes devido a melhora da sensibilidade deste teste.

### 2.3.2 Teste de confirmação

Apesar das inovações nos métodos de ELISA, tem sido preconizada a utilização do RIBA como teste confirmatório. O RIBA de primeira e segunda geração utilizam-se de fitas plásticas ou de nitrocelulose com antígenos do VHC absorvidos em bandas individuais, além do controle negativo constituído pelo complexo superóxido desmutase (SOD). A reação específica dos anticorpos com dois ou mais antígenos evidencia o resultado positivo, enquanto que amostras reativas a apenas um antígeno são consideradas com resultado indeterminado e as não reativas negativo (POEL e cols., 1991). Os pacientes com amostras com resultado indeterminado devem repetir o exame, e, se persistindo o resultado, devem ser acompanhados por sorologia por período de 6 meses.

### 2.3.3 Sorotipagem

Atualmente tem se buscado o aprimoramento dos testes para sorotipagem pelo método de ELISA. Esta técnica baseia-se na identificação de anticorpos genótipo-específicos de antígenos sintéticos deduzidos do gene C e NS4. As vantagens da genotipagem sorológica são: fácil execução, útil para ser utilizado em estudos de larga escala, e podem fornecer informações mesmo de pacientes VHC-RNA negativos. Até o momento, poucos resultados demonstraram alguma eficiência na sorotipagem do VHC (HALFON e cols., 1997). Apesar de avaliar um aspecto fenotípico, a sorotipagem poderia ser enquadrada, tão somente, como uma técnica indireta de genotipagem com uma sensibilidade variando entre 50 % a 85 %. Além disso, não fornece informações de alguns tipos e dos subtipos do VHC. No futuro

espera-se que esta técnica seja extremamente útil na rotina laboratorial, como é hoje em outras aplicações.

#### 2.3.4 Detecção do VHC-RNA (RT-PCR)

A detecção qualitativa do VHC-RNA por RT-PCR tem frequentemente ajudado na confirmação diagnóstica da infecção pelo VHC. Dados obtidos usando-se a RT-PCR tem indicado que a viremia pode ser detectada em poucos dias de exposição ao vírus, muitas semanas antes dos primeiros sinais de elevação das transaminases e dos níveis de anticorpos poderem ser detectados pelos testes de ELISA convencionais (HOUGHTON e cols., 1991). A técnica de RT-PCR se constitui também numa valiosa ferramenta para monitorar a eficiência de terapias antivirais além de pode ser usada para o diagnóstico da infecção pelo VHC em pacientes com hepatite crônica NANB criptogênica (WEINER e cols., 1990). Também, a RT-PCR permite identificar casos infectados por via vertical de mães infectadas cronicamente (THALER e cols., 1991).

Apesar do elevado custo e da difícil padronização (ZAAIJER e cols., 1993), produz bons resultados necessitando apenas de cuidados afim de evitar contaminação das amostras e dos reagentes (KWOK & HIGUCHI, 1989). Nesta linha, a simplificação nas diversas etapas da técnica devem ser consideradas. Para NOLTE e cols. (1994), a otimização de qualquer técnica de detecção do VHC-RNA depende fundamentalmente do método empregado para sua extração. Em seu trabalho, foram avaliados alguns dos métodos de isolamento de RNA vendidos comercialmente demonstrando variações consideráveis. Recentemente, SCHMIDT e cols. (1997a) desenvolveram uma técnica mais rápida e prática para o isolamento de ácidos nucleicos, diretamente do sangue total, através da desnaturação da amostra e imediata filtração em uma resina catiônica. Neste trabalho ele ainda compara a



sensibilidade da técnica de detecção do VHC-RNA no soro e no sangue total, tendo conseguido melhores resultados na análise com o sangue.

NOLTE e cols. (1995) avaliaram o teste AMPLICOR (Roche Molecular Systems) que propõe tanto a transcrição quanto a amplificação acopladas em um único tubo. Este método utiliza-se da Tth DNA polimerase (extraída da bactéria *Thermus thermophilus*) que pode ser modulada a atuar como transcriptase reversa na presença de manganês.

Um outro aspecto a ser considerado na realização da RT-PCR para detecção do VHC-RNA diz respeito ao cuidado na seleção dos *primers*. Diante da grande variação genômica apresentada pelo VHC, a PCR requer a seleção de *primers* adequados escolhidos de regiões bem conservadas objetivando garantir uma boa sensibilidade à técnica (KANEKO e cols., 1990). Além disso, GARSON e cols. (1991) alertam para a necessidade da realização da PCR com produtos pequenos para melhorar os resultados da reação.

Apesar de todas as considerações e inovações apresentadas, a detecção do VHC-RNA ainda não está perfeitamente adaptada a rotina diagnóstica da maioria dos laboratórios de análises clínicas. Espera-se que no futuro estas técnicas estejam cada vez mais acessíveis e práticas de maneira que a detecção do VHC-RNA se torne rotina para a avaliação de pacientes com esta infecção.

### 2.3.5 Genotipagem

As técnicas descritas até o momento, para a genotipagem do VHC, se equívalem em sensibilidade (LAU e cols., 1996). Dentre as mais empregadas, destacamos: a amplificação genômica e seqüenciamento, PCR com *primers* genótipo-específico (OKAMOTO e cols., 1992; 1993), RFLP de amplicons de PCR (DAVIDSON e cols., 1995; MELLOR e cols., 1996; NAKAO e cols., 1991) e, mais recentemente, a hibridização diferencial (LiPA) (STUYVER e col., 1993). Destes, a amplificação genômica e

seqüenciamento, seguindo pela comparação das seqüências e construção da árvore filogenética, é considerada o padrão-ouro (OHNO & LAU, 1996). Contudo, com a necessidade cada vez maior da tipagem genômica, tem-se evitado este procedimento por ser dispendioso, requerer pessoal de alta qualidade técnica e necessitar de um grande número de amostras. Além disso, múltiplos clones devem ser isolados para se determinar se um paciente tem uma superinfecção por diferentes genótipos.

### 2.3.6 Quantificação

Três técnicas são usualmente empregados para este propósito: a PCR competitivo, o teste bDNA (Quantiflex VHC RNA, Chiron Corp., Emeryville, Califórnia) e o teste de dosagem do antígeno do core. A técnica baseada na PCR competitivo consiste em avaliar a amplificação do VHC-cDNA comparando-se com um controle interno na PCR. A 5' NCR tem sido a mais utilizada por ser bastante conservada entre os diversos genótipos. Entretanto, a eficiência da PCR é dependente de inúmeros fatores. Entre eles inclui-se a seqüência dos *primers*, o tamanho da seqüência que está sendo amplificada, impurezas na amostra e o efeito de platô gerado quando os reagentes estão sendo consumidos. Todavia, pesquisadores têm considerado a PCR competitivo adequado quando utilizam-se *primers* desenhados da 5' NCR e padrões internos co-amplificados para avaliar a eficiência e impurezas que possam inibir a PCR.

O teste de bDNA baseia-se numa PCR com *primers* "ramificados". O produto da PCR é hibridizado com sondas marcadas com biotina que reagem especificamente com o conjugado avidina-fosfatase alcalina sendo o sistema revelado pela adição de um substrato cromógeno da enzima. Considera-se que a intensidade de cor seja proporcional à quantidade inicial de VHC-RNA presente na amostra. GRETCH e cols. (1995) avaliaram o desempenho da PCR quantitativo competitivo frente ao teste de bDNA versão 1.0, além da aplicabilidade

desses testes no acompanhamento da carga virêmica entre quatro grupos diferentes de pacientes. Foram analisados doadores de sangue, pacientes atendidos clinicamente com graus variados de hepatite, pacientes sob diálise renal e receptores de transplante de fígado infectados pelo VHC. Entre os resultados, foi demonstrado que a PCR quantitativo competitivo é extremamente mais sensível do que o teste de bDNA, além de apresentar uma faixa maior de detecção. Em amostras com baixos títulos do VHC-RNA, o teste de bDNA apresentou uma sensibilidade de apenas 5 %. Os resultados comparados entre os testes demonstrou que, em média, os títulos do VHC-RNA foram 12 vezes maiores na PCR quantitativo competitivo do que no teste de bDNA. Desta forma, em amostras de pacientes sob tratamento com antivirais, onde os níveis de VHC-RNA são extremamente baixos, deve-se optar pela utilização da PCR quantitativo competitivo como teste comprobatório.

Além disso, segundo LAU e cols. (1995a) a versão 1.0 do teste de bDNA também apresentou uma discrepância na detecção conforme o genótipo do VHC. O teste media corretamente os genótipos 1, 4, 5 e 6 todavia subestimava em 3 vezes a carga viral no 2 e de duas vezes no genótipo 3. Segundo DETMER e cols. (1996) a versão 2.0 do kit já é capaz de corrigir esta imperfeição além de ampliar a sensibilidade. Segundo os autores o limite de detecção do kit 2.0 é de 0,2 mEq VHC-RNA/ml a mais de 120 mEq VHC-RNA/ml o que assegura uma sensibilidade de 96 % e uma especificidade de mais de 95 %.

Por fim, o teste de dosagem direta do antígeno do core no soro baseia-se na concentração de partículas virais e posterior ruptura delas para liberação do antígeno. Sua sensibilidade é equivalente à do teste bDNA. Esta técnica ainda requer maiores investigações.

### 3 OBJETIVO

---

- Padronizar a técnica da RT-PCR para o diagnóstico e genotipagem do VHC em nosso meio, afim de:
  - Verificar a positividade do VHC-RNA em portadores do anticorpo anti-VHC e
  - Determinar os genótipos do VHC nas amostras VHC-RNA positivos encontradas.

## 4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

---

A hepatite pelo VHC constitui-se em um dos mais importantes problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo uma das principais causas de doença no fígado em adultos levando a uma infecção persistente de longo curso. Dados preliminares consolidados pela FNS em 1996 demonstram que 2,8 % das hepatites agudas no país foram atribuídas ao VHC. Apesar deste número ser pequeno comparado com os da hepatite pelo VHA e pelo VHB, pode-se dizer que a hepatite pelo VHC é uma epidemia silenciosa com números crescentes de casos. Os aspectos que apoiam esta afirmação são a sua freqüência mundial e seu alto potencial de cronificação. A infecção pelo VHC atinge cerca de 90 % dos portadores NANB e 50 a 80 % apresentam risco de desenvolver hepatite crônica com grau variado, evolução para a cirrose e, posteriormente, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Atualmente, o diagnóstico para a infecção pelo VHC deve se basear, não somente no achado de sorologia positiva para o anticorpo anti-VHC, mas também na positividade do VHC-RNA, pois a pesquisa dos anticorpos não permite diferenciar entre uma infecção pregressa ou atual. Com o uso de drogas antivirais de elevado custo e de difícil obtenção, a detecção do VHC-RNA nos pacientes portadores do anti-VHC tem sido recomendada para a indicação dos casos realmente virêmicos ao tratamento.

Também, a genotipagem tem permitido estabelecer associações valiosas entre os diversos genótipos do VHC e sua forma de transmissão, aspectos clínicos e da resposta terapêutica. Desta forma, o conhecimento dos genótipos podem determinar o prognóstico dos pacientes. Além disso, o conhecimento da heterogeneidade do VHC aponta para pesquisas na produção de uma vacina polivalente, capaz de neutralizar os diversos genótipos do VHC.

Pelas razões expostas acima, a padronização de técnicas moleculares baseadas no RT-PCR são imprescindíveis, não somente para a confirmação do diagnóstico sorológico,

como também para a genotipagem do VHC-RNA. Desta maneira, poderemos entender um pouco mais sobre a epidemiologia local do VHC, bem como, fornecer critérios científicos que possam guiar o sistema de saúde para um melhor aproveitamento dos recursos despendidos nas terapias virais em prática no momento.

## 5 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

---

### 5.1 PARTICIPANTES

Os 127 participantes deste estudo foram selecionados sucessivamente durante o atendimento no Serviço de Hepatologia do HUPES-UFBA, entre maio e setembro de 1997. Todos preencheram os critérios de inclusão e exclusão dispostos abaixo. O desenho do estudo demonstrando a etapa de seleção dos participantes e as perdas está descrito em 5.1.3.

#### 5.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo apenas indivíduos que procuram o HUPES-UFBA, com suspeita clínica de hepatite viral C, confirmada pelo resultado positivo para o anti-VHC pelo método de ELISA de 2<sup>a</sup>/3<sup>a</sup> geração.

#### 5.1.2 Critérios de exclusão

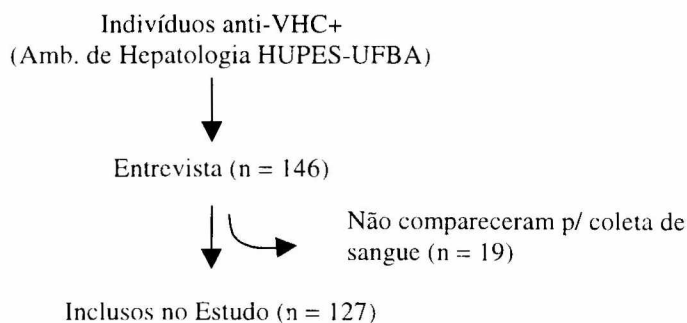
Foram excluídos, sem nenhum ônus para o seu acompanhamento ambulatorial, os indivíduos que, por vontade própria, (1) decidiram se afastar do estudo, (2) não foram entrevistados ou (3) não realizaram a coleta de sangue para os ensaios moleculares (vide Anexos I e II, termo de consentimento e ficha de cadastramento, respectivamente), além dos indivíduos com suspeita de infecção mista.

#### 5.1.3 Desenho do estudo

Dos indivíduos selecionados para o estudo (Figura 3), apenas 65 apresentaram resultados das transaminases séricas TGO/TGP, com 3 dosagens bimensais, durante os primeiros 6 meses da admissão no serviço. A fim de verificar a associação entre a

positividade do VHC-RNA e do perfil das transaminases, adotou-se o critério de transaminases alteradas quando o título de qualquer das três dosagens ultrapassou aos valores de referência (VR TGO: até 46 UI/l; VR TGP: até 50 UI/l).

Figura 3. Desenho do estudo.



## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Coleta dos dados e amostras

Todos os participantes do estudo forneceram consentimento pós-informação mediante a assinatura do Termo de Consentimento Pós-informação (Anexo I), responderam à ficha de cadastramento e forneceram amostra de sangue para os ensaios moleculares. Os dados laboratoriais foram obtidos a partir da consulta dos prontuários. Os indivíduos novos encaminhados ao ambulatório foram acompanhados prospectivamente até fevereiro de 1998 para obtenção dos resultados de aminotransferases no intervalo de 6 meses da admissão.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos de sucção a vácuo não aditivados com capacidade para 15 ml. Todas as amostras foram mantidas em refrigerador por 1-2 h até o momento de sua manipulação. Posteriormente, foram centrifugadas por 15' a 2500 rpm para a obtenção o soro. O soro de cada paciente foi, imediatamente, transferido para tubos de



congelamento de 3.8 ml. Após homogeneização do soro, foram retiradas duas alíquotas iguais de 500 µl para a formação do estoque de trabalho. Todos os cuidados de biossegurança e preservação da integridade das amostras foram adotados: utilização de materiais e luvas estéreis livres de RNAses; manipulação das amostras em baixa temperatura em cubas de gelo picado. As alíquotas, seja da soroteca, seja do estoque de trabalho, foram acondicionadas e congeladas em *freezer* a -70 °C e, durante a execução dos ensaios, cada alíquota do estoque de trabalho foi descongelada no máximo 02 (duas) vezes.

Os indivíduos com amostra VHC-RNA negativos, item 5.2.2 deste trabalho, foram solicitados a realizar uma segunda coleta de sangue num intervalo variável de 1-3 meses afim de confirmarem este resultado.

### 5.2.2 Ensaio Molecular

Todos os experimentos moleculares, com exceção da genotipagem, foram inicialmente realizados no Lab. de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ) e confirmados no INSERM U271, que constitui-se num dos 16 laboratório de referência do EUROEPI. Os protocolos descritos abaixo foram atualizados conforme os protocolos utilizados no INSERM U271.

#### 5.2.2.1 Extração do VHC-RNA do soro e síntese do cDNA (RT)

Foi realizado em 4 etapas: extração, precipitação e purificação, pareamento com os *primers* inversos e transcrição reversa (RT) para a síntese do DNA complementar do VHC-RNA (VHC-cDNA).

O VHC-cDNA foi preparado em duplicata de diferentes alíquotas da mesma amostra, em experimentos separados. Durante o pareamento e transcrição reversa, foram utilizados, concomitantemente, o *primer* NC4 para o diagnóstico (Quadro 2) e o *primer* 186

NTER para a genotipagem (Quadro 3). Dessa maneira, procedemos uma única extração e transcrição para ambos os experimentos. A técnica de extração baseou-se na técnica descrita inicialmente por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987), utilizando-se de uma mistura desnaturante de fenol:tiocianato de guanidina:clorofórmio:álcool isoamílico. O protocolo empregado seguiu-se como abaixo:

a) Extração do VHC-RNA - Foram colocados 200  $\mu$ l de soro, em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml livre de RNAses e adicionados 200  $\mu$ l de fenol saturado em Tris-HCl 1 M pH 7,8, 35  $\mu$ l de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1, 80  $\mu$ l de tiocinato de guanidina/ $\beta$ -mercaptoetanol 100:1 e 70  $\mu$ l de água tratada com dietil pirocarbonato (água DEPC) (SAMBROOK e cols., 1989). Em seguida, o soro com os reagentes foram misturados por 15" em vortéx e centrifugados por 5' a 14000 rpm na temperatura ambiente para separação das fases orgânica e aquosa.

b) Precipitação e purificação do VHC-RNA - A fase aquosa sobrenadante (aproximadamente 350  $\mu$ l) foi transferida para um outro tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 700  $\mu$ l de etanol à 100 % e 30  $\mu$ l acetato de sódio 3 M pH 5,2, misturados em vortéx por 10" e incubados por 2 h a -70 °C para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após este período as amostras foram centrifugadas por 15' a 14000 rpm a 4 °C. A fase líquida foi desprezada, por inversão do tubo, tendo o cuidado para não perder o precipitado. Os ácidos nucleicos precipitados foram lavados com 1 ml de etanol à 80 % em água DEPC e centrifugado por 5' a 14000 rpm a 4 °C. A fase alcóolica foi desprezada por inversão do tubo como anteriormente. Na segunda lavagem foi utilizado etanol à 100 % para facilitar na etapa de secagem que foi realizada mantendo-se os tubo abertos emborcados sobre uma superfície absorvente por 15'.

c) Pareamento com os *primers* inversos - Foi realizado após a diluição do precipitado em 7,5  $\mu$ l de água DEPC, adição de 0,5  $\mu$ l de inibidor de RNase 40 U/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l do

*primer* 186 NTER 50 pmoles/ $\mu$ l e 1  $\mu$ l do *primer* NC4 50 pmoles/ $\mu$ l e pré-hibridização por 10' a 70 °C.

d) Transcrição reversa - Foi realizada após adição de 0,7  $\mu$ l de inibidor de RNase 40 U/ $\mu$ l, 5  $\mu$ l do tampão 5X, 2,5  $\mu$ l dNTPs 10 mM, 2,5  $\mu$ l de DTT 0,1 M e 0,7  $\mu$ l de transcriptase reversa MMLV 200 U/ $\mu$ l à 42 °C por 1 h. Finalmente, a desnaturação da enzima transcriptase reversa foi realizada através do aquecimento a 95°C por 10'.

Durante a fase inicial de padronização das técnicas moleculares, 12 soros-padrões, 3 negativos e 9 positivos com carga viral variando entre  $0,2 \times 10^6$  a  $4,4 \times 10^6$  moléculas de VHC-RNA/ml. foram testados. Estes soros também foram utilizados como controles positivos e negativos para a extração, a PCR e a análise pela técnica de *Southern blot*.

#### 5.2.2.2 Amplificação do VHC-cDNA (PCR)

Esta técnica foi padronizada em nosso laboratório conforme descrito abaixo. A composição dos *primers* e da sonda específicos à 5' NCR utilizados encontram-se demonstrados abaixo no Quadro 2.

Quadro 2. Seqüência dos nucleotídeos dos *primers* e da sonda para a detecção do VHC-RNA.

<i>Primers e sonda</i> 5' NCR	Seqüência 5'-3'	Sentido (posição dos nucleotídeos)*
NC3	CCT GTG AGG AAC TAC TGT CTT CAC GCA	direto (35-61)
NC4	ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG CAG TAC	inverso (277-303)
sonda A89	CCA TAG TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA	(129-158)

Notas: Os nucleotídeos (nt.) foram numerados a partir da terminação 5' NCR do VHC. Os *primers* NC3 (n-PCR1) e NC4 (n-PCR2) foram descritos por LI e cols. (1995), no entretanto, o *primer* NC3 difere ligeiramente do n-PCR1 pelo deslocamento de uma base no sentido 5'-3' que produz a retirada de uma 5' C e acréscimo de uma 3' A. enquanto o NC4 é absolutamente idêntico.

Em cada tubo para a PCR foram adicionados 45  $\mu$ l de RM (33,9  $\mu$ l de água DEPC, 5,0  $\mu$ l do tampão 10X, 1  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 1,0  $\mu$ l do *primer* NC3 50 pmoles/ $\mu$ l, 1,0

$\mu\text{l}$  do *primer* NC4 50 pmoles/ $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$  de cloreto de magnésio 25 mM e 0,1  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerase 5 U/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  do produto da transcrição reversa (cDNA) e 70  $\mu\text{l}$  de óleo mineral. A reação foi realizado conforme o seguinte programa de temperaturas: 94 °C por 3 ' ; 45 ciclos de: 94 °C por 45 " , 64 °C por 45 " e 72 °C por 1 ' ; 72 °C por 10 ' . Após o término da reação os produtos amplificados foram mantidos a 4 °C até análise em gel de agarose.

### 5.2.2.3 Southern blot

A técnica de *Southern blot* foi utilizada para a confirmação do resultado das PCR de detecção do VHC-RNA. A sensibilidade desta técnica foi comparada contra os resultados ao transiluminador em um protocolo de hibridização com sonda marcada com biotina e com  $^{32}\text{P}$  (Figura 4). Os protocolos de transferência e hibridização adotados foram realizados como descrito a seguir:

a) Transferência e fixação do DNA na membrana - Imediatamente após a visualização dos resultados ao transiluminador e registro fotográfico, o DNA foi desnaturado e transferido para uma membrana de nylon tipo Hybond (Amersham) em um aparato para *Southern blot* com uso de uma solução alcalina de hidróxido de sódio 0,4 M durante a noite. Após a transferência a membrana foi posta para secar à temperatura ambiente (nesta etapa era possível guardar a membrana no refrigerador em plástico selado para posterior pré-hibridização).

b) Hibridização com a sonda biotilada - As membranas foram lavadas com SSC 2X e incubada por 2 h a 80 °C em forno a vácuo. A pré-hibridização foi realizada, sob agitação, por 1 h a 42 °C em SSC 6X, solução de Denhardt 5X, SDS à 0,5 % (tampão de hibridização). Posteriormente, os oligonucleotídeos biotilados foram adicionados ao tampão de hibridização na concentração final de 10 pmoles/ml e a hibridização foi realizada, sob agitação, por 12 h a 42 °C. As soluções de lavagem foram pré-aquecidas a 42 °C. As lavagens

foram realizadas a 51 °C, uma única vez com SSC 2X/SDS à 0,1 % por 15', e duas vezes com SSC 0,5 X/SDS à 0,1 % pelo mesmo período de tempo. As membranas foram bloqueadas com o agente bloqueador do kit ECL diluído 1:20 no tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 / NaCl 0,15 (tampão 1), sob agitação, por 30' à temperatura ambiente e incubadas com o conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina diluída na concentração de 1 µg/ml no mesmo tampão, sob agitação, por 1 h. As membranas foram lavadas à temperatura ambiente, duas vezes em Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 / NaCl 0,4 M (tampão 2) por 15' cada e uma única vez em Tris-0,1 M pH 9,5/NaCl 0,1 M/MgCl<sub>2</sub> 50 mM (tampão 3) por 10', desprezando-se as soluções em seguida. Finalmente, as membranas foram colocadas em repouso, em ambiente escuro, numa cuba contendo NBT / BCIP do kit Gibco diluído 1:5 no tampão 3 suficiente para cobrir a membrana por 30-60' para revelação (se necessário foi aguardado período maior, conforme o sinal e o *background* obtidos). Para parar a reação foi adicionado Tris-HCl 20 mM pH 7,5 / EDTA 0,5 M.

c) Hibridização com a sonda marcada com <sup>32</sup>P - As membranas foram pré-hibridizadas em SSC 6X, solução de Denhardt 10X, SDS à 0,2 % e DNA de esperma de salmão 1 µg/ml a 42 °C por 1 h. A sonda foi preparada conforme o protocolo de marcação de DNA do kit Boehringer. A hibridização foi realizada, sem agitação, a 42 °C por 5-24 h em SSC 6X, SDS à 0,2 %, DNA de esperma de salmão 1 µg/ml e a sonda marcada 100 µg/ml. Após a hibridização a membrana foi lavada, duas vezes em SSC 2X e SDS à 0,1 % a 42 °C por 10' e uma vez em SSC 1X e SDS à 0,1 % a 42 °C por 10'. A membrana foi secada sobre um papel de filtro (Whatmann) e após revestimento com um filme plástico foi mantida em um cassete para revelação com a chapa autoradiográfica a -80 °C por 12 h e revelada conforme instrução do fabricante.

#### 5.2.2.4 Genotipagem (*nested* RT-PCR)

As amostras de VHC-RNA positivas (item 5.2.3 a 5.2.5) foram submetida a uma PCR de dois passos (aninhados, do inglês *nested*) semelhante ao descrito por OKAMOTO e cols. (1992; 1993). Optamos por utilizar os *primers* descritos mais recentemente por INCHAUSPÉ e cols. (1996) por terem sido desenhados para variantes ocidentais (vide discussão). Todos os *primers* utilizados foram deduzidos da região do gene que codifica o core do VHC (Quadro 3).

Quadro 3. Sequência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados para a genotipagem do VHC.

<i>Primers</i> core		Sequência 5'-3'	Sentido (posição dos nucleotídeos)*
1º PCR	256	CGC GCG ACT AGG AAG ACT TC	direto (480-499)
	186 NTER	ATA GAG AAA GAG CAA CCG GG	inverso (849-868)
2º PCR	104	AGG AAG ACT TCC GAG CGG TC	direto (489-508)
	104 IIa	AGG AAG ACT TCG GAG CGG TC	direto (489-508)
	104 IIIa	CGT AAA ACT TCT GAA CGG TC	direto (489-508)
	104 IVa	CGA AAG ACT TCG GAG CGG TC	direto (489-508)
	132 Nbis	GCA GCC CTC ATT GCC ATA	inverso (597-614)
	133 Nbis	GCC ATC CTG CCC ACC CCA TG	inverso (611-630)
	134 Nbis1	ACT TGC CAG TGG AGC GCC G	inverso (546-564)
	134 Nbis2	ATT TGC CAG TGG AGC GCC G	inverso (546-564)
	339 Nbis	GCT GAG CCC AGG ACC GGC CT	inverso (557-576)
	465	TCC CGT CCT CCA CAG CCC TG	inverso (806-825)

Nota: Os nucleotídeos (nt.) estão numerados a partir do ORF (*open reading frame*) do VHC.

Para a 1ª PCR foram preparados tubos contendo 45 µl de RM1 (33,9 µl de água DEPC, 5,0 µl do tampão 10X, 1 µl de dNTP 10 mM, 1,0 µl do *primer* 256 50 pmoles/µl, 1,0 µl do *primer* 186 NTER 50 pmoles/µl, 3 µl de cloreto de magnésio 25 mM e 0,1 µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl), 5 µl de VHC-cDNA e 70 µl de óleo mineral. Esta 1ª PCR foi realizado sob condições estridentes conforme o seguinte programa de temperaturas: 94 °C por 5'; 40 ciclos de: 94 °C por 1', 55 °C por 1'30" e 72 °C por 2'; 72 °C por 10'. Após o término da 1ª reação os tubos foram mantidos a 4 °C até a execução da 2ª PCR. A 2ª PCR foi

realizado com 2-5  $\mu\text{l}$  do produto da 1<sup>a</sup> PCR com uma mistura de *primers* diretos (104/104IIa/104IIIa/104IVa) e inversos (132Nbis/133Nbis/134Nbis1/134Nbis2/339N/465). Para a 2<sup>a</sup> PCR foram preparados tubos contendo 45  $\mu\text{l}$  de RM2 (25,9  $\mu\text{l}$  de água DEPC, 5,0  $\mu\text{l}$  do tampão 10X, 1  $\mu\text{l}$  de dNTP 10 mM, 1,0  $\mu\text{l}$  de cada *primer* direto 50 pmoles/ $\mu\text{l}$ , 1,0  $\mu\text{l}$  de cada *primer* inverso 50 pmoles/ $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$  de cloreto de magnésio 25 mM e 0,1  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerase 5 U/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  do produto da 1<sup>a</sup> PCR e 70  $\mu\text{l}$  de óleo mineral. A PCR foi também realizado sob condições estridentes, conforme o seguinte programa de temperaturas: 94 °C por 5'; 35 ciclos de: 94 °C por 1', 63 °C por 1' e 72 °C por 1'30"; 72 °C por 10'. Após o término da reação os tubos foram mantidos a 4 °C até análise dos produtos da PCR.

#### 5.2.2.5 Análise dos produtos das PCR

Os produtos das PCR (item 5.2.4 e 5.2.6) foram analisados contra luz ultravioleta (UV) após migração em gel de agarose à 3 % (1,5 % agarose + 1,5 % Nuseieve agarose) e coloração com brometo de etídio. Os resultados positivos durante a detecção do VHC-RNA apresentaram produto de 268 pares de base (pb). Para a genotipagem, os tipos 1a, 1b, 2, 3a e 4 foram identificados pelos produtos genótipo-específicos descritos na Quadro 4.

Quadro 4. Combinações dos *primers*, tamanhos esperados dos produtos e tipos/subtipos correspondentes.

Combinação dos <i>primers</i>	Tamanho dos produtos	Tipo/subtipo
104/132Nbis	125 pb	1a
104/133Nbis	141 pb	1b
104IIa/134Nbis1-2	75 pb	2
104IIIa/339Nbis	87 pb	3a
104IVa/465	336 pb	4

Nota: Os genótipos 5 e 6 não são detectáveis por esta técnica.

Os tamanhos dos produtos das PCR foram estimados pela comparação da mobilidade relativa contra o marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA/Hae III *Fragments* (Life Technologies) ou *Ladder* 1000 pb.

### 5.2.3 Análises estatísticas

A criação dos bancos de dados e as análises estatísticas foram realizadas com *software* EPI Info v.6.02 de out./94, distribuído gratuitamente pelo CDC-EUA e pela OMS. Para as comparações de proporções foi utilizado o teste não-paramétrico de chi-quadrado ( $\chi^2$ ) corrigido por Yates, cálculo do *Odds Ratio* e intervalos de confiança de 95 % pelo método Cornfield, ou o teste de Fisher quando recomendado. Para as comparações de médias optamos pela utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis H. Em ambas situações um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

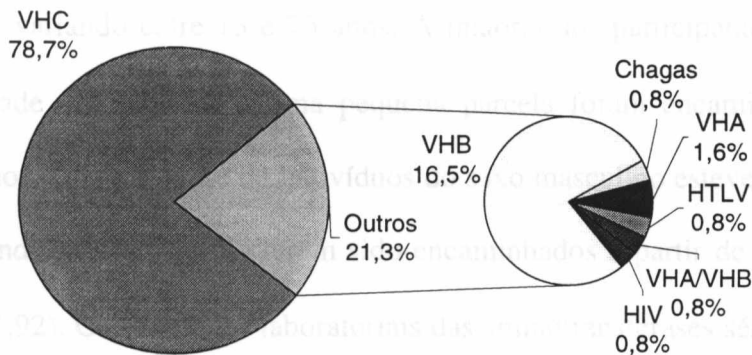


## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS PARTICIPANTES

Cento e quarenta e seis indivíduos com suspeita clínico-laboratorial de hepatite viral provocada pelo VHC foram inicialmente entrevistados. Destes, apenas 87,0 % (127/146) cumpriram todos os critérios de inclusão: 13,0 % (19/146) foram excluídos por não comparecerem para a coleta da amostra de sangue. Alguns dos participantes, 18,5 % (27/146), apresentavam informações sobre outras infecções concomitantes (21 casos com VHB, 2 com VHA, 1 com VHA e VHB simultaneamente, 1 com doença de Chagas, 1 com HTLV e 1 com HIV). A associação VHC/VHB foi a mais freqüente nesta população atingindo cerca de 16,5 % (21/127) dos casos. Somente 0,8 % (1/127) apresentaram associação VHC/HIV (Gráfico 1).

Gráfico 1. Outras infecções detectadas entre os portadores do anti-VHC (n = 127).



Na Tabela 1 são descritas as características demográficas e laboratoriais TGO/TGP dos participantes.

Tabela 1. Características da população estudada.

Características	Totais (n = 127)
Idade, média anos $\pm 1\sigma$	40,6 $\pm$ 10,8
Amplitude etária, anos	13 — 75
Sexo, razão masc.:fem. (%)	98:29 (77,2)
Residência em Salvador, %	81,9
Forma de encaminhamento, %	
banco de sangue	57,1
demanda espontânea	42,9
Seguimento de 6 meses de TGO, % <sup>(1)</sup>	
persistentemente normais	18,5
com alterações	81,5
Seguimento de 6 meses de TGP, % <sup>(1)</sup>	
persistentemente normais	21,5
com alterações	78,5

Nota: Características na data de admissão ao serviço.

(1) Apenas 65 participantes apresentaram informações completas sobre o perfil das transaminases séricas.

Há um nítido predomínio de indivíduos do sexo masculino, 77,2 %, média etária de 40,6  $\pm$  10,8 anos, variando entre 13 e 75 anos. A maioria dos participantes, 81,5 %, foram residentes da cidade do Salvador e uma pequena parcela foram encaminhados de outros municípios vizinhos. O predomínio de indivíduos do sexo masculino esteve associado ao fato de a maioria dos indivíduos (57,1 %) terem sido encaminhados a partir de bancos de sangue ( $p < 10^{-3}$ ;  $\chi^2 = 11,92$ ). Os resultados laboratoriais das aminotransferases séricas TGO e TGP, seguidos nos 6 primeiros meses da admissão no serviço apresentaram-se alterados em 81,5 % e 78,5 % dos participantes, respectivamente.

## 6.2 PADRONIZAÇÃO E RESULTADOS DOS ENSAIOS MOLECULARES

### 6.2.1 Detecção do VHC-RNA

A análise da Tabela 2 permite determinar a sensibilidade inicial em torno de 67 % (6/9) e especificidade em 100 % (3/3) a partir do teste dos soros-padrões. O nível de detecção mínima conforme a carga viral foi de  $0,4 \times 10^6$  moléculas de VHC-RNA/ml, muito próximo do limite investigado. Vale ressaltar que estes resultados foram obtidos com os protocolos não otimizados, numa etapa inicial da padronização na FIOCRUZ.

Tabela 2. Resultados preliminares na detecção do VHC-RNA em soros-padrões.

VHC-RNA	Soros-padrões		Totais
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	0	6
Negativo	3	3	6
Totais	9	3	12

Algumas tentativas com a concentração e diluição dos soros-padrões foram suficientes para atingirmos 100 % de sensibilidade. Consecutivamente, parte das amostras coletadas até setembro/98, 83,7 % (103/123), foram testada na FIOCRUZ utilizando-se o mesmo protocolo aplicado aos soros-padrões. Posteriormente, durante o estágio no INSERM U271, promovemos mudanças definitivas nos protocolos (descritos em Métodos) e reavaliamos todos os resultados. Os resultados comparados obtidos por centro de pesquisas encontram-se sumarizados na Tabela 3. A positividade geral das amostras no INSERM U271 atingiu 67,5 % (83/123), superior à encontrada na FIOCRUZ, 50,5 % (52/103). Dezoito amostras negativas na FIOCRUZ positivaram no INSERM U271 porém nenhuma amostra negativa no INSERM U271 foi positiva na FIOCRUZ (especificidade de 100 %). A coincidência de resultados entre FIOCRUZ e INSERM U271 foi de 82,5 % (85/103). Vinte

amostras sem resultados prévios na FIOCRUZ foram testadas somente no INSERM U271 com 65,0 % (13/20) de positividade para o VHC-RNA.


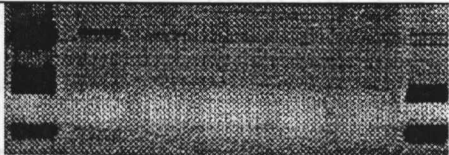
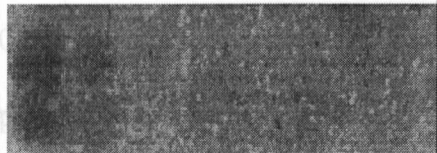
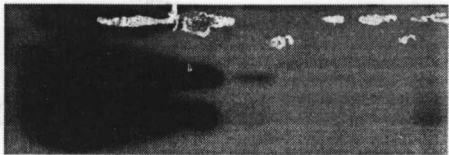
Tabela 3. Resultados na detecção do VHC-RNA conforme o Centro de Pesquisas.

Resultados FIOCRUZ	Resultados INSERM U271 VHC-RNA		Totais <sup>(1)</sup>
	positivas	negativo	
VHC-RNA positivo	52	0	52 (50,5 %)
negativo	18	33	51 (49,5 %)
Sem resultados prévios	13	7	20 (-)
<b>Totais</b>	<b>83 (67,5 %)</b>	<b>40 (32,5 %)</b>	<b>123</b>

(1) Quatro amostras não foram testadas no INSERM U271, todavia seus resultados foram obtidos após implantação do protocolo definitivo na FIOCRUZ (todas VHC-RNA negativas).

A eficiência da técnica de *Southern blot*, utilizada para confirmação do produto das PCR, foi avaliada utilizando-se duas séries de diluições (fator de diluição =  $10^{-1}$ ) de amostras fortemente reativas (Figura 4). A técnica empregando sonda marcada com  $^{32}\text{P}$  apresentou uma sensibilidade 10 vezes superior. Todavia, nenhuma amostra PCR-positiva foi *Southern blot*-negativa por qualquer das técnicas de hibridização.

Figura 4. Sensibilidade do *Southern blot* utilizando-se sonda biotilada ou sonda marcada com  $^{32}\text{P}$ .

Fator de diluição ( $10^{-x}$ )	Sondas													
	Biotina								$^{32}\text{P}$					
	0	1	2	3	4	5	*	0	1	2	3	4	5	*
Eletrforese em gel de agarose														
<i>Southern blot</i>														

\* Controle negativo.

Na Tabela 4 é descrita a associação entre a positividade do VHC-RNA e alterações das aminotransferases TGO e TGP. A positividade do VHC-RNA foi significativamente maior tanto nos casos com alterações nos níveis séricos de TGO quanto nos casos com alterações de TGP.

Tabela 4. Correlação entre a positividade do VHC-RNA e alterações nos níveis de TGO/TGP seguidos por 6 meses (n = 65).

Níveis das aminotransferases séricas	Nº. de participantes (%)	Positividade do VHC-RNA, %	Valor de p
Seguimento de 6 meses de TGO <sup>(1)</sup>			
persistentemente normal	12 (18,5)	41,7	p < 10 <sup>-2</sup>
com alterações	53 (81,5)	88,7	
Seguimento de 6 meses de TGP <sup>(1)</sup>			
persistentemente normal	14 (21,5)	57,1	p = 0,03
com alterações	51 (78,5)	86,3	

Nota: Valor de p calculado pelo teste de Fisher.

(1) Apenas 65 participantes apresentaram informações completas sobre o perfil das transaminases séricas.

### 6.2.2 Genotipagem

Na Figura 5 destacamos os produtos genótipo-específicos e seus respectivos pesos moleculares. Todas as 83 amostras VHC-RNA positivos foram reativas para algum dos genótipos propostos: 1a, 1b, 2, 3a e 4. Destas, 62,7 % (52/83) foram do genótipo 1, incluindo 20 (24,1 %) do subtipo 1a e 32 (38,6 %) do subtipo 1b. O genótipo 1 foi o mais freqüente no presente estudo. Três amostras (3,6 %) apresentaram genótipo 2 e o 18 (21,7 %) foram do genótipo 3, sendo todas do subtipo 3a. Dez amostras (12,0 %) apresentaram um padrão "misto" por reagirem com mais de um *primer* genótipo-específico. A associação 1a/3a foi encontrada em 9 (10,8 %) e 1a/1b em uma (1,2 %). Não foram encontradas amostra do genótipo 4. Os genótipos 5 e 6 não forma pesquisados (Gráfico 2).

Figura 5. Sequências amplificadas de diferentes genótipos e subtipos do VHC pela técnica da PCR com *primers* genótipo-específicos.

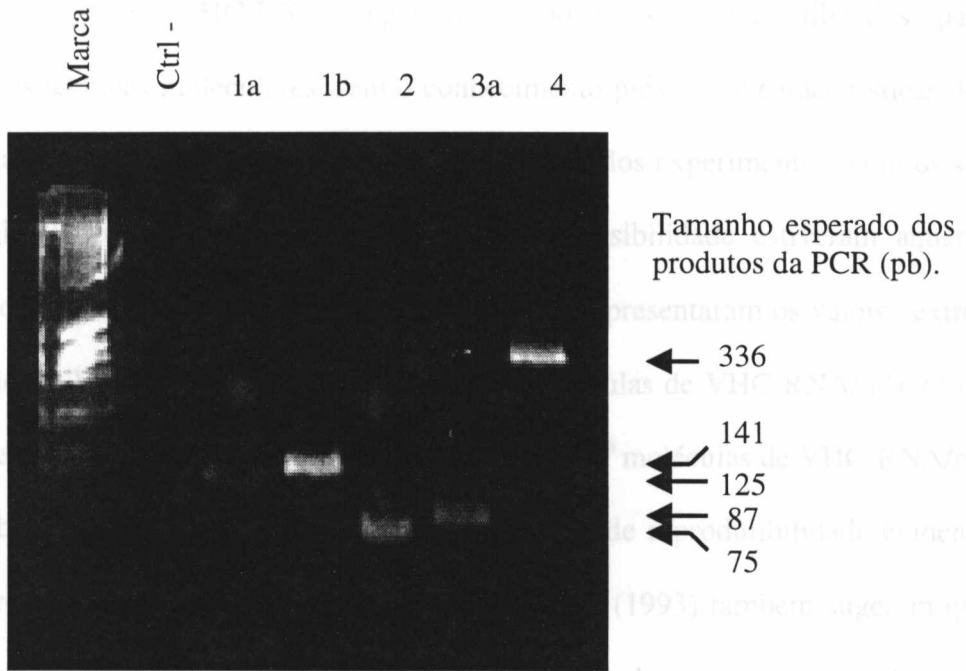
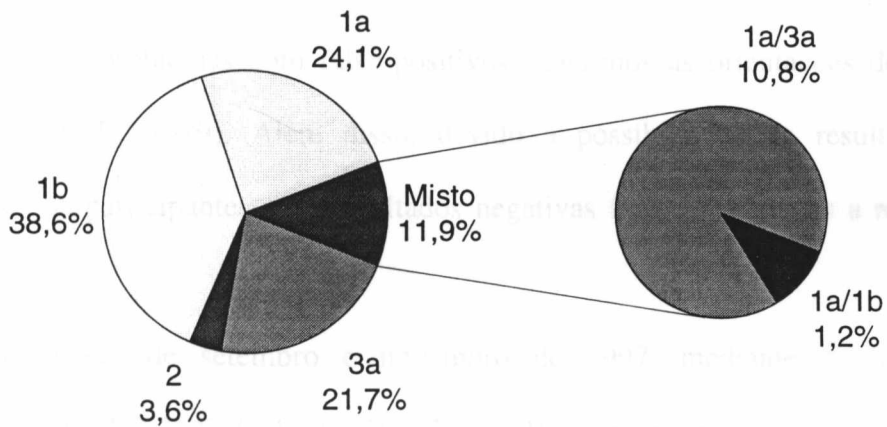


Gráfico 2. Distribuição de frequência dos subtipos do VHC entre os casos VHC-RNA positivos (n = 83).



## 7 DISCUSSÃO

---

Soros-padrões VHC-RNA negativos e positivos foram utilizados para a padronização das técnicas moleculares, sem o conhecimento prévio das características desses soros para evitar qualquer tipo de tendenciosidade. A partir dos experimentos com os soros-padrões (Tabela 2) verificamos que os resultados de sensibilidade estiveram aquém do esperado. Os soros-padrões com resultados falso-negativos apresentaram os valores extremos de concentração do VHC-RNA ( $0,2 \times 10^6$  e  $4,4 \times 10^6$  moléculas de VHC-RNA/ml). O limite mínimo de detecção do VHC-RNA nesta fase foi de  $0,4 \times 10^6$  moléculas de VHC-RNA/ml.

A baixa sensibilidade e, principalmente, a falta de reprodutibilidade evidenciam problemas na recuperação do VHC-RNA. ZAAIJER e cols. (1993) também sugerem que as condições gerais do laboratório e a seleção dos *primers* podem ser causas atribuíveis ao mesmo problema. Durante a padronização das técnicas foi constante a preocupação em se utilizar luvas estéreis para manipulação do soro, material e reagentes autoclavados e livres de RNase, água para as soluções tratadas com DEPC, manipulação do soro em baixa temperatura e armazenamento das amostras em *freezer* a  $-70$  °C. Também, apesar de não termos tido grandes problemas com falso-positivos, seguimos as orientações descritas por KWOK & HIGUCHI (1989). Além disso, devido a possibilidade de resultados falso-negativos, todos os participantes com resultados negativos foram solicitados a realizar uma nova coleta.

Nos meses de setembro e novembro de 1997, mediante o Programa de Colaboração FIOCRUZ-INSERM U271, Lyon/FRA, participamos de um estágio internacional no INSERM U271, onde todas as amostras inclusas neste estudo foram re-testadas e genotipadas. Algumas diferenças no protocolo de extração, já descritas definitivamente em métodos, foram preponderantes para justificar as diferenças entre os

resultados iniciais na FIOCRUZ e no INSERM U271: (1) o dobro do volume de soro (200 µl), (2) adição de 100 µl de água DEPC nas amostras com pouca recuperação durante a fase de extração (espessamento da fase com clorofórmio), (3) transcrição reversa imediata após a extração e, finalmente, (4) adição concomitantes dos *primers* inversos NC4 e 186 NTER.

As medidas (1) e (2), referidas no parágrafo anterior, foram suficientes para concentrar o RNA total ou evitar que componentes da própria amostra pudessem interferir na recuperação e nas etapas seguintes de purificação. A medida (3) determinou uma garantia a mais para o protocolo, pois, com a manipulação, as amostras de RNA tendem naturalmente a sofrer degradação, o que não acontece com DNA nas mesmas condições (HALFON e cols., 1996). E finalmente, a medida (4) foi implementada como um facilitador para ligar as técnicas de detecção do VHC-RNA e da genotipagem. Esta medida, além de minimizar etapas entre as duas técnicas, permitiu a realização da genotipagem imediatamente após a confirmação da amplificação pelo PCR. Comparando-se os resultados iniciais obtidos na FIOCRUZ com os obtidos no INSERM U271, a sensibilidade foi de 74,3 % (52/70), especificidade de 100 % (33/33) e uma coincidência geral de 82.5 % (85/103) (Tabela 3).

Todos os resultados da RT-PCR foram confirmados através do *Southern blot* utilizando-se sondas biotinizadas. Em nosso laboratório, optamos por utilizar este tipo de sonda, pois, como é sabido, trata-se de um reagente não radioativo, de fácil manipulação, não requer condições especiais de trabalho e apresentar baixa periculosidade. Além disso, pode ser utilizada por um longo período, sem preocupação com sua deterioração ou validade. Os resultados demonstraram que a hibridização com sonda biotinizada não melhora a sensibilidade da técnica, servindo apenas como teste confirmatório da especificidade da reação da RT-PCR. Por outro lado, a utilização de sondas marcadas com  $^{32}\text{P}$  aumentam em até 10 vezes a sensibilidade da técnica, o que permite identificar amostras positivas, mesmo em situações em que o produto da PCR não seja bem visível ao transiluminador (Figura 4). De



qualquer forma, é importante destacar que a visualização do produto da reação de PCR contra a UV após migração em gel de agarose é a melhor garantia de um diagnóstico confiável. Na rotina, todas as amostras devem ser testadas pelo menos duas vezes em experimentos diferentes, o que permite uma maior chance para a boa visualização do produto da PCR.

Das 127 amostras selecionadas para o estudo, 83 (65,4 %) foram positivas para o VHC-RNA. Estes dados são coerentes com os descritos na literatura em que mais de 50 % dos portadores do anti-VHC mantém a infecção. A presença do VHC-RNA esteve associado a alterações bioquímicas, que sugerem lesão crônica de fígado e replicação viral. Todavia, a positividade do VHC-RNA também pôde ser observada em participantes com nenhuma ou mínima alteração nos níveis de TGO ou TGP, sugerindo que nem sempre o VHC produz uma lesão citopática no fígado (LOK e cols., 1992). Nestas circunstâncias, surge uma questão ética sobre a conduta médica em biopsiar, ou não, este tipo de paciente. A determinação seriada dos níveis de aminotransferases séricas, prospectivamente, por um período mínimo de 6 meses, cursando com alterações acima dos VR, devem ser adotadas como parâmetro para se identificar uma hepatite crônica em curso, condição elegível para a biópsia (DI BISCEGLIE e cols., 1991).

Apesar do maior interesse clínico para os casos VHC-RNA positivos, é importante se discutir o significado de um teste negativo para o VHC-RNA no soro. Atualmente, resultados negativos de VHC-RNA no soro não excluem o eventual efeito da baixa carga viral e/ou a persistência do vírus em outros sítios de replicação. O soro é um veículo que carrega, principalmente, partículas solúveis e que, portanto, pode conter menos partículas virais circulantes requerendo o máximo de eficiência das técnicas de detecção do RNA viral. Alguns estudos descreveram a presença do VHC-RNA na medula óssea e células mononucleares do sangue periférico, seletivamente concentradas em células B (SCHMIDT e cols., 1997b; ZEHENDER e cols., 1997). Porém, estes reservatórios celulares não contribuem

para a detecção do VHC-RNA no soro ou plasma. SCHMIDT e cols. (1997a) desenvolveram uma técnica para extração do VHC-RNA a partir do sangue total. Seus resultados demonstraram que mesmo em participantes com hepatite criptogênica, anti-VHC negativos, o VHC-RNA esteve presente em 75 % dos casos. Este achado pode explicar porque a negatização do VHC-RNA no soro não tem sido um fator preditivo duradouro para a resposta terapêutica. Portanto, o desaparecimento do RNA viral do soro não significa cura, pois, a infecção de outros tecidos e órgãos pode ser responsável pela perda da resposta terapêutica e recidiva após o tratamento.

A amplificação genômica e o seqüenciamento, seguido da comparação das seqüências, são atualmente considerados padrão-ouro para a determinação dos genótipos do VHC, apesar de suas limitações. Primeiro, a amplificação de algumas regiões genômicas ser ineficientes e necessitar de diferentes conjuntos de *primers*. Segundo, em estudos de seqüenciamento aplicados a populações, apenas o genótipo predominante é identificado em cada paciente com infecção mista. Terceiro, quando um grande número de isolados são estudados, o identificação de alguns deles podem não ser possíveis. Finalmente esta técnica é dispendiosa e de difícil execução, dificultando sua aplicação em estudos com um número maior de participantes (OHNO e cols., 1996).

Para contornar tais problemas, foi utilizada uma técnica mais simplificada (OKAMOTO e cols., 1992; 1993). Esta técnica amplifica uma região sub-genômica do gene que codifica o core mediante dois PCR aninhado com *primers* externos genéricos e uma mistura de *primers* internos genótipo-específicos. OKAMOTO e cols. foram um dos primeiros a descrever uma técnica capaz de discriminar os tipos principais do VHC circulantes no Japão, Américas e Europa usando esta metodologia (1a, 1b, 2a, 2b e 3). Recentemente, esta técnica sofreu algumas críticas de pesquisadores americanos e europeus após comparação com outras técnicas mundialmente empregadas (GIANNINI e cols., 1995;

LAU e col., 1995b). LAU e cols. (1995b) discutem que os *primers* utilizados por OKAMOTO foram concebidos em 1991 quando os conhecimentos acerca das variações das seqüências do VHC eram limitadas e que, apesar de úteis entre pacientes japoneses, reações cruzada dos *primers* para os genótipos 1a e 1b produziam resultados menos eficientes em amostras de pacientes americanos e europeus. Em resposta, OKAMOTO e cols. (1996) reavaliaram os *primers* e estabeleceram seu método de segunda geração com uma boa capacidade de distinguir os genótipos 1a e 1b com uma especificidade pouco superior à descrita anteriormente. Todavia, seu novo método passou a requerer no segundo PCR uma amplificação separada para cada genótipo tornando-o menos prático.

INCHAUSPÉ e cols. (1996), seguindo a proposta inicial de OKAMOTO, reconstruiu os mesmos *primers* e corrigiu o problema da reação cruzada mantendo o protocolo inicial com um *nested-PCR* em um único tubo. Todavia, nesta nova técnica, não é possível distinguir os subtipos 2a e 2b, porém acrescentou-se a possibilidade de genotipar o tipo 4 do VHC. Esta modificação ampliou a aplicação da técnica para regiões geográficas onde, além dos genótipos 1, 2 e 3, o genótipo 4 pode ser encontrado.

Durante a padronização da genotipagem também foram utilizados soros-padrão referentes aos diferentes genótipos do VHC. Estes controles foram extraídos, transcritos e amplificados em uma *nested-PCR*, primeiramente, com *primers* genéricos e, posteriormente, com *primers* genótipo-específicos. Este procedimento (*nested-PCR*) garante uma melhor sensibilidade da técnica, pois facilita as reações genótipo-específicas da 2ª PCR.

Do ponto de vista da eficácia da técnica, devemos considerar que nenhuma das amostras foi não-reativa, o que significa que o teste foi capaz de detectar todos os genótipos principais encontrados em nossa população. Entre os genótipos encontrados estão os tipos 1, 2 e 3, com frequências de 62,7 %, 3,6 % e 21,7 %, respectivamente. A técnica empregada não permitiu distinguir entre os subtipos 2a e 2b (sendo, portanto, necessário considerar apenas o

tipo principal). Genótipos mistos estiveram presentes em 12,9 % das amostras, predominando a associação 1a/3a. Nenhuma amostra foi genotipada como tipo 4.

Diferentes padrões de distribuição genotípica têm sido descritos em todo o mundo. Neste estudo, o genótipo mais freqüentemente encontrado em nosso país foi o tipo 1, particularmente o subtipo 1b. Se os diferentes genótipos podem ter um influência no curso clínico da doença, isto ainda permanece uma incógnita. Para ZEIN e cols. (1996), os genótipos 1a e 1b, mais prevalentes nos EUA em pacientes crônicos, estão associados a uma maior gravidade da doença e a uma menor resposta à terapia ao IFN que o genótipo 2.

SILINI e cols. (1995), estudando uma população composta por portadores assintomáticos com níveis de TGO normais e paciente crônicos com níveis variados de TGO, relataram que o genótipo 1 esteve mais freqüente nos pacientes com TGO elevados sugerindo que este genótipo determina um pior prognóstico para a evolução clínica da doença.

Apesar de LAU e cols. (1996) não encontrarem diferenças na intensidade da doença, bem como viremia entre os genótipos 1, 2, 3 e 4, GUEN, e cols. (1997) acreditam que, além da influência do genótipo, a heterogeneidade do VHC (quasiespécies) e carga viral superior a  $35 \times 10^5$  Eq/ml são fatores associados à reincidência após o tratamento com IFN. Para GUEN, casos avançados com cirrose dificilmente curam a infecção e o genótipo 1b implica alta taxa de reincidência enquanto o genótipo 3a está associado a boa resposta ao INF-alfa.

Estas considerações apontam para a necessidade de uma maior investigação da importância destes genótipos em nosso meio, sobretudo por estarmos diante da possibilidade de termos pacientes com baixa resposta terapêutica e que pouco poderão aproveitar da aplicação de um medicamento ainda tão inacessível quanto o IFN. Por outro lado, diante da falta de um consenso internacional acerca do melhor esquema terapêutico para o tratamento

dos diferentes genótipos, é possível que a conduta padrão para todos os genótipos possa ser alterada para esquemas genótipo-relacionados.

O aparecimento de genótipos mistos em nosso estudo podem ter decorrido basicamente de três condições: ou correspondem a um novo genótipo com variações mistas no gene do core, ou são os genótipos 1 ou 3 com alterações mínimas e que permitam o pareamento com *primers* para os genótipos 1 e 3, ou, ainda, representam, verdadeiramente, co-infecções. Para avaliar estas possibilidades no futuro, pretendemos aplicar outras técnicas, ou, ainda, seqüenciar a região do core à busca de alterações, que expliquem tais erros.

Apesar de Salvador apresentar uma composição étnica bastante diferenciada do restante do país, com cerca de 80 % de indivíduos da raça negróide e com uma marcante influência da cultura africana, não se encontrou genótipos específicos freqüentes naquele continente (SIMMONDS e cols., 1993a). Na população estudada, 26,4 % relatou árvore parental exclusivamente caucazóide, 14,3 % negróide e 44,0 % mulatos com padrões de miscigenação variados (dados não apresentados). Uma análise preliminar não demonstrou qualquer diferença na distribuição genotípica destes grupos. Portanto, considerando-se a distribuição genotípica dos países Europeus, da América do Norte, países do norte da África próximo a Portugal, como Marrocos, além de outros sob influência européia com genótipos 1, 2 e 3 não seria nenhum absurdo se especular uma rota Europa-Américas para a disseminação do VHC (BENANI e cols., 1997; SMUTS & KANNEMEYER, 1995). Nesta linha, trabalhos sócio-antropológicos e médicos poderão apontar para o entendimento e estabelecimento de doenças cosmopolitas, mas que apresentam uma influência genética e racial marcantes.

Finalmente, a demonstração de que as distribuições genotípicas do VHC nas regiões Sudeste, Sul e, agora, na Bahia, são semelhantes, podem apontar para medidas de saúde pública comuns. Além disso, a implantação das técnicas de detecção e genotipagem do VHC-RNA no Brasil podem vir a contribuir com a vigilância epidemiológica, triagem

ambulatorial para o tratamento com antivirais e a adequação de testes sorológicos em implantação. Na clínica, em se confirmando a existência de uma resposta terapêutica diferenciada entre os genótipos 1, 2 e 3, sobretudo para o subtipo 1b, isto pode significar um obstáculo para o sucesso em ensaios terapêuticos com antivirais nos esquemas propostos até o momento na literatura dado que este é o genótipo predominante em nosso meio. Vale ressaltar também, que pela baixa prevalência do tipo 3 nos EUA e Japão onde a pesquisa sobre o VHC é mais intensa, poucos são os dados concernentes à resposta terapêutica a este genótipo. Neste sentido, pesquisas realizadas no Brasil poderão contribuir determinar a progressão da doença e da resposta ao tratamento nestes pacientes e também a influência de uma possível associação dos dois genótipos mais frequentes, 1 e 3.

## 8 CONCLUSÃO

---

- O presente trabalho demonstrou que a positividade do VHC-RNA no soro de portadores do anticorpo anti-VHC selecionados no Serviço de Hepatologia do HUPES-UFBA, foi de 67 % (67/100).
- Entre as amostras VHC-RNA positivas, o genótipo 1 foi o mais freqüente estando presente em 62,7 % (42/67), seguido pelos tipo, 3 em 22,4 % (15/67), tipo 2 em 3,0 % (2/67) e genótipos mistos em 11,9 % (8/67). O subtipo 1b esteve pouco mais freqüente que o tipo 1a, respectivamente, 37,3 % e 25,4 %. Entre os genótipos mistos encontrados, as seguintes associações foram freqüentes: 1a/3a em 7 (10,4 %) e 1a/1b em uma (1,5 %). Não se observou resultado positivo para o genótipo 4, bem como amostras não-reativas. Estes dados são semelhantes aos descritos na região Sudeste e Sul do país.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. AOKI, S.K.; KURAMOTO, I.K.; ANDERSON, S.; SCHOENING, V.; RODRIGUEZ, R.; FERNANDO, L.; SAZAMA, K.; HOLLAND, P.V. Evidence that use of second-generation hepatitis C antibody assay prevents additional cases of transfusion-transmitted hepatitis. **J. Viral Hepatitis**, **1**: 73-7, 1994.
2. ARBOLEDA, M.; CASTILHO, M.C.; FONSECA, J.C.; ALBUQUERQUE, B.C.; SABOIA, R.C.; YOSHIDA, C.F. Epidemiological aspects of hepatitis B and D virus infection in the northern region of Amazonas, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **89**: 481-3, 1995.
3. BASSIT, L.; VANDERBORGHT, B.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D.A.F.; SAÉZ-ALQUEZÁR, A. Anti-HCV cPCR positivity, and HCV subtypes among screening positive blood donors from São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, **27**: 98, 1994. Supl. I.
4. BASSIT, L. & SAÉZ-ALQUÉSAR, A. Genotipagem do Vírus da Hepatite C. **NewsLab**, 44-6, 1995.
5. BENANI, A. EL-TURK, J.; BENJELLOUN, S.; SEKKAT, S.; NADIFI, S.; HDA, N.; BENSLIMANE, A. HCV genotypes in Morocco. **J. Med. Virol.**, **52**: 396-8, 1997.
6. BENSABATH, G.; HADLER, S.C.; SOARES, M.P.C.; FIELDS, H.; MAYNARD, J.E. Epidemiologic and serologic study of agute viral hepatitis in Brazil's Amazon Basin. **Bull. Pan Am. Health Org.**, **21**: 16-27, 1987
7. BLIGHT, K.J.& RICE, C.M. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus. **J. Virol.**, **71**: 7345-52, 1997.
8. BRESTERS, D.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P.; REESINK, H.W.; ROOSENDAAL, G.; POEL C.L. van der; CHAMULEAU, R.A.F.M.; JANSEN, P.L.M.; WEEGINK, C.J.; CUYPERS, H.T.M.; LELIE, P.N.; BERG, H.M. van den. Sexual transmission of hepatitis C virus. **Lancet**, **342**: 210-1, 1993.
9. BORGES, M.A.J.N.A. **Transmissão passiva do anticorpo do vírus A da hepatite (anti-VHA) em Salvador - Bahia**. Salvador, 1985. 57 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1985.
10. BUKH, J.; PURCELL, R.H. & MILLER, R.H. Sequence analysis of the 5' non-coding region of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 4942-6, 1992.
11. BUKH, J.; PURCELL R.H.; MILLER, R.H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 8234-8, 1993.
12. CHA, T.-A.; BEALL, E.; IRVINE, B.; KOLBERG, J.; CHIEN, D.; KUO, G.; URDEA, M.S. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 7144-8, 1992.



13. CHAMBERLAIN, R.W.; ADAMS, N.; SAEEDM A.A.; SIMMONDS, P. & ELIOTT, R.M. Complete nucleotide sequence of the type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. **J. Gen. Virol.**, **78**: 1341-7, 1997.
14. CHAN, S.-W.; McOMISH, F.; HOLMES, E.C.; DOW, R.; PEUTHEREP, J.F.; FOLLETT, E.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. Analyses of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. **J. Gen. Virol.**, **73**: 1131-41, 1992.
15. CHAN, C.-Y.; LEE, S.-D.; HWANG, S.-J.; LU, R.-H.; LU, C.-L.; LO, K.-J. Quantitative branched DNA assay and genotyping for hepatitis C virus RNA in chinese patients with acute and chronic hepatitis C. **J. Infect. Dis.**, **171**: 443-6, 1995.
16. CHO, S.W.; HWANG, S.G.; HAN, D.C.; JIN, S.Y.; LEE, M.S.; SHIM, C.S.; LEE, D.W.; LEE, H.B.. In situ detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue using a digoxigenin-labeled probe created during a polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.**, **48**: 227-33, 1996.
17. CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, **162**: 156-9, 1987.
18. CHOO, Q.-L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, **244**: 359-62, 1989.
19. CHOO, Q.-L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER, A.J.; BRADLEY, D.W.; KUO, G.; HOUGHTON, M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 2451-5, 1991.
20. CLARKE, B. Molecular virology of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.**, **78**: 2397-410, 1997.
21. COELHO, H.S.M.; FIGUEIREDO, A.F.; SEGADAS, J.A.; PANAIM, V.L.; NOGUEIRA, C.M.; SILVA, C.R.; MUSSI, T.J. Aspéctos evolutivos da hepatite C pós-transfusional: revisão de 175 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**: 295-300, 1998.
22. CORWIN, A.L.; HYAMS, K.C.; KIM, J.P.; WAGES, J.; DOSS, J.; SULAIMAN, A.; MITCHELL, B.; ARTHUR, R.; BASSILY, S.; PUNJABI, N.H.; LARAS, K.; DUC, D.D; WATTS, D. Short report: evidence of worldwide transmission of hepatitis G virus. **Am. J. Med. Hyg.**, **57**: 455-6, 1997.
23. COTRIM, H.; MOTA, E.; LEITE, L.; SILVA, L.; LYRA, L. A case-control study on the association of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in northeast Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, **26**: 301-5, 1992.

24. DAVIDSON, F.; SIMMONDS, P.; FERGUSON, J.C.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.C.; SEED, C.R.G.; KRUSIUS, T.; LIN, C.; MEDGYESI, G.A.; KIYOKAWA, H.; OLIM, G.; DURAISAMY, G.; CUYPERS, T.; SAEED, A.A.; TEO, D.; CONRADIE, J.; KEW, M.C.; NUCHAPRAYOON, C.; NDIMBIE, O.K.; YAP, P.L. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequence amplified from the 5' non-coding region. **J. Gen. Virol.**, **76**: 1197-204, 1995.
25. DETMER, J.; LAGIER, R.; FLYNN, J.; ZAYATA C.; KOLBERG, J.; COLLINS M. URDEA M.; SÁNCHEZ-PESCADOR, R. Accurate quantitation of hepatitis C virus (HCV) from all HCV genotypes by using branched-DNA technology. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 901-8, 1996.
26. DI BISCEGLIE, A.M.; GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G.; HOOFNAGLE, J.H.; MELPOLDER, J.J.; ALTER, H.J. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. **Hepatology**, **14**: 969-74, 1991.
27. DUSHEIKO, G. & SIMMONDS, P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. **J. Viral Hepatitis**, **1**: 3-15, 1994a.
28. DUSHEIKO, G.; SCHMILOVITZ-WEISS, H.; BROWN, D.; McOMISH, F.; YAP, P.-L.; SHERLOCK, S.; McINTYRE, N.; SIMMONDS, P. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. **Hepatology**, **19**: 13-8, 1994b.
29. DUSHEIKO, G.M. Genetic diversity of hepatitis C virus: implications for pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**, **345**: 562-6, 1995.
30. EDELENYI-PINTO, M.; CARVALHO, A.P.; NOGUEIRA, C.; FERREIRA-JR., O.; SCHECHTER, M. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in populations at low and high risk for sexually transmitted diseases in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**: 305-7, 1993.
31. ENOMOTO, N.; TAKADA, A.; NAKAO, T.; DATE, T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, **170**: 1021-5, 1990.
32. ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y.; KUROSAKI, M.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, C.; OGURA, Y.; IZUMI N.; MARUMO, F.; SATO, C. Mutants in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N. Engl. J. Med.**, **334**: 77-81, 1996.
33. FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; PURCELL, R.H.; ALTER, H.J.; HOLLAND, P.V. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N. Engl. J. Med.**, **292**: 767-70, 1975.
34. FÉRAY, C.; GIGOU, M.; SAMUEL, D.; PARDIS, V.; MISHIRO, S.; MAERTENS, G.; REYNÉS, M.; OKAMOTO, H.; BISMUTH, H; BRÉCHOT, C. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver. **Gastroenterology**, **108**: 1088-96, 1995.

35. GARSON, J.A.; RING, C.J.A.; TUKE, P. W. Improvement of HCV genome detection with "short" PCR products. **Lancet**, **338**: 1466-7, 1991.
36. GERIN, J.L. Hepatitis D virus. In: *Posgraduated Course of the AASLD* (ed.). 1994. p. 175-83.
37. GIANNINI, C.; THIERS, V.; NOUSBAUM, J.-B.; STUYVER, L.; MAERTENS, G.; BRÉCHOT, C. Comparative analysis of two assays for genotyping hepatitis C virus based on genotype-specific primers or probes. **J. Hepatol.**, **23**: 246-53, 1995.
38. GRETCH, D.R.; ROSA, C.; CARITHERS JR., R.L.; WILLSON, R.A.; WILLIAMS, B.; COREY, L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. **Ann. Intern. Med.**, **123**: 321-8, 1995.
39. GUADAGNINO, V.; STROFFOLINI, T.; RAPICETTA, M.; COSTANTINO, A.; KONDILI, L.A.; MENNITI-IPPOLITO, F.; CAROLEO, B.; COSTA, C.; GRIFFO, G.; LOIACONO, L.; PISANI, V.; FOCÀ, A.; PIAZZA, M. Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. **Hepatology**, **26**: 1006-11, 1997.
40. GUEN, B.; SQUADRITO, G.; NALPAS, B.; BERTHERLOT, P.; POL, STANISLAS; BRÉCHOT, C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, **25**: 1250-4, 1997.
41. HADLER, S.C.; MONZON, M.; PONZETO, A.; ANZOLA, E.; RIVERO, D.; MONDOLFI, A.; BRACHO, A.; FRANCIS, D.P.; GERBER, M.A.; THUNG, S.; GERIN, J.; MAYNNARD, J.E.; POPPER, H.; PURCELL, R.H. Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in Yucpa Indians of Venezuela. **Ann. Intern. Med.**, **100**: 339-44, 1984.
42. HADLER, S.C. Impact of hepatitis A virus infection changing patterns. In: HOLLINGER, F.B.; LEMON, S.M.; MARGOLIS, H.S. (eds.). *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p. 14-20.
43. HALFON, P.; KHIRI, H.; GEROLAMI, V.; FERYN, J.M.; REYNIER, P.; BOURLIERE, M.; CARTOUZOU, G. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. **J. Hepatol.**, **25**: 307-11, 1996.
44. HALFON, P.; OUSAN, D.; KHIRI, H.; FERYN, J.M. & Commission Hepatologie du CREGG. Serotyping and genotyping of hepatitis C virus (HCV) strains in chronic HCV infection. **J. Med. Virol.**, **52**: 391-5, 1997.
45. HALLAM, N.F.; FLETCHER, M.L.; READ, S.J.; MAJID, A.M.; KURTZ, J.B.; RIZZA, C.R. Low risk of sexual transmission of hepatitis C virus. **J. Med. Virol.**, **40**: 251-253, 1993.

46. HAN, J.H.; SHYMALA, V.; RICHMAN K.H.; BRAUER, M.J.; IRVINE, B.; URDEA, M.S.; TEKAMP-OLSON, P.; KUO, G.; CHOO, Q.-L.; HOUGHTON, M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral C RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 1711-5, 1991.
47. HOUGHTON, M.; WEINER, A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q.-L. Molecular Biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, **14**: 381-8, 1991.
48. INCHAUSPÉ, G.; BERBY, F.; CORTEY, M.-L.; TRADAUD, M.-A.; CHOSSEGROS, P.; NÉGRIER, C.; TRÉPO, C. Performance of three genotyping assays evaluated in different hepatic C infected risk groups. **J. Med. Virol.**, 1996. In press.
49. KANDA, T.; YOKOSUKA, O.; EHATA, T.; MARU, Y.; IMAZEKI, F.; SAISHO H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. **Hepatology**, **25**: 1261-5, 1997.
50. KANEKO, S.; UNOURA, M.; KOBAYASHI, K.; KUNO, K; MURAKAMI, S.; HATTORI, N. Detection of serum hepatitis C virus RNA. **Lancet**, **335**: 976, 1990.
51. KAO, J.H.; CHEN, P.J.; LAI, M.Y.; WANG, T.H. & CHEN, D.S. Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. **J. Infect. Dis.**, **172**: 261-4, 1995.
52. KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SUGIMIRO, T. & SHIMOTOHNO, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 9524-8, 1990.
53. KATO, N.; LAN, K.-H.; ONO-NITA, S.K.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. **J. Virol.**, **71**: 8856-9, 1997.
54. KNODELL, R.G.; ISHAK, K.G.; BLACK, W.C.; CHEN, T.S.; CRAIG, R.; KAPLOWITZ, N.; KIERNAN, T.W.; WOLLMAN, J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. **Hepatology**, **1**: 431-5, 1981.
55. KOCH, J.O. & BARTENCHLAGER, R. Determinants of substrate specificity in the NS3 serine proteinase of the hepatitis C virus. **Virology**, **237**: 78-88, 1997.
56. KOTETZ, R.L.; STONE, O.; GITNICK, G.L. The long-term course of non-A, non-B post-transfusion hepatitis. **Gastroenterology**, **79**: 893-8, 1980.
57. KRUG, L.P.; LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; CHEINQUER, H.; OZAKI, L.S.; BARROS, S.G. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **29**: 1629-32, 1996.

58. KUBO, Y.; TAKEUCHI, K.; BOONMAR, S.; KATAYAMA, T.; CHOO, Q.-L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; BRANDLEY, D.W.; HOUGHTON, M.; SAITO, I.; MIYAMURA, T. A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from a implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. **Nucl. Acid Res.**, **17**: 10367-73, 1989.
59. KUO, G.; CHOO, Q.-L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L.; ALTER, M.J.; STEVENS, C.E.; TEGTMEIER, G.E.; BONINO, F.; COLOMBO, M.; LEE, W.-S.; KUO, C.; BERGER, K.; SHUSTER, J.R.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. An assay for circulating to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, **244**: 363-4, 1989.
60. KUZUSHITA, N.; HAYASHI, N.; KATAYAMA, K.; HIRAMATSU, N.; YASUMARU, M.; MURATA, H.; SHIMIZU, Y.; YAMAZAKI, T.; FUSHIMI, H.; KOTOH, K.; KASAHARA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. Increased frequency of HLA DR13 in hepatitis C virus carriers with persistency normal ALT levels. **J. Med. Virol.**, **48**: 1-7, 1996.
61. KWOK, S. & HIGUCHI, R. Avoiding false positive with PCR. **Nature**, **339**: 237-8, 1989.
62. LAMPE, E.; SABACK, F.L.; YOSHIDA, C.F.; NIEL, C. Infection with GB virus C/hepatitis G virus in Brazilian hemodialysis and hepatitis patients and asymptomatic individuals. **J. Med. Virol.**, **52**: 61-7, 1997.
63. LAU, J.Y.N.; SIMMONDS, P.; URDEA, M. S. Implications of variations of "conserved" regions of hepatitis C virus genome. **Lancet**, **346**: 425-6, 1995a.
64. LAU, J.Y.N.; MIZOKAMI, M.; KOLBERG, J.A.; DAVIS, G.L.; PRESCOTT, L.E.; OHNO, T.; PERRILLO, R.P.; LINDSAY, K.L.; GISH, R.G.; QIAN, K.-P.; KOHARA, M.; SIMMONDS, P.; URDEA, M.S. Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. **J. Infect. Dis.**, **171**: 281-9, 1995b.
65. LAU, J.Y.N.; DAVIS, G.L.; PRESCOTT, L.E.; MAERTENS, G.; LINDSAY, K.L.; QIAN, K.-P.; MIZOKAMI, M.; SIMMONDS, P.; The Hepatitis Interventional Therapy Group. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. **Ann. Intern. Med.**, **124**: 868-76, 1996.
66. LAWAL, Z.; PETRIK, J.; WONG, V.-S.; ALEXANDER, G.J.M.; & ALLAIN, J.-P. Hepatitis C virus genomic variability in untreated and immunosuppressed patients. **Virology**, **228**: 107-11, 1997.
67. LEE, D.-S.; SUNG, Y.-C.; WHANG, Y.-S. Distribution of HCV genotypes among blood donors, patients with chronic liver disease, hepatocellular carcinoma, and patients on maintenance hemodialyses in Korea. **J. Med. Virol.**, **49**: 55-60, 1996.

68. LEITE, N.C.; NOGUEIRA, C.M.; COELHO, H.S.; PEREZ, R.; MARTINS, S.J.; SOARES, J.A.; JUNQUEIRA, P.C. Prevalência do anticorpo contra hepatite C (anti-HCV) em doadores de sangue no Rio de Janeiro, Brasil. Sua relação com ALT e anti-HBc+. **Arq. Gastroenterol.**, **29**: 5-11, 1992.
69. LI, J.-S.; TONG, S.-T.; VITVICKI, L.; TRÉPO, C. Single-step nested polymerase chain reaction for detection of different genotypes of hepatitis C virus. **J. Med. Virol.**, **45**: 151-5, 1995.
70. LINNEN, J.; WAGES, J. Jr.; ZHANG-KECK, Z.Y.; FRY, K.E.; KRAWCYNKI, K.Z.; ALTER, H.; KOONIN, E.; GALLAGHER, M.; ALTER, M.; HADZIYANNIS, S.; KARAYIANNIS, P.; FUNG, K.; NAKATSUJI, Y.; SHIH, J.W.-K.; YOUNG, L.; PIATAK, M. Jr.; HOOVER, C.; FERNADEZ, J.; CHEN, S.; ZOU, J.-C.; MORRIS, T.; HYAMS, K.C.; ISAMY, S.; LIFSON, J.D.; HESS, G.; FOUNG, S.K.H.; THOMAS, H.; BRADLEY, D.; MARGOLIS, H.; KIM, J.P. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. **Science**, **271**: 505-8, 1996.
71. LOK, A.S.F.; CHEUNG, R.; CHAN, R. & LIU, V. Hepatitis C viremia in patients with hepatitis C virus infection. **Hepatology**, **15**: 1007-12, 1992.
72. LÓPEZ-ALCOROCHO, J.M.; MILLÁN, A.; GARCÍA-TREVIJANO, E.R.; BARTOLOMÉ, J.; RUIZ-MORENO, M.; OTERO, M.; CERREÑO, V. Detection of Hepatitis GB virus type C RNA in serum and liver from children with chronic viral hepatitis B and C. **Hepatology**, **25**: 1258-60, 1997.
73. LYRA, L.G.; DAMASCENO, A.P.; COTRIM, H.P.; MOTA, E.; SILVA, L. Prevalence of antibody to hepatitis B virus in an urban population of Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **28**: 406-9, 1986.
74. LYRA, L.; PARANÁ, R.; COTRIM, H.; GUEDES, J.; MASCARENHAS, R.; TRÉPO, C. Delta virus infection in Salvador-BA. **Acta Hepatol.**, **1**: 19-21, 1991.
75. MAJID, A.; HOLMES, R.; DESSELBERGER, U.; SIMMONDS, P.; McKEE, T.A. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection amongst Intravenous Drug Users in Rural Communities. **J. Med. Virol.**, **46**: 48-51, 1995.
76. MARTINS, R.M.B.; VANDERBORGHT, B.O.M.; ROUZERE, C.D.; SANTANA, C.L.; SANTOS, C.O.; MORI, D.N.; FERREIRA, R.G.; YOSHIDA, C.F.T. Anti-HCV related to HCV PCR and risk factors analysis in a blood donor population of central Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **36**: 501-6, 1994.
77. MELLOR, J.; WALSH, E.A.; PRESCOTT, L.E.; JARVIS, L.M.; DAVIDSON, F.; YAP P.L.; SIMMONDS; International HCV Collaborative Study Group. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 417-23, 1996.
78. MESQUITA, P.E.; GRANATO, C.F.H. & CASTELO, A. Risk factors associated with hepatitis C virus (HCV) infection among prostitutes and their clients in the city of Santos, Sao Paulo State, Brazil. **J. Med. Virol.** **51**: 338-43, 1997.

79. MILLER, R.H. Comparative molecular biology of the hepatitis viruses. **Semin. Liver Dis.**, **11**: 113-20, 1991.
80. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Sangue*. **Bol. Epidemiol.**, **2**: 31, 1993.
81. MINTON, E.J.; SMILLIE, D.; IRVING, W.L.; UNDERWOOD, J.C.E.; JAMES, V.; Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. **J. Infect. Dis.**, **178**: 39-44, 1998.
82. MORI, S.; KATO, N.; YAGYU, A.; TANAKA, T.; IKEDA, Y.; PETCHCLAI, B.; CHIEWSILP, P.; KURIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **183**: 334-42, 1992.
83. NAGHETTINI, A.V.; DAHER, R.R.; MARTIN, R.M.B.; DOLES, J.; VANDERBORGHT, B.; YOSHIDA, C.F.T.; ROUZERE, C. Soroprevalência do vírus da hepatite C na população em diálise de Goiânia, GO. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30**: 113-7, 1997.
84. NAKAO, T.; ENOMOTO, N.; TAKADA, N.; TAKADA, A.; DATE, T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. **J. Gen. Virol.**, **72**: 2105-12, 1991.
85. NANDA, S.K.; YALCINKAYA, K.; PANIGRAHI, A.K.; ACHARYA, S.K.; JAMEEL, S.; PANDA, S.K. Etiological role of hepatitis E virus in sporadic fulminant hepatitis. **J. Med. Virol.**, **42**: 133-7, 1994.
86. NGUYEN, T.T.; MONDALA, T.; SEDGI-VAZINRI, A.; WILKES, L.B.; POCKROS, P.J.; McHUTCHISON, J.G. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. **Gastroenterology**, **106**: A950, 1994.
87. NISHIZONO, A.; TERAOKA, H.; SHUTOH, R.; NASU, M.; MIFUNE, K.; WUN, B.J.; MONTAS, B.; FERNANDEZ, F.S. Genotyping of hepatitis C virus in Dominican Republic. **Am. J. Trop. Med.**, **57**: 719-22, 1997.
88. NIU, J.; KUMAR, U.; PAN, YU; LIU, Y.; ZHAN, Q.; THOMAS, H. & MONJARDINO, J. Hepatitis C virus type I (1a) in Northern China. **J. Med. Virol.**, **46**: 56-60, 1995.
89. NOLTE, F.S., THURMOND, C.; MITCHELL, P.S. Isolation of Hepatitis C Virus RNA from Serum of Reverse Transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 519-20, 1994.
90. NOLTE, F.S.; THURMOND, C. & FRIED, M.W. Preclinical evaluation of AMPLICOR hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 1775-8, 1995.
91. OHNO, T. & LAU, J.Y.N. The "Gold-standard", accuracy, and the current concepts: hepatitis C virus genotype and viremia. **Hepatology**, **24**: 1312-5, 1996.

92. OKAMOTO, H.; OKADA, S.; SUGIYAMA, Y.; YOTSUMOTO, S.; TANAKA, T.; YOSHIZAWA, H.; TSUDA, F.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. **Jap. J. Exp. Med.**, **60**: 167-77, 1990
93. OKAMOTO, H.; SUGIYAMA, Y.; OKADA, S.; KURAI, K.; AKAHANE, Y.; SUGAI, Y.; TANAKA, T.; SATO, K.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. **J. Gen. Virol.**, **73**: 673-9, 1992.
94. OKAMOTO, H.; TOKITA, H.; SAKAMOTO, M.; HORIKITA, M.; KOJIMA, M.; IIZUKA, H.; MISHIRO, S. Characterization of the genomic sequence of the type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR *primers* for specific detection. **J. Gen. Virol.**, **74**: 2385-90, 1993.
95. OKAMOTO, H.; KOBATA, S.; TOKITA, H.; INOUE, T.; WOODFIELD, G.D.; HOLLAND, P.V.; AL-KNAWY, B.A.; UZUNALIMOGLU, O.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. **J. Virol. Methods**, **57**: 31-45, 1996.
96. PANG, L.; ALENCAR, F.E.C.; CERUTTI JR., C.; MILHOUS, W.K.; ANDRADE, A.L.; OLIVEIRA, R.; KANESA-THASAN, N.; MACARTHY, P.O.; HOKE JR., C.H. Short report: Hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**: 347-8, 1995.
97. PANIGRAHI, A.K.; PANDA, S.K.; DIXIT, R.K.; RAO, V.S.; ACHARYA, S.K.; DASARATHY, S.; NANU, A. Magnitude of hepatitis C virus infection in India: prevalence in healthy blood donors, acute and chronic liver diseases. **J. Med. Virol.**, **51**: 167-74, 1997.
98. PANNUTI, C.S.; MENDONÇA, J.S.; CARVALHO, M.J.M.; OSELKA, G.W.; AMATO-NETO, V. Hepatitis A antibodies in two socioeconomically distinct populations of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **27**: 162-4, 1985.
99. PARANÁ, R. Vírus da hepatite E: experiência nacional. **GED**, **14**: 189, 1995.
100. PARANÁ, R.; COTRIM, H.P.; CORTEY-BOENNEC, M.L.; TREPÓ, C.; LYRA, L. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **57**: 60-1, 1997a.
101. PARANÁ, R. **Estudo clínico sorológico da hepatite aguda não-A e não-B esporádica em Salvador - Bahia**. Salvador, 1997b. 123 p. Tese (Doutorado em Medicina Interna). Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1997b.
102. POEL, C.L. van der; LELIE, P.N.; CHOO, Q.-L.; REESINK, H.W.; LEENTVAAR-KUYPERS, A.; KUO, G.; HOUGHTON, M. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. **Lancet**, **2**: 297-8, 1989.



103. POEL, C.L. van der; CUYPERS, H.T.M.; REESINK, H.W.; WEINER, A.J.; QUAN, S.; DI NELLO, R.; VAN BOVEN, J.J.P.; WINKEL, I.; MULDER-FOLKERST, D.; EXEL-DEHLERS, P.J.; SHAAS-BERG, W.; LEENTVAAR-KUYPERS, A.; POLITO, A.; HOUGHTON, M.; LELIE, P.N. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. **Lancet**, **337**: 317-9, 1991.
104. PRATI, D.; CAPELLI, C.; ZANELLA, A.; MOZZI, F.; BOSONI, P.; PAPPALATTERA, M.; ZANUSO, F.; VIANELLO, L.; LOCATELLI, E.; FAZIO, C.; RONCHI, G.; NINNO, E. del; COLOMBO, M.; SIRCHIA, G. Influence of different hepatitis C virus genotypes on the course of asymptomatic hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, **110**: 178-83, 1996.
105. PRESCOTT, L.E.; SIMMONDS, P.; LAI, C.L.; CHAN, N.K.; PIKE I.; YAP, P.L. & LIN, C.K. Detection and clinical features of hepatitis C virus type 6 infections in blood donors from Hong Kong. **J. Med. Virol.**, **50**: 168-75, 1996.
106. PURCELL, R.H. & TICEHURST, J.R. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Epidemiological and clinical characteristics. In: ZUCKERMAN, A. (ed.). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Wiley-Liss, 1988.
107. PURDY, M.A. & KRAWCZINSKY, K. Hepatitis E. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, **23**: 537-46, 1994.
108. QUEIRÓZ, D.A.O.; CARDOSO, D.D.; MARTINELLI, C.M.; MARTINS, R.M.; PORTO, S.O.; AZEVEDO, M.S.; BORGES, A.M.; DAHER, R.R. Soroepidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite A em "Meninos de/na rua" de Goiânia-Goiás. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **28**: 199-203, 1995a.
109. QUEIRÓZ, D.A.O.; CARDOSO, D.D.; MARTELLI, C.M.; MARTINS, R.M.; PORTO, S.O.; BORGES, A.M.; AZEVEDO, M.S.; DAHER, R.R. Risk factors and prevalence of antibodies against hepatitis A virus (HAV) in children from day-care centers, in Goiania, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **37**: 427-33, 1995b.
110. RALL, C.J.N. & DIENSTAG, J.L. Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection. **Semin. Gastrointest. Dis.**, **6**: 1-10, 1995.
111. REYES, G.R. Hepatitis E virus (VHE): molecular biology and emerging epidemiology. In: BOYER, J.L. & OCKNER, R.K. (eds.). *Progress in Liver Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1993. p. 203-13. v. 11.
112. RICE, C.M. Flaviviruses: The viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, P.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. *Virology*. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v. 1. p. 931-59.
113. RIZZETTO, M.; CANESE, M.G.; ARICO, S.; CRIVELLI, O. TREPÓ, C.; BONIO, F.; VERME, G. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated with B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut**, **18**: 997-1003, 1977.

114. RIZZETTO, M.; PONZETTO, A. & FORZANI, I. Epidemiology of hepatitis delta virus: an overview. In: GERIN, J.L.; PURCELL, R.H.; RIZZETTO, M. (eds.). *The hepatitis delta virus*. New York: Wiley-Liss, 1991. p. 1-20.
115. SAITO, I.; MIYAMURA, T.; OHBAYASHI, A.; HARADA, H.; KATAYAMA, T.; KIKUCHI, S.; WATANABE, T.; KOI, S.; ONJI, Y.; CHOO, Q.-L.; HOUGHTON, M. & KUO, G. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 6547-9, 1990.
116. SAKAMOTO, N.; ENOMOTO, N. KUROSAKI, M.; ASAHINA, Y.; MAEKAWA, S.; KOIZUMI, K.; SAKUMA, I.; MURAKAMI, T.; MARUMO, F. & SATO, C. Comparison of the hypervariable region of hepatitis C virus genomes in plasma and liver. **J. Med. Virol.**, **46**: 7-11, 1995.
117. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3. v.
118. SANTANA, G. **Anti-VHC em pacientes sob programa de hemodiálise - Salvador - BA**. Salvador, 1995. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1995.
119. SANTANA, N.; PARANÁ, R.; COTRIM, H.; SANTANA, G.; FREITAS, L.A.; LYRA, A.; SANTANA, A.; TREPÓ, C.; LYRA, L. Prevalência de anti-HCV em doadores de sangue da cidade de Salvador, Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GASTROENTEROLOGIA, 22. Porto Alegre, 1994.
120. SANTANA, N. **Significado do anti-VHC em doadores de sangue na cidade do Salvador - Bahia**. Salvador, 1995. 74 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1995.
121. SCHMIDT, W.N.; WU, P.; CEDERNA, J.; MITROS, F.A.; LABRECQUE, D.R.; STAPLETON, J.T. Surreptitious hepatitis C virus (HCV) infection detected in the majority of patients with cryptogenic chronic hepatitis and negative HCV antibody tests. **J. Infect. Dis.**, **176**: 27-33, 1997a.
122. SCHMIDT, W.N.; WU, P.; HAN, J.-Q.; PERINO, M.J.; LABRECQUE, D.R.; STAPLETON, J.T. Distribution of hepatitis C virus (HCV) RNA in whole blood and blood cell fractions: plasma HCV RNA analyses underestimates circulating virus load. **J. Infect. Dis.**, **176**: 20-6, 1997b.
123. SCHWARZ, E.; FREESE, E.F.; GISSMANN, L.; MAYER, W.; ROGGENBUCK, A.; STREMLAU, B.; HAUSEN, H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, **314**: 111-4, 1985.
124. SEIKI, M.; INOUE, J.-I.; TAKEDA, T.; YOSHIDA, M. Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional. **EMBO J.**, **5**: 561-5, 1986.

125. SEMPRINI, A.E.; PERSICO, T.; THIERS, V.; ONETA, M.; TUVERI, R.; SERAFINI, P.; BOSCHINI, A.; GIUNTELLI, S.; PARDI, G.; BRECHOT, C. Absence of hepatitis C virus na detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA in the semen of infected men. **J. Infect. Dis.**, **177**: 848-54, 1998.
126. SHERLOCK, S. *Doenças do fígado e do sistema biliar*. 8. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 1991.
127. SHINDO, M.; HAMADA, K.; KOYA, S.; ARAI, K.; SOKAWA, Y.; OKUNO, T. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. **Hepatology**, **24**: 1018-23, 1996.
128. SILINI, E.; BONO, F.; CIVIDINI, A.; CERINO, A.; BRUNO, S.; ROSSI, S.; BELLONI, G.; BRIGNETTI, B.; CIVARDI, E.; SALVANESCHI, L.; MONDELLI, M.U. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. **Hepatology**, **21**: 285-90, 1995.
129. SILVA, L.R. **Transmissão vertical do vírus B da hepatite em Salvador**. Salvador, 1985. 141 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1985.
130. SILVA, L.R.; PARANÁ, R.; MOTA, E.; COTRIM, H.P.; BOENNEC-McCURTEY, M.L.; VITVITINSKY, L.; PADUA, A.; TREPÓ, C.; LYRA, L. Prevalence of hepatitis C virus in urban and rural populations of northeast Brazil-pilot study. **Arq. Gastroenterol.**, **32**: 168-71, 1995.
131. SIMMONDS, P.; McOMISH, F.; YAP, P.L.; CHAN, S.W.; LIN, C.K.; DUSHEIKO, G.; SAEED, A.A.; HOLMES, E.C. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **J. Gen. Virol.**, **74**: 661-8, 1993a.
132. SIMMONDS, P.; HOLMES, E. C.; CHA, T.-A.; CHAN, S.-W.; McOMISH, F.; IRVINE, B.; BEALL, E.; YAP, P.L.; KOLBERG, J.; URDEA, M.S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J. Gen. Virol.**, **74**: 2391-9, 1993b.
133. SIMMONDS, P. SMITH, D.B.; McOMISH, F.; YAP, P.L.; KOLBERG, J.; URDEA, M.S.; HOLMES, E.C. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS5- regions. **J. Gen. Virol.**, **75**: 1053-61, 1994.
134. SIMMONDS, P. Variability of Hepatitis C Virus. **Hepatology**, **21**: 570-83, 1995.
135. SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; CRAXI, A.; SANCHEZ-TAPIAS, J.-M.; ALBERTI, A.; PRIETO, J.; COLOMBO, M.; RUMI, M.G.; IACANO, O.L.; AMPURDANES-MINGALL, S.; FORNS-BERNHARDT, X.; CHEMELLO, L.; CIVEIRA M.-P.; FROST, C.; DUSHEIKO, G. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western european patients. **J. Hepatol.**, **24**: 517-24, 1996.
136. SIMMONDS, P. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. **Gut**, **40**: 291-93, 1997.

137. SIMONS, J.N.; LEARY, T.P.; DAWSON, G.J.; PILOT-MATIAS T.J.; MUERHOFF, A.S.; SCHLAUDER, G.G.; DESAI, S.M.; MUSHAWAR, I.K. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. **Nature Med.**, **1**: 564-9, 1995a.
138. SIMONS, J.N.; PILOT-MATIAS T.J.; LEARY, T.P.; DAWSON, G.J.; DESAI, S.M.; SCHLAUDER, G.G.; MUERHOFF, A.S.; ERKER, J.C.; BUJIK, S.L.; CHALMERS, M.L.; VAN SANT, C.L.; MUSHAWAR, I.K. Identification of two flavivirus-like genomes on the GB hepatitis agent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 3401-5, 1995b.
139. SMEDILE, A.; FARCI, P.; VERME, G.; CAREDDA, F.; CARGNAL, A.; CAPORASO, N.; DENTICO, P.; TREPÓ, C.; OPOLON, P.; GIMSON, A.; VERGANI, D.; WILLIAMS, R.; RIZZETTO, M. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. **Lancet**, **2**: 945-7, 1982.
140. SMITH, D.B.; DAVIDSON, F.; YAP, P.-L.; BROWN, H.; KOLBERG, J.; DETMER, J.; URDEA, M.; SIMMONDS, P. and the International HCV Collaborative Study Group. Levels of hepatitis C virus in blood donors infected with different viral genotypes. **J. Infect. Dis.**, **173**: 727-30, 1996.
141. SMUTS, H.E.M. & KANNEMEYER, J. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 1679-81, 1995.
142. SOUTO, F.J.D.; FONTES, C.J.F.; PARANÁ, R. & LYRA, L.G.C. Short report: further evidence for hepatitis E in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **57**: 149-50, 1997.
143. STUYVER, L. ROSSAU, R.; WYSEUR, A.; DUHAMEL, M.; VANDERBORGH, B.; VAN HEUVERSWEYN, H.; MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. **J. Gen. Virol.**, **74**: 1093-102, 1993.
144. SUZUKI, T.; TANAKA, E.; MATSUMOTO, A.; URUSHIHARA, A. & SODEYAMA, T. Usefulness of simple assays for serum concentration of hepatitis C virus RNA and HCV genotypes in predicting the response of patients with chronic hepatitis C to interferon alfa2a therapy. **J. Med. Virol.**, **46**: 162-8, 1995.
145. TALIANI, G.; BADOLATO, M.C.; PASQUAZZI, C. Hepatitis C virus genotypes, hepatitis C virus RNA titers, and response to Interferon. **Ann. Intern. Med.**, **127**: 89, 1997.
146. THALER, M.M.; PARK, C.-K.; LANDERS, D.V.; WARA, D.W.; HOUGHTON, M.; VEEREMAN-WAUTERS, G.; SWEET, R.L.; HAN, J.H. Vertical transmission of hepatitis C virus. **Lancet**, **338**: 17-8, 1991.
147. TSUKIYAMA-KOHARA, K.; IIZUKA, N.; KOHARA, M.; NOMOTO, A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. **J. Virol.**, **66**: 1476-83, 1992.

148. VANDERBORGHT, B.O.M.; ROUZERE, C.; GINUINO, C.F.; MAERTENS, G.; VAN HEUVERS WYN, H.; YOSHIDA, C.F.T. High prevalence of hepatitis C infection among brazilian hemodialysis patients in Rio de Janeiro: a one-year follow-up study. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **37**: 75-9, 1995.
149. VARELA, H.L. **Importância do comportamento sexual na disseminação da infecção pelo vírus B da hepatite e sua associação com doenças sexualmente transmissíveis**. Salvador, 1986. 142 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 1986.
150. VASCONCELOS, H.C.; YOSHIDA, C.F.; VANDERBORGHT, B.O.M.; SCHATZMAYR, H.G. Hepatitis B and C prevalences among blood donors in the south region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89**: 503-7, 1994.
151. VIAZOV, S.; KUZIN, S.; PALADI, N.; TCHERNOVETSKY, M.; ISAEVA, E.; MAZHUL, L.; VASYCHOVA, F.; WIDELL, A. & ROGGENDORF, M. Hepatitis C virus genotypes in different regions of the Former Soviet Union (Russia, Belarus, Moldova and Uzbekistan). **J. Med. Virol.**, **53**: 36-40, 1997.
152. WEINER, A. J.; KUO, G.; BRADLEY, D. W.; BONINO, F.; SARACCO, G.; LEE, C.; ROSENBLATT, J.; CHOO, Q.-L.; HOUGHTON, M. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. **Lancet**, **350**: 1-3, 1990.
153. WEINER, A.J.; BRAUER, M.J.; ROSENBLATT J.; RICHMAN, K.H.; TUNG, J.; CRAWFORD, K.; BONINO, F.; SARACCO, G.; CHOO, Q.-L.; HOUGHTON, M.; HAN, J.H. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the Flavivirus envelope and NS1 proteins and the Pestivirus envelope glycoproteins. **Virology**, **180**: 842-8, 1991.
154. YANO, M.; KAMADA, H.; KAGE, M.; IKEDA, K.; SHIMAMATSU, K.; INOUE, O.; HASHIMOTO, E.; LEFKOWICHTH, J.H.; LUDWIG, J.; OKUDA, K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. **Hepatology**, **23**: 1334-40, 1996.
155. YOSHIDA, C.F.; ROUZERE, C.D.; NOGUEIRA, R.M.; LAMPE, E.; TRAVASSOS DA ROSA, M.A.; VANDERBORGHT, B.O.; SCHATZMAYR, H.G. Human antibodies to dengue and yellow fever do not react in diagnostic assays for hepatitis C virus. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **25**: 1131-5, 1992.
156. YOSHIDA, C.F.; TAKAHASHI, Y.; VANDERBORGHT, B.O.M.; ROUZERE, C.D.; FRANÇA, M.S.; TAKAHASHI, C.; TAKAMIZAWA, A.; YOSHIDA, I.; SCHATZMAYR, H.G. Antibodies against non-structural c100/3 and structural core antigen of hepatitis C virus (HCV) in hemodialysis patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **35**: 315-21, 1993.
157. ZAAIJER, H.L.; CUYPERS, H.T.M.; REESINK, H.W.; WINKEL, I.N.; GERKEN, G.; LELIE P.N. Reliability of Polymerase Chain Reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet**, **341**: 722-4, 1993.

158. ZEHENDER, G.; MERONI, L.; MADDALENA, C.; VARCHETTA, S.; MONTI, G.; GALLI, M. Detection of hepatitis C virus RNA in CD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. **J. Infet. Dis.**, **176**: 1209-14, 1997.
159. ZEIN, N.N.; RAKELA, J.; KRAWITT, E.L.; REDDY, K.R.; TOMINAGA, T.; PERSING, D.H.; The Collaborative Study Group. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathology, and response to interferon therapy. **Ann. Intern. Med.**, **125**: 634-9, 1996.

# ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

---

(Em acordo com as Normas da Resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996, aprovada na 59ª Reunião Ordinária do Plenário do Conselho Nacional de Saúde)

Instituições de Pesquisa: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e o Hosp. Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES-UFBA).

Título do Projeto: Aplicação de técnicas de Biologia Molecular no diagnóstico e genotipagem do Vírus da Hepatite C em indivíduos portadores na Cidade do Salvador/1996-97.

Pesquisadores Responsáveis: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Dr. Raimundo Paraná Ferreira Filho e Dr. Luís Guilherme Costa Lyra.

Sujeito da pesquisa: Como voluntário, o (a) Sr.(Sra.) esta sendo solicitado(a) a participar de uma investigação científica, patrocinada pelo CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ/FIOCRUZ, com o objetivo principal de realizar um estudo clínico-epidemiológico, da hepatite viral tipo C, sob responsabilidade do Mestrando Sr. Luciano Kalabric Silva e orientação do Dr. Mitermayer Galvão dos Reis.

Este documento procura fornecer ao(a) Sr.(Sra.) informações sobre o problema de saúde em estudo e a experiência que será realizada, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconveniência(as) e risco(os) potencial(is). O(a) Sr. (Sra.) poderá recusar-se a participar da pesquisa ou, mesmo, dela se afastar em qualquer tempo, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da instituição, a qual manterá o acompanhamento e tratamento que lhe está sendo prestado para atender o problema de saúde objetivo da investigação. Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como poderão interromper a participação do Sr. (Sra.), a qualquer tempo, por razões técnico/médicas quando, então, lhe serão fornecidos aconselhamento e orientação. Os exames e procedimentos aplicados lhe são gratuitos. O (a) Sr. (Sra.) receberá todos os cuidados médicos adequados para o controle de efeitos adversos que possam ocorrer, em consequência de sua participação nesta pesquisa. Vale lembrar que todos os dados utilizados para a avaliação clínico-epidemiológicas estarão codificados em sistema de informática, sob sigilo, e que não permitirão sua identificação em nenhuma circunstância, cabendo qualquer contato ser efetuado diretamente pelo o Sr. Luciano Kalabric Silva.

Antes de assinar este Termo, O (a) Sr. (Sra.) deve informar-se plenamente sobre o mesmo, não hesitando em formular perguntas importantes sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

1. O Problema de saúde objeto da investigação:
  - Estudo da hepatite viral humana causada pelo vírus da hepatite C (VHC).
2. Objetivos da investigação:
  - Estudo epidemiológico da hepatite viral C em portadores e sob acompanhamento pelo Serviço de Gastro-Hepatologia no Ambulatório de Hepatologia/HUPES.
  - Determinar a associação dos diversos genótipos do VHC com informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas dos indivíduos em estudo.
  - Obter informações científicas que possibilitem identificar grupos potenciais para a aplicação de terapias anti-virais com interferon- $\alpha$ .
3. Duração da sua participação:
  - O tempo previsto para a total realização do nosso estudo, incluindo as análises moleculares será de 01 ano. Entretanto, isso não acarretará alteração nas condições de acompanhamento e assistência pelo corpo médico.
4. Inconvenientes:
  - Submeter-se à entrevista.
  - Coleta de sangue, nos casos realmente indicados conforme descrito no item 6 deste Termo.
5. Riscos e danos associados ou decorrentes da pesquisa:
  - Riscos praticamente nulos exceto pela ocorrência eventual de pequena hemorragia no local da punção venosa para coleta de sangue.
6. Procedimentos, exames e agentes terapêuticos que serão utilizados:
  - Coleta de aproximadamente 15 ml de sangue através de punção venosa para os exames descritos nos próximos 2 (dois) itens.
  - Exame bioquímico do sangue e sorológico para a identificação dos marcadores virais, apenas nos casos que não possuem resultados destes exames nos últimos 6 meses.
  - Exame molecular para a detecção e a genotipagem do VHC.
  - Cadastro através de uma entrevista.
  - Todos os casos participantes ou não desse estudo estarão sob acompanhamento clínico do Serviço de Gastro-Hepatologia/HUPES, que assume todas as decisões quanto ao acompanhamento e assistência dos pacientes.

- As análises bioquímicas e virais das amostras de sangue colhidas serão analisadas nos laboratórios do LACEN, HUPES e FIOCRUZ.

7. Benefícios:

- Os indivíduos participantes receberão resultados moleculares inéditos que proporcionam o diagnóstico definitivo da infecção pelo VHC além do genótipo do vírus.
- Este estudo contribuirá para o entendimento da transmissão do VHC em nosso meio. Também, informações sobre o genótipo do vírus, poderá melhor identificar o prognóstico e a maneira de conduta no acompanhamento dos pacientes. Além disso, este estudo também poderá contribuir sob o ponto de vista antropológico da disseminação mundial do vírus.
- Referenda grupos potenciais para o tratamento precoce com anti-virais como o interferon- $\alpha$ .

8. Pessoas e locais para respostas e perguntas:

Sr. Luciano Kalabric Silva ou Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Lab. de Pat. e Biologia Molecular do CPqGM/FIOCRUZ-BA  
R. Waldemar Falcão, 121 - Brotas  
Tel.: (071) 356-8783 - Horário comercial

Dr. Raimundo Paraná ou Dr. Luís Lyra  
Ambulatório de Hepatologia/HUPES-UFBA  
Horário: Terças-feiras das 14:00 às 18:00

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo. Declaro, pois, dar meu consentimento para participar desta investigação recebendo uma cópia do Termo, estando ciente, ainda, de que uma outra cópia permanecerá registrada nos arquivos do Lab. de Pat. e Biologia Molecular/CPqGM.

Salvador, 6 de Outubro de 1998

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

Endereço do Voluntário: \_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário ou responsável: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Local e data

Assinatura do investigador: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Local e data





**DADOS LABORATORIAIS**

17. Tipo sanguíneo {TIPOSANG} (0 O: 1 = A; 2 = B; 3 = AB): |\_\_\_|

17.1 {FATORRH} (1 = positivo; 2= negativo): |\_\_\_|

18. Dados Bioquímicos mais recentes: |\_\_\_|

18.1	Data do Teste	Instituição Responsável pelos Resultados	Nome do Teste <sup>1</sup>	Resultado do Teste		Faixa de Referência <sup>5</sup>
			Método do Teste & Fabricante <sup>2</sup>	Valor (Unid.) <sup>3</sup>	Interpretação <sup>4</sup>	
Bilirrubina Sérica - Total						
Bilirrubina Sérica - Direta						
Bilirrubina Sérica - Indireta						
TGO no Soro						
TGP no Soro						
Fosfatase Alcalina						
Tempo de Protrombina						
Proteína Total						
Albumina Total						
Gama-GT						

1 Prover o nome do teste.

2 Prover o método de teste e o fabricante.

3 Prover resultados do teste para o estado de doença especificado; incluir unidade de medida.

4 Prover a interpretação do testes (ex.: +, -, indeterminado).

5 Identifique a faixa de referência para o teste.

18.2. Série de aminotransferases TGO e TGP no primeiros 6 meses da admissão ao serviço:

Data do teste				Faixa de Referência
TGO				
TGP				
gama-GT				

**OUTROS MARCADORES**

19. Outras infecções parenterais concomitantes:

	Data do Teste	Instituição Responsável pelos Resultados	Nome do Teste <sup>1</sup>	Resultado do Teste		Faixa de Referência <sup>5</sup>
			Método do Teste & Fabricante <sup>2</sup>	Valor (Unid.) <sup>3</sup>	Interpretação <sup>4</sup>	
Outros HGB ou GRV-C						
Anti-VHA						
HBsAg						
Anti-HBs						
HBeAg						
Anti-HBe						
Anti-HBc						
VHB DNA						
Anti-VHD						
Anti-VHE						
Sífilis						
Doença de Chagas						
HIV						
HTLV I ou II						

1 Prover o nome do teste.

2 Prover o método de teste e o fabricante.

3 Prover resultados do teste para o estado de doença especificado; incluir unidade de medida. DNO=Dado não Obtido.

4 Prover a interpretação do testes (ex.: +, -, indeterminado).

5 Identifique a faixa de referência para o teste.

## ANEXO III - LISTA DE REAGENTES

### 1. Reagentes gerais

1. Itens	Concentração	Ref. do Fornecedor
2. Ácido acético glacial	P.A.	Sigma, A6283
3. Ácido clorídrico	P.A.	Sigma, H7020
4. Agarose	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, A9539
5. Álcool Etílico	P.A.	Reagen
6. Álcool Isoamílico	P.A.	Sigma, I9392
7. Azul de bromofenol	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, B5525
8. B-Mercaptoetanol	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, M3148
9. Brometo de etídio	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, E1510
10. Cloreto de magnésio	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, M8266
11. Cloreto de sódio	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, S3014
12. Clorofórmio	P.A.	Sigma, C2432
13. DEPC	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, D5758
14. DNA de esperma de salmão fragmentado	10 mg/ml	Sigma, D7290
15. Hidróxido de sódio	---	Sigma, S0899
16. Nusieve Agarose GTG	Grau p/ biol. Molecular	Àmerican Bioanalytical

### 2. Reagentes para PCR

Itens	Concentração	Ref. do Fornecedor
17. Inibidor de Ribonucleases	40 U/μl	Gibco BRL, 15518-012
18. dNTP mix	10 mM	Gibco BRL, 18427-013
19. Taq Polymerase;	5 U/μl	Kit Promega, M1861
20. Tampão da Taq e	10 X	
21. MgCl <sub>2</sub>	25 mM	
22. Kit M-MLV Reverse transcriptase (RT);	200 U/μl	Gibco BRL, 28025-021
23. Tampão da RT e;	5 X	
24. DTT	0,1 M	
25. Marcador de peso molecular φX174 RF/Hae III fragments	----	Gibco BRL, 15611-015
26. Óleo mineral	Grau p/ biol. Molecular	Sigma, M5904

**Soluções:** Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas conforme descrito no manual de laboratório de SAMBROOK e col. (1989).

- NaOH 0,4 M
- SDS à 10 %
- SSC 20 X (ou SSPE 20 X)
- EDTA 0,1 M pH 8,0
- Solução de Denhardt 50 X

## ANEXO IV

---

### EQUIPE DO GRUPO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM HEPATITES (GEPH-BA)

- Segue abaixo os nomes dos integrantes desta equipe e suas respectivas atribuições por órgão de atuação:
- ◆ CPqGM/FIOCRUZ
  - Mitermayer G. dos Reis      Pesq. Titular/LPBM
  - Luiz Antônio R. de Freitas      Pesq. Titular/LPBC
  - **Luciano Kalabric Silva**      Técnico Superior
  - Sérgio Pinto de Souza      Estudante PIBIC/CNPq
- ◆ DEVISA/SESAB
  - Lorene Louise Pinto      Diretora
  - DIVEP
    - Marlene Carvalho      Gerente da DIVEP
    - Jussara Bôtto      Téc. Resp. pelo GT-Hepatites Virais-BA
    - Valdelice Fiusa      Téc. Resp. pelo GT-Hepatites Virais-BA
  - LACEN
    - Aida Maria C. de Goes      Diretora do LACEN
    - Iara Santana      Técnico Superior
    - Maria Alice Zarife      Técnico Superior
    - Eliane Valadão      Técnico Superior
    - Eline C. P. de Oliveira      Técnico Superior
    - Rosa Maria Veloso Rode      Técnico Superior
- ◆ 1ª DIRES/SESAB
  - Ana Picanço      Técnica Superior
  - Ilma Silva      Técnica Superior
- ◆ HEMOBA/SESAB
  - Aurelino Santana      Diretor do HEMOBA
  - Nelma Santana      Médica SESAB/HEMOBA
- ◆ Serviço de Hepatologia e Gastroenterologia/HUPES-UFBA
  - Luiz Guilherme Lyra      Prof. Adjunto/UFBA - Coordenador
  - Raimundo Paraná      Prof. Adjunto/UFBA
  - Helma Cotrim      Profa. Adjunto/UFBA
  - Luciana Silva      Profa. Adjunto/UFBA
  - Isabel Quitas      Enfermeira/HUPES
- ◆ Ministério da Saúde
  - Edwin A. S. Castillo      Coord. do GT-Hepatites Virais MS/FNS
- ◆ Consultores estrangeiros
  - C. Trepó      INSERM U271/Lyon/França
  - A. Kay      INSERM U271/Lyon/França
  - F. Berby      INSERM U271/Lyon/França
  - John David      Harvard University/EUA