



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO TESTE IMMUNOBLOT
RECOMBINANTE (RIBA) NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) EM DOADORES DE SANGUE COM
ANTI-VHC REAGENTE.**

FELICIDADE MOTA PEREIRA

Salvador - Bahia
2011

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO TESTE IMMUNOBLOT
RECOMBINANTE (RIBA) NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) EM DOADORES DE SANGUE COM
ANTI-VHC REAGENTE.**

FELICIDADE MOTA PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão Reis
Co-orientadora: Dra. Maria Alice Zarife

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa, para
a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia
2011

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO TESTE IMMUNOBLOT RECOMBINANTE (RIBA) NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) EM DOADORES DE SANGUE COM ANTI-VHC REAGENTE.

FELICIDADE MOTA PEREIRA

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

*Dedico este trabalho à minha família pelo
apoio incondicional a mim ofertado,
além do incentivo para lutar pelos meus sonhos*

AGRADECIMENTOS

À Deus , pela minha vida.

À minha família que é a base de tudo que sou hoje, pelos valores, incentivo, apoio, força e encorajamento.

Ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, pela confiança e acima de tudo um mestre.

A Dra. Maria Alice Zarife pela co-orientação do trabalho, pelo incentivo, pela receptividade e confiança.

À coordenação de ensino do CPqGM pela atenção e cordialidade.

Aos professores e alunos da Pós-Graduação pela convivência e ensinamentos.

Aos funcionários do CPqGM pela atenção e cordialidade, principalmente aos funcionários da biblioteca pela eficiência e prontidão em servir.

Aos colegas do LPBM, Gisele, Theomira, Fernanda, Luciano Kalabric, Silvana, Daniele, Alan Macbride pela convivência, dicas e aprendizado.

A Rosane Will, diretora do LACEN, que apoiou o projeto desde o início, pela confiança e incentivo.

Aos funcionários do setor de atendimento do LACEN pela recepção aos pacientes incluídos na pesquisa. Particularmente a Nadir, Jane e Virginia pela a grande ajuda na coleta dos dados.

Aos colegas dos laboratórios de virologia e biologia molecular pela atenção, apoio, dedicação na execução das análises do projeto.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, sem vocês não teria trabalho.

As médicas da HEMOBA particularmente Virginia Figueiredo, Iraildes Santana e Nelma Santana pela atenção, presteza e colaboração na pesquisa.

Aos meus queridos amigos que sempre torceram por mim e que me influenciaram positivamente ao longo da minha vida. Sei que mesmo não sendo citados aqui, estão felizes por ver mais uma etapa da minha vida concluída. Mas, fiquem tranquilos que não será a última, em breve vou precisar de vocês.

Ao LACEN pelas oportunidades e o apoio a esta pesquisa.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”.

Platão

PEREIRA, Felicidade Mota. Avaliação da utilização do teste immunoblot recombinante (RIBA) no diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) em doadores de sangue com anti-VHC reagente. 66 f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é comumente assintomática e apresenta uma elevada taxa de cronicidade, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. O diagnóstico da hepatite C é realizado através da pesquisa de anticorpos pelo teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e confirmado por testes suplementares, tais como o RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) e westernblot e teste confirmatório, como a pesquisa do VHC-RNA. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do RIBA no diagnóstico da infecção pelo VHC em doadores de sangue com anti-VHC reagente. Foram analisadas 102 amostras com resultado de anti-VHC reagente na HEMOBA, utilizando-se o teste anti-VHC Architect Abbott por quimioluminescência para detecção dos anticorpos anti-VHC, o RIBA III (CHIRON) como teste suplementar para as amostras anti-VHC reagentes e indeterminadas e a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) convencional ou em tempo real (Amplicor Roche) para detecção do VHC-RNA. As amostras com VHC-RNA detectável foram genotipadas por hibridização reversa (LIPA; SIEMENS). Das 102 amostras analisadas no LACEN, 38,2% (39/102) foram reagentes, 57,8% (59/102) foram não reagentes e 3,9% (4/102) foram indeterminadas para o anti-VHC. Os resultados do RIBA foram 58,1% (25/43) positivos, 9,3% (4/43) negativos e 32,6% (14/43) indeterminados. Todas as amostras com resultado de RIBA indeterminado tiveram carga viral indetectável. As bandas predominantes nas amostras indeterminadas foram c33 e c22. Das amostras indeterminadas no RIBA, repetidas após seis meses com nova coleta, 20% (2/10) negativaram e 71,4% (10/14) permaneceram RIBA indeterminado. Destas, (8/10) continuaram indeterminadas com o mesmo padrão de bandas. O VHC-RNA foi realizado em todas as amostras do estudo (102) e foi detectável em apenas 22,5% (23/102). Todas as amostras com VHC-RNA detectável foram RIBA positivo e tinham índice maior que cinco na relação S/CO. Em apenas duas amostras que tiveram resultado de RIBA positivo, o VHC-RNA não foi detectado. As 23 amostras com VHC-RNA detectável foram genotipadas, sendo 78,3% (18/23) do genótipo 1, 17,4% (4/23) do genótipo 3 e 4,3% (1/23) do genótipo 2. A positividade do anti-VHC associou-se com o uso de droga intranasal ($< 0,001$), com drogas injetáveis ($< 0,001$) e ocorrência de DST ($< 0,05$). Diante dos resultados encontrados, observa-se que o RIBA apresenta um elevado número de resultados indeterminados, sendo necessária a realização do VHC-RNA para a confirmação da infecção pelo VHC. Indivíduos com resultado de anti-VHC índice menor que cinco e resultado de RIBA indeterminado têm grande probabilidade de não apresentarem o VHC-RNA detectável e portanto, de não estarem infectados pelo VHC, mas devem ser acompanhados sorologicamente, de acordo com o critério médico.

Palavras-chave: VHC, anti-VHC, RIBA, VHC-RNA.

PEREIRA, Felicidade Mota. Evaluation of the recombinant immunoblot test use in the diagnosis of hepatitis C virus infection (HCV) in blood donors with anti-HCV reagent. 66 f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador,

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) infection is usually asymptomatic and has a high rate of chronicity, which may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The hepatitis C diagnosis is realized by antibodies research using ELISA test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and confirmed by additional serological tests, such as RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) and westernblot, and confirmatory test, like HCV-RNA research. The objective of this study was to evaluate the RIBA efficacy in the diagnosis of HCV infection in blood donors with anti-HCV reagent. Were analyzed 102 samples with anti-HCV reagent in HEMOBA using the anti-HCV test Abbott Architect chemiluminescence for detection of anti-HCV antibodies, the RIBA III (Chiron) as a supplemental test for anti-HCV reactive and indeterminate samples and the Polymerase Chain Reaction test (RT-PCR) conventional or real-time (Roche Amplicor) for HCV-RNA detection. Samples with HCV-RNA detectable were genotyped by reverse hybridization (LIPA SIEMENS). Of the 102 samples analyzed in LACEN 38.2% (39/102) were positive, 57.8% (59/102) were negative and 3.9% (4 / 102) were indeterminate for anti-HCV. The RIBA results were 58.1% (25/43) positive, 9.3% (4 / 43) negative and 32.6% (14/43) indeterminate. All samples with indeterminate RIBA results had undetectable viral load. The predominant bands in the indeterminate RIBA samples were c33 and c22. Of the RIBA indeterminate samples, repeated after six months with a new collection, 20% (2 / 10) became negative and 71.4% (10/14) remained indeterminate. Of these, (8 / 10) remained undetermined with the same banding pattern. HCV-RNA was performed in all study samples (102) and was detectable in only 22.5% (23/102). All samples with detectable HCV-RNA were RIBA positive and had more than five in the ratio index S / CO. Only two samples had RIBA positive results with HCV-RNA not detected. The 23 samples with detectable HCV-RNA were genotyped, and 78.3% (18/23) were genotype 1, 17.4% (4 / 23) genotype 3 and 4.3% (1 / 23) genotype 2 . The anti-HCV positivity was associated with intranasal drug use ($p < 0.001$), injectable drugs ($p < 0.001$) and STDs ($p < 0.05$). Given the results, it is noted that the RIBA has a high number of indeterminate results, requiring the HCV-RNA detection for HCV infection confirmation. Individuals with anti-HCV index below five, and indeterminate RIBA results are likely undetectable HCV-RNA and therefore are not infected with HCV, but must be serologically accompanied, according to medical criteria.

Keywords: HCV, anti-HCV, RIBA, HCV-RNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figura 1	Genoma do VHC e Poliproteínas expressadas.	18
Figura 2	Evolução do VHC RIBA com resultado indeterminado após 6 Meses	50
Tabela 1	Frequência absoluta e prevalência do valor de índice de anti VHC	44
Tabela 2	Valores de índice das amostras anti-VHC positivas com resultado do RIBA e suas proteínas.	77
Tabela 3	Resultado do RIBA comparado com o valor de índice de anti-VHC.	45
Tabela 4	Frequência absoluta e relativa dos resultados do RIBA conforme a presença de bandas.	46
Tabela 5	Reatividade do RIBA por bandas.	47
Tabela 6	Valores de índice das amostras anti-VHC indeterminadas com resultado do RIBA e suas proteínas.	48
Tabela 7	Comparativo dos resultados do valor de índice de anti-VHC e RIBA obtidos nas duas amostras.	49
Tabela 8	Comparação dos resultados do VHC RNA com RIBA.	51
Tabela 9	Frequência dos genótipos nas amostras VHC-RNA detectável.	51
Tabela 10	Comparação dos padrões de positividade com presença de viremia e genótipo do VHC em amostras positivas de anti-VHC.	52
Tabela 11	Fatores de risco associados com a prevalência de anti-VHC em doadores de sangue.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-VHC	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
b-DNA	DNA ramificado (<i>branched-DNA</i>)
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doença sexualmente transmissível
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FDA	Food and Drug Administration
Fiocruz	Fundação e Instituto Oswaldo Cruz
HEMOBA	Fundação Baiana de Hematologia e Hemoterapia
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNANB	Hepatite não-A não-B
HSOD	Superóxido dismutase humana
IRES	Local interno de entrada ribossomal
LACEN	Laboratório Central do Estado da Bahia
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NAT	Teste de ácido nucléico
NCR	Regiões não codificantes

NS	Não estrutural(is)
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
PCR	Reação da polimerase em cadeia (<i>polimerase chain reaction</i>)
RIBA	Ensaio de imunoblot recombinante (<i>recombinant immunoblot assay</i>)
RFLP	Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa (<i>reverse transcription</i>)
S/CO	Relação entre densidade ótica da amostra e <i>cutoff</i>
TMA	Amplificação mediada por transcrição (<i>transcription mediated amplification</i>)
UDI/IDU	Usuários de drogas intravenosas/injetáveis
IU/mL	Unidades internacionais/mililitro
VHC/VHC	Vírus da hepatite C (<i>hepatitis C vírus</i>)
VHC-RNA	Ácido ribonucléico do vírus da hepatite C
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	HISTÓRICO	15
3.2	O VÍRUS DA HEPATITE C	17
3.3	EPIDEMIOLOGIA	19
3.4	TRANSMISSÃO	21
3.5	TESTES DIAGNÓSTICOS	23
3.5.1	Testes sorológicos de triagem	24
3.5.2	Testes sorológicos suplementares	28
3.5.3	Diagnóstico molecular do VHC	32
3.5.3.1	Detecção qualitativa do VHC-RNA	33
3.5.3.2	Detecção quantitativa do VHC-RNA	34
3.5.4	Genotipagem do vírus	37
4	OBJETIVOS	40
4.1	OBJETIVO GERAL	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	TIPO DE ESTUDO	41
5.2	AMOSTRA	41
5.2.1	Amostras de Sangue e Plasma	41
5.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42

5.4	SOROLOGIA PARA O ANTI-VHC	42
5.5	TESTE SUPLEMENTAR PARA O ANTI-VHC	42
5.6	DETECÇÃO DO VHC-RNA	42
5.7	GENOTIPAGEM	42
5.8	CARGA VIRAL DO VHC RNA	43
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6	RESULTADOS	44
6.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	44
6.2	PERFIS SOROLÓGICOS DAS AMOSTRAS	44
6.3	DETECÇÃO DO VHC-RNA.....	50
6.3.1	Carga viral do VHC RNA	51
6.3.2	Genotipagem	51
6.4	ANÁLISES DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	52
7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÕES	62
9	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (VHC) é o agente etiológico da hepatite C anteriormente denominada hepatite não-A e não-B. A infecção causada pelo VHC é comumente assintomática, apresenta uma elevada taxa de cronicidade e pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que existam no mundo cerca de 130 milhões de pessoas infectadas pelo VHC. A transmissão do vírus ocorre principalmente por via parenteral, através de transfusão de sangue e hemoderivados, utilização de agulhas e seringas contaminadas, transplante de órgãos e tecidos infectados.

O diagnóstico da infecção pelo VHC é feito inicialmente pela triagem sorológica do anticorpo anti-VHC. Entretanto um único teste positivo para o anti-VHC não é definitivo para o diagnóstico. É necessário a realização de testes suplementares tais como o teste immunoblot recombinante (RIBA) e a detecção do RNA do VHC (VHC-RNA). O RIBA identifica anticorpos específicos contra o VHC enquanto que a detecção do VHC-RNA determina a presença de vírus, indicando a infecção existente. A detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C utilizando-se um imunoensaio enzimático (EIA) para uma triagem primária, seguida de confirmação pelo RIBA, foi inicialmente a principal ferramenta utilizada para o diagnóstico da infecção pelo VHC.

Em bancos de sangue, a triagem do VHC é realizada utilizando-se o teste de terceira geração de EIA. Este teste tem uma alta sensibilidade, de ~99.8%, e reduz a janela imunológica para aproximadamente dez semanas, mas apresenta um baixo valor preditivo para populações de baixo risco de infecção pelo VHC,

como os doadores de sangue, causando um elevado número de resultados falso-positivos.

O resultado do anti-VHC é determinado pela relação da densidade ótica da amostra dividida pelo valor de cutoff (S/CO). Alguns estudos afirmam que o resultado de anti-VHC com baixo valor da relação S/CO é indicativo de resultado falso-positivo. Neste caso, a utilização do RIBA para confirmação de anticorpos anti-VHC se faz necessária, principalmente se o VHC-RNA for indetectável.

A vantagem do RIBA é que um resultado negativo em indivíduos sem fatores de risco para o VHC, elimina a realização do VHC-RNA. Entretanto, o resultado indeterminado, em doadores de sangue, precisa ser investigado e acompanhado para se descartar resultado falso-positivo, uma vez que o RIBA com resultado indeterminado pode representar infecção passada ou o início de uma infecção onde nem todos os anticorpos estão presentes.

O RIBA pode ainda identificar portadores do VHC que estejam na fase inicial da doença, na qual os anticorpos estão em baixa concentração e também em períodos de intermitência da replicação viral, onde o VHC-RNA está negativo.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do RIBA como teste suplementar sorológico para o diagnóstico da hepatite C em doadores de sangue com resultado de anti-VHC reagente. Para tanto, foi realizada uma avaliação dos resultados do RIBA nas amostras que foram repetidamente positivas para o anti-VHC. As amostras com resultado indeterminado no RIBA foram repetidas seis meses após, com nova coleta, para confirmação do resultado. Todas as amostras foram submetidas ao teste de biologia molecular VHC-RNA, e aquelas com VHC-RNA detectável foram analisadas quanto à carga viral e ao genótipo.

2 JUSTIFICATIVA

O RIBA está caindo em desuso por apresentar um elevado número de resultados indeterminados e apesar de confirmar a presença ou não do anti-VHC, o RIBA não identifica se a infecção está ativa, sendo necessária a pesquisa do vírus. Por outro lado, os testes de biologia molecular que detectam a presença do vírus têm um menor custo e desta forma estão cada vez mais acessíveis aos laboratórios de referência.

Entretanto, em amostras com baixa positividade para o anti-VHC, freqüentemente encontradas em população de baixo risco como os doadores de sangue, raramente o VHC-RNA é detectável, sendo necessária a realização do RIBA para descartar os resultados falso-positivos para os anticorpos do VHC.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO

O vírus da hepatite C (VHC) é o agente etiológico da hepatite C antes denominada hepatite não A e não B (HNANB). Foi identificado e parcialmente caracterizado em 1989 através do genoma de vírus isolados de soros de pacientes com HNANB pós transfusão (CHOO, et al.,1989). A descoberta do VHC representa o primeiro sucesso na aplicação de técnicas moleculares para descoberta de novos agentes infecciosos (FARCI, 2002).

Estudos de seguimento prospectivo das hepatites associadas à transfusão contribuíram para o conhecimento do agente da HNANB (FARCI, 2002; SEEF, 2009) bem como o uso do modelo animal com chimpanzés foi essencial para caracterização do vírus (FARCI, 2002; JOYCE; TYRREL, 2010).

A clonagem do genoma do VHC levou ao desenvolvimento de teste sorológico para detecção de anticorpos específicos contra o vírus da hepatite C por Kuo e colaboradores em 1989. A partir de 1990, com a introdução do teste anti-VHC na triagem das amostras de doadores de sangue diminuiu consideravelmente a infecção por VHC associada à transfusão nos países desenvolvidos (FARCI, 2002; LAUER; WALKER, 2001).

Os alvos naturais do VHC são os hepatócitos e possivelmente linfócitos B (LAUER; WALKER, 2001). Entretanto, o vírus já foi detectado em monócitos do sangue periférico e em células hematopoiéticas (LERAT, et al., 1996).

O VHC causa infecção aguda e crônica, com diferentes graus de gravidade, podendo desenvolver manifestações extra-hepáticas, com a estimulação crônica do sistema imune e auto imunidade induzida pelo vírus (ALBERTI, et al., 1999).

O VHC tem como característica a habilidade de persistir no hospedeiro, causando infecção crônica em cerca de 80% dos casos, e pode evoluir para cirrose e para a forma mais grave da doença – carcinoma hepatocelular (ALTER, 1995). A história natural da infecção pelo VHC é de difícil avaliação devido a vários fatores: O início silencioso da fase aguda e a escassez de sintomas nos estágios iniciais da fase crônica (LAUER; WALKER, 2001); o desconhecimento da época da contaminação; a presença de co-morbidades (etilismo crônico e co-infecções virais); a existência de diferentes genótipos e carga viral (THOMAS, et al., 2000) ou ainda fatores relacionados ao hospedeiro como o sistema imune, idade, sexo e pleomorfismo genético (FARCI, et al., 1992) que tem um papel fundamental em mudar a evolução clínica da doença.

3.2. O VÍRUS DA HEPATITE C

O VHC está classificado no gênero *Hepacivirus*, dentro da família *Flaviviridae*, que inclui os vírus implicados com as clássicas flavivirose, tais como a febre amarela, os vírus da dengue, pestivirose animal, como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o vírus da gripe bovina (GB) (ALTER, 1995; FARCI, 2002; MORADPOUR; BLUM, 2004).

O VHC é um vírus RNA de aproximadamente 50 nm de diâmetro, com envelope e genoma de fita simples e polaridade positiva (CHOO, et al., 1989; FARCI, 2002) com 9,7 kilobases composta de uma região não codificada 5' (5'NCR), uma poliproteína de longa fase de leitura aberta (ORF) com cerca de 3.000 aminoácidos codificados e uma região não codificada 3' (3'NCR) (JOYCE; TYRREL, 2010; LAUER; WALKER, 2001; MORADPOUR; BLUM, 2004). (Figura 1)

A região 5'NCR é altamente conservada e contém um local interno de entrada ribossomal (IRES) que direciona a translação viral. A região 3'NCR é curta e variável, altamente conservada com 98 nucleotídeos e é essencial para replicação viral (JOYCE; TYRREL, 2010; MORADPOUR; BLUM, 2004).

As proteínas estruturais incluem a proteína central (*core*) que forma o capsídeo viral e as glicoproteínas do envelope E1 e E2. As proteínas não estruturais incluem a NS2-3 autoprotease e a NS3 serina protease, uma helicase RNA localizada na região C-terminal da NS3, a proteína polipeptídica NS4A, as proteínas NS4B e NS5A, e a proteína NS5B RNA polimerase dependente de RNA - RdRp (MORADPOUR; BLUM, 2004 ; PENIN, et al., 2004).

A junção entre as proteínas estruturais e não estruturais é feita por um polipeptídeo p7 constituído de 63 aminoácidos composto por duas proteínas transmembranas, ambas com dois domínios N e C terminal orientados em direção ao lúmen do retículo endoplasmático. O p7 não é essencial para replicação do RNA, mas existem relatos sobre sua atividade como canal de íons (DUBUISSON, 2007; MORADPOUR; BLUM, 2004).

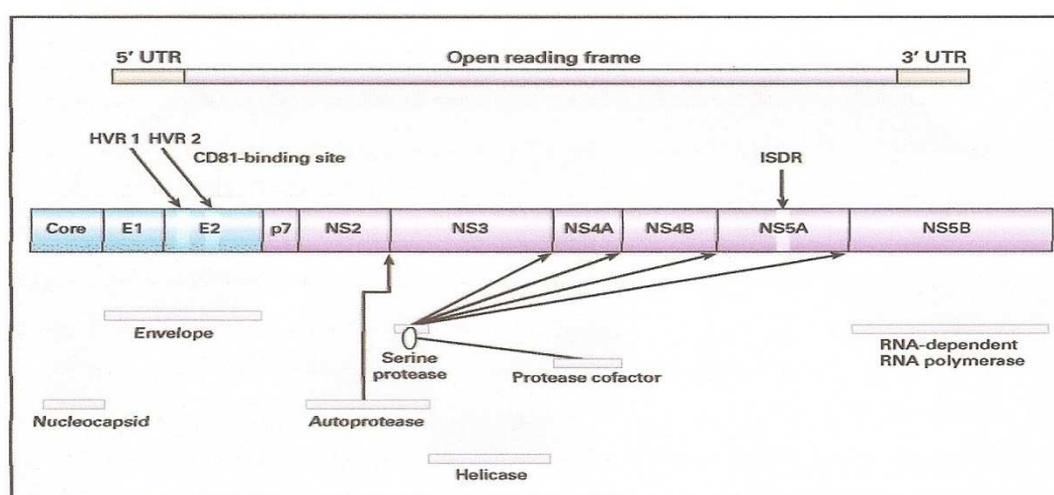


Figura 1. Genoma do VHC e Poliproteínas expressadas (Lauer & Walker, 2001).

O VHC tem composição que varia em pacientes, animais e sistema de cultura de tecidos infecciosos. A análise do gradiente de densidade do soro ou sobrenadante destas fontes revelou que o RNA do VHC é encontrado em ambas as frações de densidade baixa (1,06 – 1,15 g/mL) e alta (1,17 – 1,25 g/mL) (JOYCE; TYRREL, 2010).

A caracterização das frações virais de baixa densidade obtidas de soro de pacientes infectados indicam a presença de proteínas apoB e apoE, triglicerídes e colesterol (JOYCE; TYRREL, 2010; SYED, et al., 2009). Muitos lipídeos são cruciais para a replicação do vírus e inibidores da via de biossíntese dos ácidos

graxos e colesterol inibem a replicação, maturação e secreção do vírus nas células (SYED et al, 2009). Além disso, estudos mostraram que o receptor de LDL, quando bloqueado, pode impedir a entrada do VHC, indicando que o receptor de LDL é co-receptor da entrada de VHC (Joyce; Tyrrel, 2010).

O vírus apresenta uma diversidade no seu genoma graças à região hipervariável E2 (OGATA et al, 1991). Através de análises filogenéticas o VHC foi classificado em seis principais genótipos baseados na seqüência de similaridade dos nucleotídeos, sendo que dentro de alguns destes grupos são observados dois ou três grupos com variantes intimamente relacionadas. Os grupos principais de variação da seqüência dos nucleotídeos são denominados de tipos, enquanto que os grupos relacionados intimamente dentro de alguns tipos são denominados de subtipos. Os tipos são representados por números Arábicos e os subtipos por letras minúsculas (SIMMONDS, et al., 1993; SIMMONDS, et al., 1994)

O complexo de variantes genéticas encontradas em um indivíduo isoladamente é chamado de quasispecies. A composição das quasispecies de VHC resulta da acumulação de mutações durante a replicação viral no hospedeiro (ZEIN, 2000).

3.3 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

A infecção pelo vírus da hepatite C é um problema mundial de saúde pública e estima-se que 2,2% da população mundial esteja infectada, o que equivale a cerca de 130 milhões de portadores do VHC, sendo que a cronificação da doença ocorre em torno de 70% dos casos. A prevalência mais baixa do VHC é de 0,01% a 0,1%, no Reino Unido e na Escandinávia, enquanto que a prevalência mais alta é de 15 a 20%, no Egito (ALTER, 2007; TE; JENSEN, 2010).

No Brasil, não se conhece com precisão a prevalência do VHC (FERREIRA; SILVEIRA, 2004). Dados preliminares do Inquérito Nacional de base populacional das hepatites virais nas capitais brasileiras revelaram uma prevalência entre 0,9 a 1,9% (BRASIL, 2008). Na Bahia, um estudo de base populacional realizado na capital revelou uma prevalência de 1,5% para o VHC (ZARIFE, et al., 2006).

A identificação do genótipo do VHC permite obter informações epidemiológicas e clínicas relacionadas ao tratamento, uma vez que os genótipos podem mostrar susceptibilidade diferente ao tratamento com interferon. Os genótipos 1 e 4 são mais resistentes ao tratamento antiviral do que os genótipos 2 e 3 (SIMMONDS, et al., 1996; SIMMONDS, et al., 2005).

As informações sobre genótipos e subtipos são importantes para o estudo da distribuição e rota de transmissão. Há uma distribuição geográfica diferenciada em relação aos genótipos do VHC (FERREIRA; SILVEIRA, 2004). Embora, os genótipos 1, 2 e 3 apresentem uma distribuição mundial, suas prevalências relativas variam de uma área geográfica a outra. Os subtipos 1a e 1b são mais comuns nos Estados Unidos e também são predominantes na Europa. No Japão, o subtipo 1b é responsável por 73% dos casos de infecção pelo VHC. O genótipo 2 é encontrado na América do Norte, Europa e Japão. O genótipo 3a é particularmente prevalente em usuários de drogas intravenosas na Europa e Estados Unidos. O genótipo 4 prevalece na África do Norte, Egito e Oriente Médio (ZEIN, 2000). Os genótipos 5 e 6 são quase exclusivos da África do Sul e Hong Kong respectivamente (BUKH, et al., 1993). Entretanto, Blanton e col. (2005) relataram a presença dos genótipos 1 e 5 no Egito.

No Brasil, estudos realizados nas regiões Sudeste (BASSIT, et al., 1999), Sul (KRUG, et al., 1996) e Nordeste em amostras de conveniência (SILVA, et al., 2000; PARANA, et al., 2000) revelaram um predomínio do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2, sendo que o único estudo de base populacional realizado no Brasil revelou o predomínio do genótipo de 3, seguido pelos genótipos 1 e 2 (ZARIFE, et al., 2006). Outros estudos voltados para prevalência entre doadores de sangue (TORRES, et al., 2009), usuários de drogas injetáveis (SILVA, et al., 2010), hemofílicos (SILVA, et al., 2005) e pacientes hemodialisados (AMORIM, et al., 2010; SILVA, et al., 2006) revelaram a maior prevalência do genótipo 1 seguido do genótipo 3. Os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados no Brasil, havendo relatos apenas no estado de São Paulo e Bahia (ZARIFE, et al., 2006).

3.4 TRANSMISSÃO

O vírus da hepatite C é transmitido ao homem por exposição a sangue infectado (ALTER, 2002). Seringas não esterilizadas, sangue não testado bem como produtos obtidos de sangue são fontes de transmissão do VHC (PRATI, 2006).

Os fatores de risco identificados para adquirir a infecção incluem transfusão de sangue e produtos de sangue, transplantes de órgãos sólidos de doadores infectados, uso de drogas injetáveis lícitas e ilícitas, injeções terapêuticas não seguras, exposição ocupacional ao sangue, recém nato de mãe infectada, com carga viral elevada no momento do parto e co-infectada com VHC e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), hemodiálise, tatuagens, procedimentos médicos e odontológicos, acupuntura, inalação de drogas com uso de canudos contaminados, sexo com parceiro infectado e múltiplos parceiros (ALTER, 2002). Entre estes, a

transusão de sangue não testado, uso de drogas injetáveis ilícitas e injeções terapêuticas não seguras são as mais importantes (ALTER, 2006).

Embora o risco de transmissão do VHC através da atividade sexual e contato familiar sejam controversos, a transmissão por estas exposições podem ocorrer ainda que em baixa frequência (ALTER, et al., 1998). A presença do VHC-RNA tem sido encontrada em fluídos do corpo, como saliva (LINS, et al., 2005), líquido ascítico, urina, sêmen (LIOU, et al., 1992), leite materno (KUMAR; SHAHUL, 1998), fezes (BELD, et al., 2000), e secreções cérvico-vaginal (BÉLEC, et al., 2003).

A contribuição de secreções genitais para disseminação do vírus não é clara, mas sexo não protegido envolve sangue ou micro trauma que é um meio possível de transmissão (THOMPSON, et al., 2003). Estudos sugerem que indivíduos sem risco parenteral de infecção poderiam ter adquirido a infecção pela via sexual (ABOU-SETTA, 2004; RÈ, et al., 2008). Por outro lado, o estudo realizado por Bessa e col. (2009) demonstrou que a transmissão do VHC entre parceiros de casais heterossexuais estáveis é mínima ou insignificante. Nos homossexuais usuários de drogas, heterossexuais com múltiplos parceiros e profissionais do sexo a taxa de transmissão é mais alta (ABOU-SETTA, 2004).

A transmissão intra familiar do VHC pode ainda ocorrer com o compartilhamento de itens pessoais como lâminas de barbear, alicate de unha e escova de dente por cônjuges e filhos (STRAUSS, 2001; THOMPSON, et al., 2003).

Alguns estudos sugerem que os diferentes genótipos de VHC podem estar associados com diferentes fontes de infecção. No Paquistão, o genótipo 3a é o mais prevalente e 85% dos pacientes infectados com este genótipo receberam

múltiplas injeções, o genótipo 1a e 1b estão relacionados a pequenas cirurgias e tratamento dentário e o genótipo 2 a nenhuma aparente causa de transmissão (IDRESS; RIAZUDDIN, 2008). Além disso, alguns grupos de pesquisa, utilizando ferramentas epidemiológicas e moleculares, demonstraram que o surgimento dos principais tipos de VHC em diferentes países coincide com surtos de tratamento parenteral não seguro, como por exemplo, a terapia parenteral anti esquistossomose utilizada no Japão e Egito (PRATI, 2006).

Por fim, no atual cenário, desde a introdução do teste anti-VHC em banco de sangue, o risco residual de transmissão por transfusão sanguínea só ocorre quando o sangue é coletado durante o período de janela imunológica do doador (PONDÉ, 2010).

3.5 TESTES DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico laboratorial do VHC pode ser realizado através de testes sorológicos que irão detectar os anticorpos contra o vírus da hepatite C e técnicas de biologia molecular que vão detectar o VHC-RNA.

Desde a descoberta do vírus da hepatite C em 1989, houve muitos avanços na área de testes de diagnóstico para hepatite C, tais como redução da janela imunológica, melhora na detecção do VHC em paciente imunossuprimido e aumento da sensibilidade para detectar anticorpos contra diferentes epítomos específicos dos genótipos do VHC (GRETCH, 1997; CHIEN, et al., 1999). Os testes que detectam anticorpos anti-VHC são utilizados tanto para triagem como para o diagnóstico da infecção pelo VHC (GHANY, et al., 2009).

3.5.1 Testes sorológicos de triagem

O primeiro teste sorológico para diagnosticar o VHC foi desenvolvido por Kuo e col. (1989), que utilizaram o antígeno recombinante, C100-3 derivado da região não estrutural NS4 para revestir os poços da placa de micro titulação e assim capturar os anticorpos do VHC presentes nas amostras de sangue. Este teste foi denominado de ELISA (ensaio imunoenzimático) de primeira geração para anti-VHC. A sensibilidade deste teste foi de 80% em populações de alto risco e a frequência de falso positivo em populações de baixo risco foi de 70% (CONTRERAS, 2006; GRETCH, 1997; BRANDÃO, et al., 2001).

O teste de segunda geração surgiu em 1992, sendo incorporadas duas proteínas recombinantes do VHC: c22-3 derivada da região *core* e c33-c derivada da região não estrutural NS3. A proteína c33 foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200 (ALTER, 1992). A introdução de novos antígenos levou a uma melhora substancial na sensibilidade e um leve aumento na especificidade relativa ao ELISA de primeira geração (GRETCH, 1997). A média da janela imunológica de soroconversão foi reduzida de 16 semanas com o ELISA de primeira geração para 10 semanas com o ELISA de segunda geração (RICHTER, 2002).

Em 1996, foi aprovado o teste de terceira geração que contém antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos da região *core*, NS3 e foi adicionado um antígeno da região NS5 (GRETCH, 1997; BRANDÃO, et al., 2001). A principal vantagem desta versão foi a redução do tempo médio para demonstração da soroconversão que passou para 7 a 8 semanas, além da sensibilidade que aumentou para 97% e a especificidade maior que 95%, em situações de alta prevalência. Em populações de doadores de sangue parece ser melhor do que o

ELISA de segunda geração (GRETCH, 1997). A maior sensibilidade do ELISA de terceira geração é atribuída à nova configuração dos antígenos já presentes no ELISA de segunda geração e não à presença do antígeno NS5 (BARRERA, et al., 1995; GRETCH, 1997; TOBLER, et al., 2003).

Os testes imunoenzimáticos são fáceis de executar e baratos. Podem ser parcialmente ou totalmente automatizados. Na ausência de um teste padrão ouro para os anticorpos do VHC, a atual sensibilidade do teste anti-VHC não pode ser determinada. Em populações imunocompetentes, com alta prevalência, a sensibilidade foi estimada entre 98,8% a 100% e a especificidade > 95%, enquanto que em população de baixa prevalência, como os doadores de sangue saudáveis, a sensibilidade foi estimada em > 97% e a especificidade entre 50-60 % (PAWLOTSKY, 1999; KRAJDEN, 2000).

Resultados falso-positivos para anti-VHC são mais prováveis em população cuja prevalência da hepatite C é baixa, como nos doadores de sangue ou ainda em reações cruzadas com outros antígenos virais ou desordens imunológicas. Resultados falso-negativos são observados em pacientes com imunossupressão, como na infecção pelo HIV, nos receptores de transplante de órgãos sólidos, na hipo ou agamaglobulina e em pacientes hemodialisados (GHANY, et al., 2009; PAWLOTSKY, 1999).

Atualmente, existem outras metodologias além da ELISA que detectam o anti-VHC, como o teste de quimioluminescência (CIA) e o de micropartícula imunoensaio (MEIA), que utilizam os mesmos antígenos utilizados na metodologia de ELISA (CONTRERAS, 2006). Os testes por quimioluminescência apresentam uma melhora significativa na especificidade, melhor valor preditivo positivo e sensibilidade similar aos testes de ELISA (KIM, et al., 2008). O estudo de Dufuor e

col.(2003) demonstrou um valor preditivo positivo do teste anti-VHC por ELISA de 93% enquanto que por quimioluminescência foi de 98%. Deve-se ressaltar também que os testes automatizados por quimioluminescência vêm ocupando o lugar dos testes por ELISA pela praticidade do seu uso (PARISE, 2009).

O teste ARCHITECT anti-VHC é um imunoensaio de duas etapas, utilizando a metodologia de quimioluminescência por micropartículas (CMIA). Na primeira etapa, a amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas de antígeno recombinante do VHC e diluente de ensaio são combinadas.

O anti-VHC presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas de VHC. Após a lavagem, o conjugado anti-humano marcado com acridínio é adicionado na segunda etapa. Seguindo outro ciclo de lavagem, as soluções pré-deflagradora e deflagradora são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida como unidades relativas de luz (URLs). Existe uma relação direta entre a quantidade de anti-VHC na amostra e as URLs detectadas pelo sistema óptico do ARCHITECT.

A presença ou a ausência de anti-VHC na amostra é determinada comparando o sinal quimioluminescente na reação ao sinal de *cutoff* determinado a partir de uma calibração do ARCHITECT anti-VHC previamente gerada. Se o sinal quimioluminescente na amostra for maior que ou igual ao sinal de *cutoff*, a amostra é considerada reativa para anti-VHC.

O ARCHITECT anti-VHC foi desenvolvido para detectar anticorpos para proteínas estruturais e não estruturais do genoma do VHC. O reagente é composto de duas proteínas recombinantes:

- A proteína HCr43, expressa na *Escherichia coli*, é composta por duas regiões de codificação não contínuas da seqüência do genoma do VHC. A

primeira região representa o peptídeo dos aminoácidos 1192 a 1457 (33c) e a segunda região representa o peptídeo dos aminoácidos 1 a 50 (core) da seqüência do VHC.

- A proteína c100-3 é expressa no *Saccharomyces cerevisiae* (levedura). A organização genômica dos flavivírus sugere que a seqüência clonada está contida dentro das regiões do VHC supostamente não estruturais – NS3 e NS4.

Outros testes sorológicos surgiram para auxiliar no diagnóstico da hepatite C, tais como a detecção simultânea do antígeno do *core* da hepatite C e anti-VHC por ELISA. Este teste é útil em situações onde há uma emergência em diagnosticar a infecção pelo VHC, triagem em banco de sangue para reduzir o risco residual de transmissão do VHC ou em triagem de doadores para transplante de órgãos (LAPERCHE, et al., 2005).

O teste para detecção do antígeno do *core* do VHC está disponível por ELISA ou quimioluminescência. Este teste foi concebido inicialmente para triagem em banco de sangue, reduzindo a janela imunológica que ocorre antes da soroconversão durante a infecção aguda (BOUVIER-ALIAS, et al., 2002). Em alguns países, a detecção do antígeno *core* do VHC foi utilizado como alternativa para substituir o teste de ácido nucléico (NAT) para diagnosticar o início da infecção (LAPERCHE, et al., 2005). A cinética do antígeno *core* está intimamente relacionada com a cinética do VHC-RNA e o teste pode ser usado como um marcador de replicação do VHC (PAWLOTSKY, 2002; ROSS, et al., 2010).

Os anticorpos anti-VHC são avaliados pela relação obtida dividindo-se a densidade óptica da amostra analisada pelo valor de cutoff (S/CO). O valor da relação S/CO é diretamente relacionada à concentração de anticorpos, sendo que

níveis baixos da relação S/CO está associada a resultados falso-positivos, enquanto que níveis mais altos estão associados a resultados verdadeiramente positivos para o anti-VHC, independente da prevalência da hepatite C (CONTRERAS, et al., 2008).

De acordo com o CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, U.S.A.) as análises dos dados da ELISA e quimioluminescência indicam que a relação S/CO pode ser utilizada para prever um resultado positivo de um teste suplementar. Uma relação específica S/CO pode ser identificada para cada teste (Anexo I), que poderá prever um resultado do anticorpo VHC verdadeiramente positivo em $\geq 95\%$ dos casos, independentemente da prevalência do anti-VHC ou características da população que está sendo estudada.

Desde 2003, o CDC também recomenda que todo teste de triagem positivo para anti-VHC deve ser confirmado com um teste suplementar sorológico ou NAT, sendo preferencialmente o RIBA (Recombinant immunoblot assay) como teste suplementar sorológico, devido a sua alta especificidade (Anexo II), bem como definiu uma referência para interpretação dos resultados dos testes para hepatite C (Anexo III).

No Brasil, o Ministério da Saúde definiu um fluxograma laboratorial para diagnóstico da hepatite C, no qual não consta a obrigatoriedade da realização do teste suplementar sorológico para a confirmação do diagnóstico da hepatite C (Anexo IV).

3.5.2 Testes sorológicos suplementares

O RIBA é um teste suplementar sorológico que utiliza os mesmos antígenos do ELISA, mas que apresenta uma maior especificidade para o anti-VHC. Ele foi

desenvolvido para distinguir as reatividades sorológicas específicas das não específicas encontradas no teste de ELISA (SILVA; ROSSETI, 2001).

O RIBA foi aprovado em 1993 pelo FDA (Food and Drug Administration) na versão de segunda geração, que permitia detectar anticorpos individuais contra três antígenos recombinantes do VHC: c22 (core), c33 (NS3) e c-100 sobreposta com 5-1-1 (NS4) (LOK; GUNARATNAM, 1997). Desde 1999, já está disponível o RIBA de terceira geração, que difere do RIBA de segunda geração devido a adição de uma proteína recombinante da região NS5, passando a detectar anticorpos contra quatro diferentes regiões do genoma do vírus, além da proteína recombinante hSOD para detectar anticorpos não específicos (LOK; GUNARATNAM, 1997; RICHTER, 2002; URDEA, et al., 1997).

O teste do RIBA se baseia na reação de anticorpos contra antígenos imobilizados na fita de nitrocelulose. Quando não há reações contra qualquer dos antígenos, o teste é considerado negativo. Quando há reação apenas para uma proteína, indeterminado. No caso de reação a duas bandas do RIBA ou mais, é considerado positivo (SOUTO, et al., 2002).

Tecnicamente, os testes suplementares não são considerados confirmatórios, uma vez que contêm os mesmos antígenos presentes no teste de ELISA. Entretanto, o RIBA identifica anticorpos a antígenos individuais, o que lhe garante uma maior especificidade quando comparado com os testes de ELISA (LOK; GUNARATNAM, 1997). Outra limitação dos testes suplementares se dá pela falha em detectar a infecção durante a janela imunológica em que os anticorpos estão ausentes ou presente em baixa concentração (BARRETO, et al., 2008).

O desenvolvimento do RIBA de terceira geração ajudou a resolver muitos casos de amostras indeterminadas com o teste de segunda geração (LOK;

GUNARATNAM, 1997; URDEA, et al., 1997). Contudo, apesar dos avanços, ainda existem muitos casos de amostras indeterminadas com o teste de terceira geração e a avaliação clínica e a detecção do VHC-RNA são recomendados para resolver estes casos indeterminados (URDEA, et al., 1997). Resultados indeterminados do RIBA têm sido observados em pessoas infectadas recentemente, que estão em processo de soroconversão e ocasionalmente em pessoas infectadas cronicamente com VHC. Os resultados indeterminados também podem indicar um resultado de triagem falso positivo, que é a interpretação mais comum para este resultado em população de baixo risco para a infecção do VHC (CDC, 2003).

O CHIRON® RIBA® HCV 3.0 SIA é um teste imunoblot qualitativo *in vitro*, que utiliza antígenos codificados do VHC recombinantes e peptídeos sintéticos codificados do VHC imobilizados como bandas individuais sobre as tiras de teste. Os dois antígenos recombinantes (c33c e NS5) e dois dos peptídeos sintéticos (c100p e 5-1-1p) são derivados das regiões não estruturais do vírus, enquanto que o terceiro peptídeo (c22p) corresponde à suposta proteína viral do nucleocapsídeo (núcleo). Uma vez que os antígenos recombinantes c33c e NS5 do VHC são produzidos como proteínas de fusão individual com superóxido dismutase humano (hSOD), o recombinante hSOD foi incluído também como uma banda de controle na tira. A banda de controle hSOD permite a detecção de anticorpos contra o hSOD, que não são específicos para as porções codificadas do VHC dos antígenos recombinantes do VHC. O antígeno c33c do VHC é produzido em *E. coli*, enquanto que o antígeno NS5 do VHC e o hSOD são produzidos em *S. cerevisiae*.

O CHIRON® RIBA® HCV 3.0 SIA é um teste de três fases. Na primeira fase, os controles da reação e as amostras são diluídos e incubados com as tiras. Os anticorpos específicos do VHC se estiverem presentes, irão ligar-se aos

antígenos recombinantes e/ou de peptídeos sintéticos, correspondentes nas tiras. A remoção dos componentes de soro/plasma que não se ligaram é realizada por aspiração e lavagem.

Na segunda fase, as tiras são incubadas na presença de um conjugado de anti-IgG humano de cabra conjugado com peroxidase. O conjugado liga-se à parcela de IgG humana dos complexos de antígeno-anticorpo. A remoção do conjugado que não se ligou é obtida por decantação e etapas subsequentes de lavagem.

Na terceira fase, é acrescentado um sistema colorimétrico de detecção de enzimas, composto de peróxido de hidrogênio e 4-cloro-1-naftol. Se a ligação conjugada estiver presente, a reação enzimática produzirá um produto de reação de coloração azul-preta insolúvel para cada antígeno, peptídeo ou controle, específicos do VHC. Após o desenvolvimento da cor na tira, a reação é interrompida pela remoção dos reagentes e das etapas de lavagem final. Os padrões visuais das bandas desenvolvidos são resultados da ligação dos anticorpos específicos a cada um dos antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos presentes na tira. A reatividade da amostra para cada antígeno é determinada comparando-se visualmente a intensidade de cada banda formada, com as bandas de controle interno de IgG humano alto e baixo, presentes em cada tira.

O RIBA é um teste tecnicamente mais trabalhoso que o ELISA, porém é mais simples que os NAT (LOK; GUNARATNAM, 1997). Pode ser realizado na mesma amostra coletada para o teste de triagem, tem um custo menor para verificar o resultado de um teste positivo com baixa relação de S/CO e o seu resultado define o resultado do teste de triagem anti-VHC (CDC, 2003). Apesar

disso, a disseminação e disponibilidade dos NAT fizeram com que a utilização do RIBA diminuísse em alguns países (GHANY, et al., 2009).

O RIBA é necessário para identificar resultados falso positivos no ELISA, particularmente em população de baixa prevalência do VHC, tais como doadores de sangue, estudantes e a população em geral, quando o fator de risco não é evidente (CONTRERAS, et al., 2008). A positividade do RIBA não significa viremia nem infecção contínua do VHC, pois o anti-VHC pode permanecer positivo por tempo indeterminado (LOK; GUNARATNAM, 1997; SOUTO, et al., 2002).

Além do RIBA, existem outros testes suplementares por immunoblot para pesquisa do anti-VHC, de similar sensibilidade, produzidos por outros fabricantes como , por exemplo, o teste Matrix HCV (Abbott Laboratories, Chicago, Estados Unidos) ou o InnoLia HCV III (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica) (BRANDÃO, et al., 2001).

3.5.3 Diagnóstico molecular do VHC

A biologia molecular desempenha um papel importante no diagnóstico e monitoramento do tratamento da hepatite C. As técnicas moleculares foram fundamentais para identificação do VHC, tornando-o o primeiro patógeno a ser identificado exclusivamente por diagnóstico molecular (CHOO, et al., 1989). Atualmente, a infecção pelo VHC é confirmada pela detecção do RNA viral através dos testes de ácidos nucleicos. Estes testes também são utilizados para monitorar a resposta da terapia antiviral (SCOTT; GRETCH, 2007).

Os testes de ácido nucleico detectam diretamente a presença do VHC-RNA. Em geral são bastante sensíveis e específicos. Um resultado negativo de um NAT seguido de um resultado sorológico positivo para anti-VHC indica um infecção

resolvida. Entretanto, intermitência ou baixo nível de viremia pode ocorrer durante a infecção crônica e por isso um único NAT negativo não é conclusivo e deve ser repetido entre seis e doze meses depois. Um resultado positivo para o NAT VHC pode indicar infecção aguda, independente da presença de anti-VHC (ALTER, et al., 1998; SCOTT & GRETCH, 2007). Neste caso, o VHC-RNA torna-se detectável entre uma a três semanas após exposição (RICHTER, 2002). Os testes de ácido nucléicos para o VHC podem ser qualitativos e quantitativos.

3.5.3.1 Detecção qualitativa do VHC-RNA

Os testes de detecção qualitativa se baseiam no princípio da amplificação alvo usando a transcrição reversa “convencional” Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR), “*real-time*” PCR ou amplificação mediada por transcrição (TMA) (PAWLOTSKY, 2002).

O princípio das técnicas de amplificação alvo é sintetizar um grande número de cópias do genoma viral (amplicons) em uma reação enzimática cíclica. Os amplicons podem ser detectados por vários métodos e a quantidade de genoma viral na amostra clínica pode ser quantificada (PAWLOTSKY, 2002).

As cópias da dupla fita de DNA do genoma do VHC são sintetizadas em testes baseados em PCR enquanto que as cópias de uma fita simples de RNA são geradas nos testes baseados em TMA (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006). A detecção dos produtos amplificados é obtida pela hibridização dos amplicons produzidos com sondas específicas após reações em técnicas de RT-PCR ou TMA. No PCR de tempo real, cada ciclo de amplificação leva a emissão de sinal fluorescente e o número de sinais por ciclo é proporcional a quantidade de VHC RNA presente na amostra (PAWLOTSKY, 2002).

O teste AMPLICOR[®] Hepatitis C Virus (HCV) Test, version 2.0 (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, USA) se baseia em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo usando indicadores específicos complementares para o VHC; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica.

A detecção qualitativa do teste VHC RNA deve ser 50 IU/mL ou menos e ter igual sensibilidade para a detecção de todos os genótipos do VHC. O teste baseado em PCR Amplicor[®] HCV v 2.0 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Califórnia) tem sensibilidade de 50 UI/mL enquanto que o teste baseado em TMA Versant[®] HCV RNA Qualitative Assay (Siemens) a sensibilidade é 10 UI/mL. O PCR *real-time*, que também pode quantificar o VHC-RNA, tem um limite de detecção mais baixo em torno de 5 – 30 UI/mL (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006).

Os NAT qualitativos são utilizados para confirmar viremia, para triagem de doadores de sangue e de órgãos, discriminar pacientes com infecção crônica daqueles com infecção aguda resolvida, diagnosticar a infecção em neonatos de mães portadoras do VHC, resolver resultados sorológicos indeterminados, monitorar pacientes em terapia antiviral e identificar o vírus em indivíduos imunocomprometidos (LOK; GUNARATNAM, 1997; SILVA; ROSSETTI, 2001).

3.5.3.2 Detecção quantitativa do VHC-RNA

A quantificação do número de cópias do VHC-RNA, no soro ou plasma, representa uma ferramenta potencialmente importante para avaliar e monitorar a infecção pelo VHC. A quantidade de VHC-RNA circulante no soro ou plasma é

denominado de carga viral e reflete ambas as taxas de replicação viral e taxa de clearance viral pelo hospedeiro infectado (GRETCH, 1997).

O VHC-RNA pode ser quantificado por meio de técnicas de amplificação alvo (PCR convencional ou PCR *real-time*) ou técnica de amplificação de sinal (branched DNA – bDNA). Existem cinco testes padronizados disponíveis comercialmente. Dois deles são baseados em PCR convencional: Amplicor HCV Monitor[®] v 2.0 (Roche Molecular Systems) e LCx[®] HCV RNA Quantitative Assay (Abbott Diagnostic); um baseado em bDNA: Versant[®] HCV RNA 3.0 Assay (Siemens); e dois são baseados em PCR *real-time*: PCR amplification, Cobas[®] Taqman HCV Test que pode ser acoplado ao extrator automatizado Cobas Ampliprep[®] (Roche Molecular Systems) e Abbott RealTime[™] HCV assay (Abbott Diagnostic) que usa o sistema Abbott m2000_{RT} e também pode usar um extrator automatizado m2000_{SP} acoplado (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006).

O AMPLICOR HCV MONITOR[®] Test, version 2.0 (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, USA) se baseia em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo, usando indicadores específicos complementares para o VHC; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo e detecção dos produtos amplificados e ligados à sonda, por determinação colorimétrica. A quantificação se dá pela utilização de uma segunda seqüência alvo (Padrão de Quantificação do VHC) que é adicionada a cada amostra de teste numa concentração conhecida. O Padrão de Quantificação do VHC é uma molécula de RNA não infecciosa, composta de 351 nucleotídeos e transcrita *in vitro*, apresentando regiões de fixação ao iniciador idênticas às da seqüência alvo do VHC. O Padrão de

Quantificação do VHC contém locais de fixação para o iniciador KY78 e KY80 e origina um produto com o mesmo comprimento (244 bases) e composição básica idêntica à do RNA do VHC alvo.

A região de fixação da sonda de amplicon do padrão de quantificação do VHC foi modificada para permitir a distinção entre o padrão de quantificação do VHC e o amplicon do VHC alvo. O padrão de quantificação do VHC é estandardizado contra o padrão internacional de VHC 96/790 da OMS (Organização Mundial de Saúde) e a concentração é expressa em Unidades Internacionais (UI) PCR. O teste apresenta um limite mínimo de detecção de 600 UI/mL e limite máximo de 850.000 UI/mL.

Os testes disponíveis para carga viral possuem unidades de medidas distintas, tornando difícil a comparação de resultados entre as diferentes técnicas. Diante disso, em 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu o primeiro padrão internacional, denominado de Unidades Internacionais (UI), para expressar o resultado da carga viral do VHC-RNA. A padronização da unidade de quantificação do VHC-RNA abre caminho para a generalização do uso do VHC-RNA quantitativo como guia no tratamento da hepatite C crônica. E, para monitorar os efeitos da terapia antiviral, é importante o uso do mesmo teste laboratorial antes e durante a terapia (ANDERSON, et al., 2003; GHANY, et al., 2009 ;PAWLOTSKY, et al., 2000).

Um dos principais avanços na quantificação do genoma viral é o PCR em tempo real, pois este método fornece uma melhor sensibilidade analítica, ampla faixa de quantificação, melhor especificidade, precisão e reprodutibilidade. Além disso, o teste detecta quantidade mínima de VHC-RNA circulante. É mais rápido e tem um melhor custo benefício que outras técnicas (PAWLOTSKY, 2010; SCOTT;

GRETCH, 2007). É diferente dos outros testes e menos propenso a gerar contaminação entre as amostras (CHEVALIEZ; PAWLITSKY, 2006).

A principal aplicação da quantificação do VHC-RNA é o monitoramento do tratamento da infecção pelo VHC. A resposta virológica sustentada (SVR) é definida como o resultado negativo para o VHC-RNA seis meses após o fim da terapia antiviral. Monitorar a carga viral após quatro e doze semanas de terapia prediz o tipo de SVR (SCOTT; GRETCH, 2007).

3.5.4 Genotipagem do vírus

O VHC é uma família de vírus heterogênea, com seis genótipos principais distintos e numerosos subtipos de VHC disseminados pelo mundo (GRETCH, 1997).

A genotipagem do VHC é útil para estudos epidemiológicos e é clinicamente importante para o tratamento, pois fornece informações sobre a probabilidade de resposta a terapia antiviral bem como determina a duração da mesma e a dosagem da Ribavirina (SILVA; ROSSETTI, 2001; SCOTT; GRETCH, 2007; GHANY, et al., 2009).

Os testes de genotipagem do VHC pertencem a duas categorias: 1) testes de triagem, que detectam pontos de mutação dentro do genoma do VHC e 2) testes confirmatórios que avaliam segmentos maiores dos genes do VHC (GRETCH, 1997). Vários testes comerciais estão disponíveis para determinar o genótipo do VHC, usando análise de seqüência direta da região 5' não codificada: Trugene 5' NC HCV Genotyping kit (Siemens Healthcare Diagnostics Division, Tarrytown, NY), Análise de hibridização reversa usando sondas de oligonucleotídeos genótipo específicas localizadas na região 5' não codificada,

INNO-LiPa HCV II (Innogenetics, Ghent, Belgium) e Versant HCV Genotyping Assay 2.0 (Siemens Healthcare Diagnostics Division, Tarrytown, NY) (GHANY et al, 2009). Recentemente, foi disponibilizado no Brasil o teste comercial LINEAR ARRAY Hepatitis C Virus Genotyping Test para uso com o Amplicor[®] e Cobas[®] Amplicor[®] HCV Test, v2.0 (Roche Molecular Systems) baseado na hibridização reversa.

As fitas do VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay (LiPa) (Siemens, New York, USA) têm três linhas controles e vinte e duas linhas paralelas de sondas de DNA que contêm seqüências específicas dos genótipos 1 a 6 do VHC. A linha de controle do conjugado monitora a reação de desenvolvimento da cor. A linha controle de amplificação 1 até a linha 2 contém sondas universais que hibridiza o produto do PCR da região 5'UTR enquanto que a linha controle de amplificação 2 até a linha 23 contém sondas universais que hibridiza o produto do PCR da região core. Os genótipos do VHC são determinados pelo alinhamento das bandas do teste com o cartão de leitura do VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay (LiPa) comparando os padrões da fita teste com os padrões mostrados no quadro de interpretação do VERSANT HCV Genotype 2.0 Assay (LiPa).

O método de referência (gold standard) para determinação do genótipo do VHC é o seqüenciamento direto das regiões NS5B ou E1 do genoma do VHC, por meio de técnica "in house", seguida de alinhamento com seqüências de protótipos e análise filogenética. Esta técnica deve ser usada em estudos de epidemiologia molecular, onde o subtipo exato de vírus é necessário (PAWLITSKY, 2002; CHEVALIEZ ; PAWLITSKY, 2006).

A genotipagem do VHC pode também ser realizada pela metodologia da análise de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) da região altamente

conservada 5' não codificada. Esta metodologia e a hibridização reversa parecem ser comparáveis em performance clínica, embora mínimas diferenças sejam observadas em algumas populações (GRETCH, 1997).

A genotipagem incorreta é rara (< 3%) e a ocorrência de infecção do VHC por genótipos mistos é incomum, mesmo em indivíduos re-infectados pelo o vírus (GHANY, et al., 2009; VIAZOV, et al., 2010). Ocasionalmente, <5% das amostras testadas não podem ser genotipadas. Isto pode ser devido à baixa carga viral na amostra analisada, a problemas na amplificação do VHC-RNA ou na extrema variabilidade dos nucleotídeos dentro do genoma do VHC (GERMER, et al., 1999).

O VHC também pode ser classificado baseado em reatividade antigênica das proteínas virais. Este tipo de teste envolve reação dos anticorpos presentes na amostra contra antígenos recombinantes da região NS4 de diversos genótipos em um formato immunoblot. Comparado com os testes moleculares, a genotipagem sorológica é mais fácil de executar e menos dispendiosa, mas tem baixa sensibilidade e especificidade (GRETCH, 1997; RICHTER, 2002). A sensibilidade pode ser subestimada por baixos títulos de anticorpos anti-NS4 em alguns indivíduos, como também por baixos títulos de anti-VHC (VIAZOV, et al., 2010).

4 OBJETIVOS DO TRABALHO

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do RIBA no diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Hepatite C em doadores de sangue com anti-VHC reagente.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Realizar o teste RIBA nas amostras positivas e indeterminadas pelo teste de triagem para os anticorpos anti- VHC em doadores de sangue;

4.2.2 Identificar as bandas presentes nos resultados de RIBA positivo e indeterminado;

4.2.3 Repetir o RIBA seis meses após o resultado indeterminado, para verificar se houve mudança do perfil sorológico para positivo, negativo ou se mantém o mesmo resultado;

4.2.4 Realizar PCR qualitativo e quantitativo nas amostras com resultado de RIBA indeterminado e positivo e correlacionar o perfil de bandas com o resultado do PCR;

4.2.5 Realizar a genotipagem das amostras positivas no PCR qualitativo e correlacionar com o padrão de bandas do RIBA.

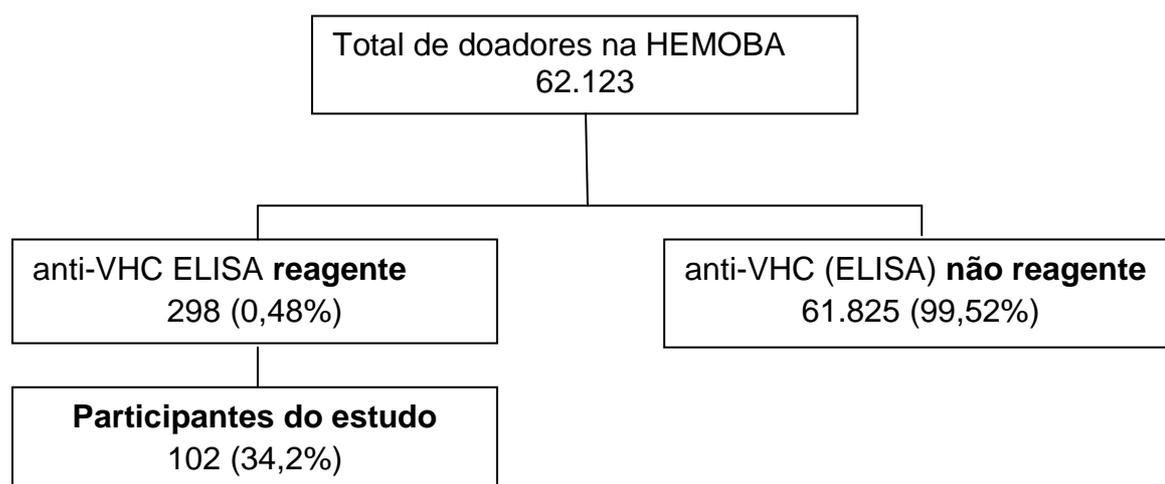
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo é do tipo corte transversal com amostragem de conveniência.

5.2 AMOSTRA

102 indivíduos voluntários para doação de sangue na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia - HEMOBA aceitaram participar do estudo no período de 01 de junho de 2009 a 22 de dezembro de 2010. Todos tiveram resultado de triagem para anti-VHC reagente por ELISA, utilizando o kit Hepanostika[®] HCV Ultra no equipamento Da Vinci (BioMérieux) na HEMOBA.



5.2.1 Amostras de Sangue e Plasma

Foram coletadas amostras de sangue por punção venosa em tubos de 10 mL BD Vacutainer[®] sem anticoagulante (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), para obtenção de soro e tubos de 5mL BD Vacutainer[®] com anticoagulante EDTA K3 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), para obtenção de plasma. Os tubos com as amostras foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm para separação de soro e plasma. As amostras de plasma foram em seguida aliquotadas e estocadas à - 70°C até a sua manipulação.

5.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética e Pesquisa da Fiocruz – Bahia com o parecer de número 193/2009 e protocolo 294. Todos os pacientes incluídos no estudo foram entrevistados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.4 SOROLOGIA PARA O ANTI-VHC

O teste usado para a sorologia do anti-VHC, no LACEN, foi o imunoensaio de quimioluminescência ARCHITECT Anti-VHC (Abbott Diagnostics), utilizado de acordo com as orientações do fabricante em equipamento totalmente automatizado Architect i4000 (Abbott Diagnostics).

5.5 TESTE SUPLEMENTAR PARA O ANTI-VHC

O teste suplementar utilizado foi o RIBA-3 (RIBA VHC 3.0 SAI, Chiron Corp.) utilizado de acordo com as orientações do fabricante.

5.6 DETECÇÃO DO VHC-RNA

Foi utilizado o teste AMPLICOR[®] Hepatitis C Virus (HCV) Test, version 2.0 (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

5.7 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi realizada com o teste VERSANT VHC Genotype 2.0 Assay (LiPa) que utiliza a metodologia de hibridização reversa. Entretanto, algumas amostras foram genotipadas com o teste LINEAR ARRAY Hepatitis C Virus

Genotyping Test (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis,USA) que também utiliza a hibridização reversa como metodologia. Os testes foram utilizados de acordo com o processo licitatório da Instituição e realizados segundo as orientações do fabricante.

5.8 CARGA VIRAL DO VHC RNA

As amostras de plasma foram quantificadas com o teste AMPLICOR HCV MONITOR[®] Test, version 2.0 (Roche Diagnostics Corporation Indianapolis, USA) que utiliza a metodologia de RT-PCR e algumas amostras foram quantificadas pelo o teste COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HCV Test que utiliza o PCR em tempo real como metodologia. Os testes foram realizados de acordo com as orientações do fabricante.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no estudo foram cadastrados no banco de dados Epi Info versão 3.5.1(CDC,Atlanta, USA) e as análises estatísticas dos dados coletados no estudo foram realizados também pelo Epi Info versão 3.5.1(CDC,Atlanta, USA). O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparações de variáveis qualitativas, com o intervalo de confiança de 95% (CI 95%). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. O valor de p para tabelas incluindo uma célula com uma frequência esperada menor que 5 foi calculado com o teste exato de Fisher.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo, foram analisadas 102 amostras de doadores de sangue com resultado reagente para o anti-VHC por ELISA na HEMOBA. No LACEN, a soroprevalência do anti-VHC nestas amostras foi de 38,2% (39/102). Com relação ao gênero, 43,1% (44/102) foram do gênero feminino e 56,9% (58/102) foram do gênero masculino. A média de idade dos doadores de sangue foi de $37,9 \pm 10,1$ anos.

6.2 PERFIS SOROLÓGICOS DAS AMOSTRAS

O anti-VHC foi realizado pela metodologia de quimioluminescência com o kit ARCHITECT Anti-HCV (Abbott Diagnostics) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram consideradas positivas as amostras com valor de índice (S/CO) $>1,1$, negativas menores que $<0,9$ e indeterminadas entre $0,9$ e $1,1$. A tabela 1 apresenta a frequência absoluta e a prevalência dos valores de índice de anti-VHC.

Tabela 1. Frequência absoluta e prevalência do valor de índice de anti-VHC.

INDEX ANTI-VHC	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	PREVALÊNCIA
$\geq 1,1$ e < 2	4	10,3%
≥ 2 e < 3	5	12,8%
≥ 3 e < 4	4	10,3%
≥ 4 e < 5	2	5,1%
≥ 5	24	61,5%
Total	39	100%

O valor de índice de anti-VHC ≥ 5 foi o mais prevalente 61,5% (24/39). Todas as amostras positivas foram submetidas ao teste suplementar RIBA que foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, sendo considerado positivo na presença de duas bandas ou mais com intensidade de cor 1+ ou mais, negativo na ausência de bandas e indeterminado com apenas uma banda com intensidade de cor de 1+ ou mais. A tabela 2 (Anexo V) apresenta os valores de índice das amostras anti-VHC positivas, bem como o resultado do RIBA com as proteínas presentes de acordo com a intensidade de cor.

Ao compararmos os valores de índice com os resultados do RIBA, observa-se que o RIBA confirmou todos os resultados positivos de anti-VHC com valor de índice $\geq 5,0$ (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado do RIBA comparado com o valor de índice de anti-VHC.

RIBA	Valor de índice de anti-VHC n(%)					Total
	≥ 1	≥ 2	≥ 3	≥ 4	≥ 5	
Positivo	0(0)	0(0)	1(25)	0(0)	24(100)	25
Indeterminado	3(75)	4(80)	2(50)	2(100)	0(0)	11
Negativo	1(25)	1(20)	1(25)	0(0)	0(0)	3
Total	4 (100)	5(100)	4(100)	2(100)	24(100)	39

Quinze amostras tiveram o valor de índice do anti-VHC abaixo de 5,0. Destas, onze tiveram resultado de RIBA indeterminado com predominância das bandas c33 e c22, três tiveram resultado de RIBA negativo e apenas uma foi RIBA positivo. 38,5% (15/39) das amostras RIBA positiva foram reativas para os quatro antígenos presentes na fita (Tabela 4).

Tabela 4. Freqüência absoluta e relativa dos resultados do RIBA conforme a presença de bandas.

Número de bandas do RIBA	Freqüência absoluta (n)	Freqüência relativa (%)
0	3	7,7
1	11	28,2
2	3	7,7
3	7	17,9
4	15	38,5
Total	39	100

A reatividade aos antígenos c100, c33, c22 e NS5 nas amostras interpretadas como RIBA positivo foram 84%, 100%, 95% e 68% respectivamente. Nas amostras RIBA indeterminada a reatividade de c33 e c22 foram 78,6% e 21,4% respectivamente. Não houve reatividade para as bandas c100 e NS5 nestas amostras (Tabela 5).

Tabela 5. Reatividade do RIBA por bandas.

Padrão de bandas	RIBA n(%)	
	Positivo	Indeterminado
c100	21(84,0)	0(0)
Ausente	4	0
1+	3	0
2+	1	0
3+	5	0
4+	12	0
c33	25(100)	8(72,7)
Ausente	0	3
1+	1	5
2+	2	0
3+	1	3
4+	21	0
C22	24 (96,0)	3(27,3)
Ausente	1	8
1+	0	0
2+	1	0
3+	0	3
4+	23	0
NS5	17(68,0)	0 (0)
Ausente	8	0
1+	2	0
2+	0	0
3+	1	0
4+	14	0
Total	25	11

O RIBA também foi realizado em todas as amostras com resultado de anti-VHC indeterminado. A tabela 6 apresenta os valores de índice das amostras anti-VHC indeterminadas, bem como o resultado do RIBA com as proteínas presentes de acordo com a intensidade de cor.

Tabela 6. Valores de índice das amostras anti-VHC indeterminadas com resultado do RIBA com suas proteínas.

AMOSTRA	ANTI-					
	VHC INDEX	RIBA	C100	C33	C22	NS5
1	0,84	INDETERMINADO	AUSENTE	2+	AUSENTE	AUSENTE
2	1,13	NEGATIVO	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
3	1,01	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE
4	0,89	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE

O resultado do RIBA foi negativo em apenas uma amostra e indeterminado nas outras, sendo que a proteína c33 foi a predominante. 57,8% (59/102) das amostras analisadas tiveram resultado não reagente para o anti-VHC. A média do valor de índice destas amostras foi de $0,228 \pm 0,213$ de desvio padrão.

Algumas das amostras (10/14) que tiveram resultado de RIBA indeterminado foram repetidas após seis meses do primeiro resultado. (Tabela 7)

Tabela 7. Comparativo dos resultados do valor de índice de anti-VHC e RIBA obtidos nas duas amostras.

ANTI-VHC INDEX(1)	RIBA (1)	C100 (1)	C22 (1)	C33 (1)	NS5 (1)	ANTI-VHC INDEX(2)	RIBA (2)	C100 (2)	C22 (2)	C33 (2)	NS5 (2)
4,69	IND	0	3+	0	0	2,15	IND	0	3+	0	0
3,51	IND	0	3+	0	0	3,74	IND	0	3+	0	0
0,84	IND	0	0	2+	0	1,8	IND	0	0	1+	0
1,58	IND	0	0	1+	0	1,40	NEG	0	0	0	0
4,76	IND	0	0	3+	0	2,11	IND	0	0	3+	0
2,91	IND	0	0	3+	0	2,68	IND	0	0	3+	0
0,89	IND	0	0	1+	0	0,98	IND	0	0	1+	0
1,66	IND	0	0	1+	0	0,93	NEG	0	0	0	0
3,64	IND	0	0	2+	0	3,14	IND	0	0	1+	0
2,07	IND	0	0	1+	0	1,52	IND	0	0	2+	0

IND= INDETRMINADO; NEG= NEGATIVO; 0= AUSENTE

Apenas duas amostras que foram repetidas tiveram resultado negativo para o RIBA. Todas as outras permaneceram com o resultado do RIBA indeterminado, com a mesma banda (Figura 2) e a mesma intensidade de cor, exceto duas amostras que saíram de 2+ e passaram a ser 1+, e uma amostra que passou de 1+ para 2+. Os valores do índice de anti-VHC caíram em 50% em apenas duas amostras, enquanto que em outra aumentou em 100%. Nas outras amostras a variação do índice de anti-VHC foi pequena. O VHC-RNA das amostras repetidas foi indetectável.

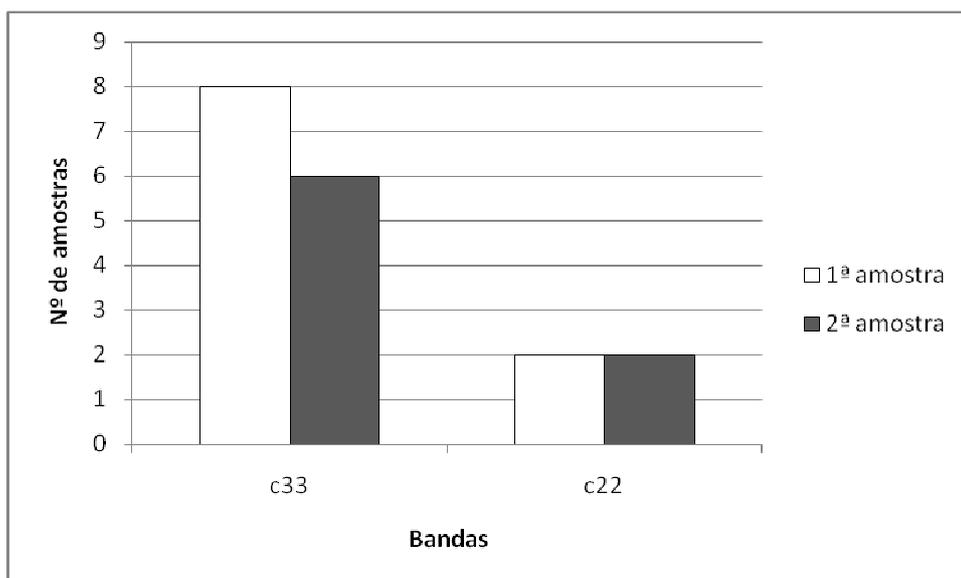


Figura 2. Evolução do VHC RIBA com resultado indeterminado após 6 meses.

6.3 DETECÇÃO DO VHC-RNA

O VHC-RNA qualitativo foi realizado em todas as amostras independente do valor de índice de anti-VHC, inclusive nas amostras que foram repetidas com nova coleta após seis meses. O VHC-RNA foi detectado em 22,5% (23/102) das amostras analisadas, sendo que todas estas tiveram resultado de RIBA positivo. O VHC-RNA não foi detectado em nenhuma amostra com resultado de RIBA indeterminado ou negativo (Tabela 8). O índice de positividade do VHC-RNA nas amostras com resultado de anti-VHC reagente foi de 59,0%.

Tabela 8. Comparação dos resultados do VHC RNA com RIBA

VHC RNA	Resultado do RIBA n(%)		
	POSITIVO	NEGATIVO	INDETERMINADO
DETECTÁVEL	23(92,0)	0 (0)	0 (0)
INDETECTÁVEL	2(8,0)	36(100)	14(100)
Total	25(100)	36(100)	14(100)

6.3.1 Carga viral do VHC RNA

A carga viral foi quantificada em todas as amostras com VHC-RNA detectável, sendo que nestas amostras a relação S/CO para anti-VHC foi maior que 8,0. Destas amostras, 56,5% (13/23) tiveram a carga viral > 850.000 UI/mL. A menor carga detectada foi de 30.200 UI/mL e a maior de 69.000.000 UI/mL.

6.3.2 Genotipagem

Todas as amostras de VHC-RNA detectável foram genotipadas e foi observado o predomínio do genótipo 1 78,3% (18/23) seguido pelos genótipo 3 17,4% (4/23) e do genótipo 2 4,3% (1/23) (Tabela 9).

Tabela 9. Freqüência dos genótipos nas amostras VHC-RNA detectável.

Genótipo	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
1	18	78,3
2	1	4,3
3	4	17,4
Total	23	100

O número de bandas reativas e padrões de positividade do RIBA foram correlacionadas com a presença do VHC RNA e genótipos (Tabela 10). Todas as amostras com positividade para as quatro bandas do RIBA apresentaram VHC-RNA detectável, sendo 86,7 % (13/15) do genótipo 1.

Tabela 10. Comparação dos padrões de positividade com presença de viremia e genótipo do VHC em amostras positivas de anti-VHC.

	Padrões de positividade do RIBA				Número	RNA Positivo	Genótipo do VHC			
	c100	c33	c22	NS5			1	2	3	NR
4 bandas	+	+	+	+	15	15(100%)	13	0	2	0
	+	+	+	-	6	5	4	0	1	1
3 bandas	-	+	+	+	1	1	0	1	0	0
					7	6 (85,7%)				
2 bandas	-	+	+		2	2	1	0	1	0
	-	+	-	+	1	0	0	0	0	1
					3	2(66,6%)				
Total	17	20	19	13	25	23(92%)	18	1	4	2

NR= Não realizado

6.4 ANÁLISES DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Entre as variáveis analisadas, observou-se associação entre a presença da infecção pelo VHC e pessoas que já tiveram DST ($p=0,03$), que fizeram uso de cocaína inalada ($p=0,0009$) e usuários de drogas ilícitas ($p=0,0002$). Não houve associação com hemotransfusão anterior a 1990 ($p= 0,06$), tatuagem ($p= 0,08$), compartilhar escova de dente ($p= 0,89$), compartilhar alicate de unha ($p= 0,81$), trabalhar em ocupação de risco ($p= 0,51$), pessoas que já foram presas ($p= 0,17$),

gênero masculino ($p= 0,07$) e idade superior a 30 anos ($p= 0,48$). Dados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Fatores de risco associados com a prevalência de anti-VHC em doadores de sangue.

Fatores de risco	Nº de amostras analisadas	Positividade do anti-VHC (%)	Valor de p*
Já teve DST			
Sim	21	61,9	0,03
Não	77	33,8	
Uso de cocaína inalada			
Sim	10	90,0	0,0009
Não	88	34,1	
Fez hemotransfusão anterior a 1990			
Sim	3	100	0,06
Não	95	37,9	
Uso de tatuagem			
Sim	9	66,7	0,08
Não	89	37,1	
Uso de drogas ilícitas			
Sim	14	85,7	0,0002
Não	84	32,1	
Compartilhar escova de dente			
Sim	17	41,2	0,89
Não	81	39,5	
Compartilhar alicate de unha			
Sim	64	40,6	0,81
Não	34	38,2	
Trabalhar em ocupação de risco			
Sim	9	44,4	0,51

Não	89	39,3	
Ter sido preso			
Sim	4	75	0,17
Não	94	38,3	
Ser do gênero masculino			
Sim	57	47,4	0,07
Não	41	29,3	
Ter idade superior a 30 anos			
Sim	69	42,0	0,48
Não	29	34,5	

* O valor de p foi calculado pelo teste de Qui-quadrado e para algumas variáveis pelo teste exato de Fisher.

7 DISCUSSÃO

O estudo incluiu 102 amostras reagentes para o anti-VHC provenientes da HEMOBA de Salvador. Durante o período do estudo, a HEMOBA testou 62.123 amostras para o anti-VHC, sendo que apenas 298 amostras foram reagente para o anticorpo da hepatite C, o que corresponde a uma prevalência de 0,48% (dados da HEMOBA). Desta forma, este estudo analisou 34,2% (102/298) das amostras reagentes para o anti-VHC na HEMOBA.

No LACEN, 38,2% (39/102) das amostras analisadas tiveram o resultado reagente para o anti-VHC, sendo que em apenas 59,0% (23/39) destas amostras foi detectado o vírus da hepatite C. O objetivo da triagem do anti-VHC em população de doadores de sangue é evitar resultados falso-negativos e por isso testes mais sensíveis devem ser escolhidos (COLIN, et al., 2001).

Os testes de 3ª geração para detecção do anti-VHC têm melhor sensibilidade e especificidade do que os seus antecessores (COLIN, et al., 2001). Entretanto, ainda há uma alta prevalência de resultados falso-positivos, especialmente entre populações de baixo risco, pacientes imunocomprometidos ou em populações com doenças do fígado (KESLI, et al., 2009).

No Brasil, estudos realizados com doadores de sangue no Distrito Federal e região centro-oeste do Brasil relataram a presença do vírus da hepatite C em 71,9% e 80,5% respectivamente, nos indivíduos com resultado de ELISA reagente para o anti-VHC (AMORIM, et al., 2004; MARTINS, et al., 2006).

Além do tipo de teste utilizado, outros fatores podem ter influenciando na discrepância dos resultados entre os laboratórios da HEMOBA e LACEN, como a metodologia utilizada para a detecção dos anticorpos anti-VHC, processamento ou manuseio das amostras, o equipamento utilizado para realizar o teste anti-VHC, a

análise dos resultados, e não menos importante, as reações cruzadas com outros anticorpos de outras hepatites, com o fator reumatóide (FR) e outros vírus (Citomegalovírus, Epstein Barr e Herpes vírus).

Em populações de baixo risco, tal como doadores de sangue, o teste de triagem tem baixa especificidade com aproximadamente 60% das amostras reativas representando resultados falso-positivos (BES, et al., 2009). Isto ocorre devido à utilização de testes mais sensíveis, visando à exclusão de amostras possivelmente infectadas por vírus.

Resultados falso-positivos para o anti-VHC podem ser causados por aumento das imunoglobulinas (pessoas afro-descendentes, mieloma e fator reumatóide), doenças do fígado (cirrose, câncer), doenças auto-imune (colagenosas, hepatite auto-imune), outras infecções virais (HIV e hepatite B), amostras de soro estocadas por longo tempo e com variação de temperatura, e após imunização (COLIN, et al., 2001).

O estudo de Mac Kenzie e col. (1992) revelou que a vacinação contra o vírus da influenza foi associada com a ocorrência de múltiplos resultados falso-positivos virais entre doadores de sangue, sendo a máxima duração destes resultados falso-positivos para o anti-VHC.

O VHC-RNA foi detectado em 92% (23/25) das amostras com resultado de RIBA positivo e valor de índice do anti-VHC maior que cinco. Diante disto, podemos afirmar que existe uma associação com significância estatística entre valores elevados de índice de anti-VHC e a presença de viremia ($p < 0,01$).

De acordo com as orientações do CDC para o diagnóstico da hepatite C, todas as amostras com resultado do anti-VHC não reagente dispensam a realização de exames adicionais confirmatórios e as amostras reagentes para este

anticorpos devem ser confirmadas. Neste estudo, todas as amostras com o anti-VHC não reagente foram submetidas ao teste de VHC-RNA qualitativo, uma vez que a detecção do vírus é o padrão-ouro para o diagnóstico da infecção pelo VHC e, portanto, com a realização deste teste, podemos descartar qualquer resultado falso-negativo quanto à presença do vírus na amostra.

Em 42,1% (43/102) das amostras a confirmação do diagnóstico do VHC se fez necessário, sendo que o teste RIBA teve resolubilidade em 67,4% (29/43) das amostras, pois confirmou a presença ou ausência do anti-VHC nas mesmas. Em 32,6% (14/43) das amostras o resultado do RIBA foi indeterminado.

Diferente deste estudo, Kesli e col. (2009) relataram que em 136 amostras que foram submetidas ao teste RIBA, apenas 16,9% (23/136) das amostras tiveram resultado indeterminado para o RIBA. Consistente com o nosso estudo, o VHC-RNA também foi indetectável para estas amostras com resultado de RIBA indeterminado.

O RIBA foi positivo em todas as amostras com a relação S/CO > 5,0 para o anti-VHC. Isto confirma os dados do CDC que relata a relação S/CO maior ou igual a 5,0, para o teste anti-VHC Architect, prevendo um resultado verdadeiramente positivo para o anticorpo anti-VHC (Anexo I).

As amostras com relação S/CO < 5,0 para o anti-VHC, ou seja, com baixa positividade, e que foram consideradas positivas ou indeterminadas (19/102) tiveram 73,7% (14/19) de resultado indeterminado para o RIBA, onze tiveram anticorpos isolados para os antígenos c33 e três para c22. Apenas uma teve resultado positivo e três resultados negativo para o RIBA. Em nenhuma destas amostras foi detectado o VHC-RNA. A presença da proteína c33 (região NS3) isoladamente pode representar uma infecção resolvida, onde anticorpos para as

outras proteínas (c22, c100 e NS5) foram perdidos ou nunca detectados, início da soroconversão ou reatividade não específica (KIELY, et al., 2002).

Dados semelhantes foram obtidos em alguns estudos como o de Bes e col. (2009) no qual todas as amostras indeterminadas no teste RIBA foram VHC- RNA negativas com predomínio das bandas c33 e c22. No estudo de Cavazza e col. (2005) não foi detectado viremia em nenhuma das amostras de doadores de sangue com resultado de RIBA indeterminado. Entretanto, Kiely e col. (2004) detectaram o VHC-RNA em 2,9% das amostras de doadores de sangue com resultado de RIBA indeterminado em um período de dois anos. A predominância das bandas para o RIBA indeterminado foram c33 e c22 que são semelhantes às bandas encontradas para amostras indeterminadas no presente trabalho.

No estudo de Rios e col. (2006) foi observado que em doadores de sangue com resultado de RIBA indeterminado a relação S/CO era significativamente mais baixa que a relação S/CO das amostras com resultado RIBA positivo. O padrão de bandas das amostras indeterminadas foi c22, NS5 e c33 e o VHC- RNA foi detectado em apenas 7,5% (4/53) das amostras RIBA indeterminadas.

O estudo de Contreras e col. (2008) mostrou que a baixa positividade da relação S/CO < 4,5 para o anti-VHC identifica os resultados falso-positivos. Quase todas as amostras com resultado de RIBA indeterminado do referido estudo foram devido à reatividade isolada de c33 e c22.

O principal problema da utilização do RIBA é o percentual significativo de amostras com resultado indeterminado e neste trabalho não foi diferente. Então, como devemos interpretar um resultado indeterminado para o RIBA? Vários estudos já foram realizados na tentativa de entender o real significado de um resultado indeterminado para o RIBA.

Lemaire e col. (2000) estudaram a freqüência de viremia em pacientes com resultado de RIBA indeterminado e observaram que o VHC-RNA foi detectado em amostras com reatividade isolada para c22 e c33 e isto pode ser um sinal de infecção aguda ou crônica pelo VHC. Por outro lado, anticorpos do core (c22) e NS3 (c33) são freqüentemente os primeiros anticorpos a serem detectados no início da soroconversão (KIELY, et al., 2004). E, períodos de flutuação do VHC-RNA com baixa carga de RNA viral, tornando-se indetectável podem ocorrer múltiplas vezes antes ou imediatamente à soroconversão (FANG, et al., 2003).

Dufour e col. (2003) confirmaram que baixa positividade de anti-VHC em doadores de sangue freqüentemente representam resultados falso-positivos e que estes resultados provavelmente representam reações cruzadas de anticorpos. Outra possível explicação para baixa positividade de anti-VHC e RIBA com resultado negativo ou indeterminado sem viremia seria uma infecção passada por VHC resolvida e que ainda não ocorreu a eliminação total de anticorpos (BES, et al., 2009; DUFUOR, et al., 2003).

Barreto e col. (2008) acreditam que resultados de RIBA indeterminado ocorrem devido à fase de soroconversão, durante a qual o anti-VHC já é positivo devido à alta sensibilidade quando comparado ao teste de imunoblot; soro reversão em pacientes que eliminam o vírus espontaneamente; indivíduos infectados com o genótipo 3 ou outro genótipo incomum que poderia ter uma baixa reatividade para frações antigênicas do genótipo 1^a, utilizadas na maioria dos testes comerciais disponíveis para o anti-VHC; outros fatores relacionados a performance do kit ou variabilidade da resposta imune do paciente devem ser considerados.

Das amostras com resultado de RIBA indeterminado e que foram repetidas após seis meses, 71,4% (10/14) oito mantiveram os seus resultados com o mesmo perfil de banda e sem VHC-RNA detectável e apenas duas tiveram o resultado de RIBA negativo. Estes dados confirmam os dados obtidos no estudo de Piro e col. (2008), no qual doadores com resultado de RIBA indeterminado foram acompanhados durante dois anos, sendo que alguns permaneceram com o mesmo perfil de banda e poucos se tornaram RIBA negativo. No estudo de Kiely e col. (2004) 60,8% (62/102) dos resultados de RIBA indeterminados foram repetidos após em média 4,3 semanas com novas amostras. Todos 62 doadores que foram retestados permaneceram RNA-VHC negativos enquanto que 60 permaneceram RIBA indeterminado. Os outros dois doadores, um teve resultado RIBA negativo e o outro que apresentava a banda c33 se tornou RIBA positivo com a reatividade para as bandas c22 e c33.

No estudo de Kondili e col. (2002) realizado com amostras selecionadas randomicamente em comunidades italianas com baixo nível de endemicidade para o VHC foi observado que o nível de positividade aos antígenos decresceu em amostras que foram acompanhadas dez anos após a primeira amostra, sendo que a banda c22 foi a mais persistente, o que indica uma maior estabilidade para os anticorpos contra esta proteína estrutural. Das oito amostras RIBA indeterminado (sete com a banda c22 e uma com a banda c33) que foram acompanhadas neste período, em apenas uma ocorreu a soroconversão (uma que era c22 tornou-se reativa para c100, c22 e c33). As demais se tornaram negativas para o RIBA.

Ao analisarmos o perfil de bandas das amostras RIBA positivo com a carga viral de VHC-RNA quantificada, podemos observar que em todas as amostras que tiveram as quatro bandas presentes a carga viral foi determinada.

Entretanto, nas amostras com duas bandas, a carga viral somente foi determinada em uma delas. Dow e col (1996) observaram que a viremia está relacionada com o número de bandas reativas do RIBA e que a baixa frequência de viremia encontrada em amostras RIBA positivo com duas bandas, se deve a infecção pelo VHC já resolvida.

Os fatores de risco encontrados associados à infecção pelo VHC foram DST, IDU e uso de droga intranasal. Isto comprova que pessoas com dificuldade de acesso aos serviços de saúde buscam os bancos de sangue como uma forma mais rápida de conseguir realizar seus exames e ter um acompanhamento médico. Estes dados diferem em parte dos dados encontrados por Orton e col. (2004) que encontraram como significantes fatores de risco, entre doadores de sangue voluntários, o IDU e encarceramento. Entretanto, no estudo de Rios e col. (2006) os fatores de risco predominantes em doadores de sangue foram transfusão e intervenção cirúrgica.

O genótipo mais prevalente neste estudo foi o genótipo 1 seguido do genótipo 3, o que vem corroborar os dados obtidos em outros estudos que se referem a prevalência dos genótipos em doadores de sangue e usuários de drogas (SILVA, et al., 2010; TORRES, et al., 2009). A reatividade as quatro bandas pelas amostras do genótipo 1 pode ser explicada, devido a maior prevalência deste genótipo no estudo, bem como o fato das proteínas utilizadas nas tiras do teste RIBA serem provenientes deste tipo de genótipo.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste estudo, 32,4% das amostras não tiveram a confirmação do resultado do anti-VHC definido pelo RIBA, sendo necessária a realização de testes moleculares para a confirmação da infecção pelo vírus da hepatite C, elevando desta forma o custo do diagnóstico da hepatite C para o sistema público de saúde.

Indivíduos com resultado de anti-VHC índice menor que cinco, resultado de RIBA indeterminado têm grande probabilidade do VHC-RNA ser indetectável e portanto, não estarem infectados pelo VHC.

Diante disto, sugerimos que seja realizado o VHC-RNA para todas as amostras que tiverem resultado anti-VHC reagente, seja com alta ou baixa relação S/CO, a fim de definir o diagnóstico da hepatite C como já está preconizado no fluxo de diagnóstico da hepatite C do Ministério da Saúde. Os pacientes com anti-VHC reagente e VHC-RNA indetectável devem ser acompanhados de acordo com o critério médico.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A maior dificuldade deste estudo foi a obtenção de pessoas para participar do mesmo, bem como a repetição dos exames dos doadores que tiveram resultado de RIBA indeterminado. Estes indivíduos foram convidados por telefone e telegrama por diversas vezes para comparecer ao LACEN, a fim de repetir os exames, mas nem todos atenderam a solicitação.

REFERÊNCIAS

ABOU-SETTA, A.M. Transmission risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? **Human Reproduction**, v. 19, n. 12, p. 2711–2717, 2004.

ALBERTI, A.; CHEMELLO, L.; BENVENUTO, L. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 31, n. 1, p. 17–24, 1999.

ALTER, H.J. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 15, p. 350–353, 1992.

ALTER H. J. To C or not C: These are the questions. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 85, n. 7, p. 1681–195, 1995.

ALTER, M.J.; MAST, E.E.; MOYER, L.A.; MARGOLIS, H.S. Hepatitis C. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 13–26, 1998.

ALTER, M. J. Prevention of spread of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5, Suppl. 1, p. S93–S98, 2002.

ALTER, M.J. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. S6–S9, 2006.

ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2436–2441, 2007.

AMORIM, R.M.S.; OLIVEIRA, C.P.; WYANT, P.S.; CERQUEIRA, D.M.; CAMARA, G.N.L.; FLORES, L.S. et al. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 895–897, 2004.

AMORIM, R.M.S.; RAIOL, T.; TREVIZOLI, J.E.; NEVES, F.A.R.; MARTINS, C.R.F.; MARTINS, R.M.B. Hepatitis C virus genotypes in hemodialysis patients in the Federal District, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 1, p. 57–60, 2010.

ANDERSON, J.C.; SIMONETTI, J.; FISHER, D.G.; WILLIAMS, J.; YAMAMURA, Y.; RODRIGUEZ, D. et al. comparison of different HCV viral load and genotyping assays. **Journal of Clinical Virology**, v. 28, p. 27–37, 2003.

BARRERA, J.M.; FRANCIS, B.; ERCILLA, G.; NELLES, M.; ACHORD, D.; DARNER J. et al. Improved detection of anti-VHC in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. **Vox Sanguinis**, v. 68, n. 1, p. 15–88, 1995.

BARRETO, A.M.E.C.; TAKEI, K.; SABINO, E.C.; BELLESA, M.A.O.; SALLES, N.A.; BARRETO, C.C. et al. Cost-effective analysis of different algorithms for the

diagnosis of hepatitis C virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p.126-34, 2008.

BASSIT, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; SILVA, L.C.; TAKEIO, K.; VILLACA, P.; DAVIS-NETO, E. et al. Genotype distributions of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. **Hepatology**, v. 29, p. 994-995, 1999.

BÉLEC, L.; LEGOFF, J.; MOHAMED, A-S.; BLOCH, F.; MATTA, M.; MBOPI-KEOU, F-X.; et al. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, n. 3, p. 247-251, 2003.

BELD, M.; SENTJANS, R.; REBERS, S.; WEEL, J.; DILLEN, P.W-V.; SOL, C.; et al. Detection and Quantitation of Hepatitis C Virus RNA in Feces of Chronically Infected Individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3442–3444, 2000.

BES, M.J.; ESTEBAN, J.G.; CASAMITJANA, N.; PIRON, M.; QUER, J.; CUBERO, M.; et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific T-cell responses among recombinant immunoblot assay-3-indeterminate blood donors: a confirmatory evidence of HCV exposure. **Transfusion**. v. 49, p. 1296–1305, 2009.

BESSA, M.; RODART, I.F.; MENEZES, G.B.L.; CARMO, T.M.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G. Limited evidence of HCV transmission in stable heterosexual couples from Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 262–265, 2009.

BLANTON, R.E.; SALAM, E.A.; KARIUKI, H.C.; MAGAK, P.; SILVA, L.K.; MUCHIRI E. M.; et al. Population-based differences in *Schistosoma mansoni*- and Hepatitis C- induced disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 1644–1649, 2002.

BOUVIER-ALIAS, M.; PATEL, K.; DAHARI, H.; BEAUCOURT, S.; LARDERIE, P.; BLATT, L.; et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. **Hepatology**, v. 36, n. 1, p. 211–218, 2002.

BRANDÃO, A. B.M.; FUCHS, S.C.; SILVA, M. A.A.; EMER, L.F. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão de literatura. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 9, n. 3, p. 161–168, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatites Virais: o Brasil está atento**, 3. ed. 2008, 60p.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 8234–8238, 1993.

CAVAZZA, S.; LAGGING, M. Indeterminate third-generation hepatitis C recombinant immunoblot assay and HCV RNA analysis: isolated reactivity against

NS5 associated with HCV viremia in clinical patients but not blood donors. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 488–492, 2005.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDCDVH – HCV Laboratory Testing for Health Professionals. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/LabTesting.htm>>. Acesso em 16 maio 2010.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 52, p. 1-15, 2003.

CHEVALIEZ, S.; PAWLITSKY, J.M, Hepatitis c virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. **International Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 35 -40, 2006.

CHIEN, D.Y.; ARCANGEL, P.; MEDINA-SELBY, A.; COIT, D.; BAUMEISTER, M.; NGUYEN, S. et al. Use of a novel hepatitis C virus (HCV) major-epitope chimeric polypeptide for diagnosis of HCV infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1393–1397, 1999.

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**, v. 244, n. 4902, p. 359-362, 1989.

COLIN, C.; LANOIR, D.; TOUZET, S. ; MEYAUD-KRAEMER, L. ; BAILLY, F. ; TREPO, C. ; et al. Sensitivity and specificity of the third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 8, p. 87-95, 2001.

CONTRERAS, A.M.; TORNERO-ROMO, C.M.; TORIBIO, J.G.; CELIS, A.; OROZCO-HERNÁNDEZ, A.; RIVERA, P.K.; et al. Very low hepatitis C antibody levels predict false-positive results and avoid supplemental testing. **Transfusion**, v. *, p. 1–9, 2008.

CONTRERAS, A.M. Anticuerpo a hepatitis C: verdadero o falso positivo? Nuevas estrategias de diagnóstico. **Revista de Investigación Clínica**, v. 58, n. 2, p. 153–160, 2006.

DOW, B.C.; BUCHANAN, I.; MUNRO, H.; FOLLETT, E.A.C.; DAVIDSON, F.; PRESCOTT, L.E.; et al. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. **Journal of Medical Virology**. v. 49, p. 132–136, 1996.

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World Journal Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2406– 415, 2007.

DUFOUR, D.R.; TALASTAS, M.; FERNANDEZ, M.D.A.; HARRIS, B. Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis C antibody detection. **Clinical Chemistry**. v. 49, n. 6, p. 940-944, 2003.

DUFUOR, D.R.; TALASTAS, M.; FERNANDEZ, M.D.A.; HARRIS, B.; STRADER, D.B.; SEEF, L.B. Low- positive anti-hepatitis c vírus enzyme immunoasay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. **Clinical Chemistry**. v. 49, n. 3, p. 479–486, 2003.

FANG, C.T.; TOBLER, L.H.; HAESCHE, C.; BUSCH, M.P.; PHELPS, B.; LEPARC, G.; Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. **Transfusion**. v. 43, p. 541 – 544, 2003.

FARCI, P.; ALTER, H.J.; GOVINDARAJAN, S.; WONG, D.C.; ENGLE, R.; LESNIEWSKI, R.R. et al. Lack of Protective Immunity Against Reinfection with Hepatitis C Virus. **Science**. v. 258, p. 135 – 140, 1992.

FARCI, P.; 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 1989; 244:359-362]. **J Hepatology**, v. 36, n. 5, p. 582-585, 2000.

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

GERMER, J.J.; RYS, P.N.; THORVILSON, J.N.; PERSING, D.H. Determination of Hepatitis C Virus Genotype by Direct Sequence Analysis of Products Generated with the Amplicor HCV Test. **Journal Of Clinical Microbiology**. v.37, n. 8 ,p. 2625–2630, 1999

GHANY, M.G.; STRADER, D.B.; THOMAS, D.L.; SEEFF, L.B.; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**. v. 49, p. 1335 – 1374, 2009.

GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**. v. 26, n. 3, p. 43S – 47S, 1997.

IDRESS, M.; RIAZUDDIN, S. Frequency distribution of hepatitis C virus genotypes in different geographical regions of Pakistan and their possible routes of transmission. **BMC Infectious Diseases**. v. 8, n. 69, p. 1 – 9, 2008.

JOYCE, M.A.; TYRELL, D.L.J. The cell biology of hepatitis C virus. **Microbes and Infection**. v. 12, p. 263 – 271, 2010.

KESLY, R.; OZDEMIR, M.; KURTOGLU, M.G.; BAYKAN, M.; BAYSAL, B. Evaluation and comparison of three different anti-hepatitis C virus antibody tests based on chemiluminescence and enzyme-linked immunosorbent assay methods used in the diagnosis of hepatitis C infections in Turkey. **The Journal of International Medical Research**. v. 37, p. 1420 – 1429, 2009.

KIELY, P.R.; ELIADES, L.A.; KEBEDE, M.; STEPHENSEN, M.D.; JARDINE, D.K.; Anti-HCV confirmatory testing of voluntary blood donors: comparison of the sensitivity of two immunoblot assays. **Transfusion**. v. 42, p. 1053-1058, 2002.

KIELY, P.R.; KAY, D.; PARKER, S.; PISCITELLI, L. The significance of third-generation HCV RIBA-indeterminate, RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. **Transfusion**. v. 44, p. 349 – 358, 2004.

KIM, S.; KIM, J-H.; YOON, S.; PARK, Y-H.; KIM, H-S. Clinical performance evaluation of four automated chemiluminescence immunoassays for hepatitis C virus antibody detection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 3919 – 3923, 2008.

KONDILI, L.A. ; CHIONNE, P. ; COSTANTINO, A. ; VILLANO, U. ; NOCE, C. LO. ; PANNOZZO, F. et al. Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis c virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population. **International Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 50, p. 693 -696, 2002.

KRAJDEN, M. Hepatitis C virus diagnosis and testing. **Canadian Journal of Public Health**. v. 91, n.1, p. S34 – S39, 2000.

KRUG, L.P.; LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; CHEINQUER, H.; OZAKI, L.S. et al. Hepatitis C virus genotyping in southern Brazil. **Braz J. Med. Biol Res**. v. 29, p. 1629 – 1632, 1996.

KUMAR, R.M.; SHAHUL, S. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infants of HCV-infected mothers. **Journal of Hepatology**. v. 29, n. 2, p. 191-197, 1998.

KUO, G., CHOO, Q.L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G,L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H. et al. An assay for circulating antibodies to a major eyiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**. v. 244, p. 362 – 364, 1989.

LAPERCHE, S. ; MARREC, N.L. ; GIRAULT, A. ; BOUCHARDEAU, F. ; SERVANT-DELMAS, A. ; MANIEZ-MONTREUIL, M. et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 8, p. 3877 – 3883, 2005.

LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis c virus infection. **N Engl. J. Med**, v. 345, n. 1, p. 45 – 52, 2001.

LEMAIRE, J.M.; COUROUCE, A.M.; DEFER, C.; BOURCHARDEAU, D.F.; COSTE, J.; AGULLES, O. et al. HCV RNA in blood donors with isolated reactivities by third-generation RIBA. **Transfusion**, v. 40, p. 867 – 870, 2000.

LERAT, H. ; BERBY, F. ; TRABAUD, M.A. ; VIDALIN, O. ; MAJOR, M. ; TREPO, C. et al. Specific Detection of Hepatitis C Virus Minus Strand RNA in Hematopoietic Cells. **J. Clin. Invest.** v. 97, n. 3, p. 845–851, 1996.

LIU, T-C. ; CHANG, T-T. ; YOUNG, K.-C. ; LIN, X-Z. ; LIN, C-Y. ; WU, H-L. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. **Journal of Medical Virology**, v. 37, p. 197–202, 1992.

LINS, L.; ALMEIDA, H.; VITVISK, L.; CARMO, T.; PARANÁ, R.; REIS, M.G. Detection of Hepatitis C Virus RNA in Saliva Is Not Related to Oral Health Status or Viral Load. **Journal of Medical Virology**. v. 77, p. 216-220, 2005.

LOK, A.S.F.; GUNARATNAM, N.T. Diagnosis of Hepatitis C. **Hepatology**. v. 26, n. 3, p. 48S– 56S, 1997.

MAC KENZIE, W.; DAVIS, J.P.; PETERSON, D.E.; HIBBARD, A.J.; BECKER, G.; ZARVAN, B.S. Multiple false-positive serologic tests for HIV, HTLV-1, and hepatitis C following influenza vaccination. **JAMA**. v. 268, n. 8, p. 1015 – 1017, 1992.

MARTINS, R.M.B.; TELES, S.A.; FREITAS, N.R.; MOTTA-CASTRO, A.R.C.; SOUTO, F.J.D.; MUSSI, A. et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v. 48, n. 1, p. 53-55, 2006.

MORADPOUR, D.; SLUM, H.E. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver International**, v. 24, p. 519-525, 2004.

OGATA, N.; ALTER, H.J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.88, p. 3392 – 3396, 1991.

ORTON, S.L.; STRAMER, S.L.; DODD, R.Y.; ALTER, M.J. Risk factors for HCV infection among blood donors confirmed to be positive for the presence of HCV RNA and not reactive for the presence of anti-HCV. **Transfusion**. v. 44, p. 275 – 281, 2004.

PARANÁ, R.; VITVITSKI, L.; BERBY, F.; PORTUGAL, M.; COTRIM, H.P.; CAVALCANTE, A. et al. HCV infection in northeastern Brasil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arq. Gastroenterol**, v. 37, n. 4, 2000.

PARISE E. Diagnóstico sorológico das Hepatites crônicas virais. **Roche Review**. v. 8, p. 2 – 6, 2009.

PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C. **Journal of Hepatology**. v. 31, n. 1, p. 71 – 79, 1999.

PAWLOTSKY, J.M.; BOUVIER-ALIAS, M.; HEZODE, C.; DARTHUY, F.; REMIRE, J.; DHUMEAUX, D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. **Hepatology**. v. 32, n. 3, p. 654 – 659, 2000.

PAWLOTSKY, J.M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology**. v. 36, n. 5, p. S65 – S73, 2002.

PAWLOTSKY, J.M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. **Gastroenterology**. v. 122, n. 6, p. 1554 – 1568, 2002.

PAWLOTSKY, J.M. More sensitive hepatitis C virus RNA detection: What for? **Journal of Hepatology**. v. 52, p. 783 – 785, 2010.

PENIN, F.; BRASS, V.; APPEL, N.; RAMBOARINA, S.; MONTSERRET, R.; FICHEUX, D. et al. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **The Journal of biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40835 – 40843, 2004.

PIRO, L.; SOLINAS, S.; LUCIANI, M.; CASALE, A.; BIGHIANI, T.; SANTONOCITO, D. et al. Prospective study of the meaning of indeterminate results of the recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus in blood donors. **Blood Transfusion**. v. 6, p. 107 -111, 2008.

PONDÉ, R.A.A. Hidden hazards of HCV transmission. **Med Microbiol Immunol**. 2010

PRATI, D. Transmission of hepatitis c virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. **Journal of Hepatology**, v. 45, p. 607 – 616, 2006.

RÉ, V.; GALLEGGO, S.; FARIAS, A.; BARBÁS, G.; KREMER, L.; DIAZ, M.P. et al. Hepatitis C and HIV co-infection in central region of Argentina: prevalence, genotype characterization and risk factors. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v. 26, n. 7, p. 423 – 425, 2008.

RICHTER, S.S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 12, p. 4407 – 4412, 2002.

RIOS, M.; DIAGO, M.; RIVERA, P.; TUSET, C.; CORS, R.; GARCIA, V. et al. Epidemiological, biological and histological characterization of patients with indeterminate third-generation recombinant immunoblot assay antibody results for hepatitis C virus. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 13, p. 177 – 181, 2006.

ROSS, R.S.; VIAZOV, S.; SALLOUM, S.; HILGARD, P.; GERKEN, G.; ROGGENDORF, M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 4, p. 1161 – 1168, 2010.

SCOTT, J.D.; GRETCH, D.R. Molecular diagnostics of Hepatitis C virus infection. **Journal American Medical Association**. v. 297, n. 7, p. 724 – 732, 2007.

SEEF, L.B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968 – 2009). **Liver International**, v. 29, n. s1, p. 89-99, 2009.

SILVA, M.D.; ROSSETI, M.L.R. Hepatite C e testes diagnósticos. **Caderno de Farmácia**, v. 17, p. 111-115, 2001.

SILVA, L.K, PARANÁ, R.; SOUZA, S.P.; BERBY, F.; KAY, A.; TREPÓ, C. et al. Hepatitis C vírus genotypes in a northeastern área of Brazil. **Am. Journal Trop. Med. Hyg.** v. 62, n. 2, p. 257 – 260, 2000.

SILVA, L.K.; SILVA, M.B.S.; LOPES, G.B.; RODART, .I.F.; COSTA, F.Q.; SANTANA, N.P. et al. Prevalence of hepatitis c vírus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the state of Bahia. Northeastern Brasil: analysis of serological and virological parameters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 496 – 502, 2005.

SILVA, L.K.; SILVA, M.B.S.; LOPES, G.B.; RODART, I.F.; COSTA, F.Q.; MELO, M.E. et al. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 595-602, 2006.

SILVA, M.B.S.; ANDRADE, T.M.; SILVA, L.K.; RODART, I.F.; LOPES, G.B.; CARMO, T.M.A. et al. Prevalence and genotypes of hepatitis C vírus among injecting drug users from Salvador – BA, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n.3, p. 299 – 303, 2010.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C.; CHA, T-A.; CHAN, S-W.; MCOMISH, F.; IRVINE, B. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **Journal of General Virology**. v. 74, p. 2391 – 2399, 1993.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J.; BONINO, F.; BRADLEY, D.W.; BRECHOT, C. et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**. v. 19, n. 5, p. 1321 – 1324, 1994.

SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; CRAXI, A.; TAPIAS, J-MS.; ALBERTI, A.; PRIETO, J. et al. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. **Journal of Hepatology**. v. 24, p. 517 – 524, 1996.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**. v. 42 (4), p. 962 – 973, 2005.

SOUTO, J.D.F.; RIBEIRO, L.C.; PERAZOLO, G.F.; FORTES, H.M.; SALDANHA, A.A. Imunoblot como teste suplementar para detecção de anticorpos contra o vírus

da hepatite c em doadores de sangue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 1, p. 69 -71, 2002.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, 2001.

SYED, G.H.; AMAKO, Y.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 33 - 40, 2009.

TE, H.S. Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. **Clinical Liver Disease**. v. 14, p. 1-21, 2010.

THOMAS,D.L.; ASTEMBORSKI, J.; RAI, R.M.; ANANIA, F.A.; SCHAEFFER, M.; GALAI, N. et al. The Natural History of Hepatitis C Virus Infection Host, Viral, and Environmental Factors. **JAMA**. v. 284, n. 4, p. 450-456, 2000.

THOMPSON, S.C.; BOUGHTON, C.R.; DORE, G.J. Blood-borne viruses and their survival in the environment: is public concern about community needlestick exposures justified? **Australian and New Zealand Journal of Public Health**. v. 27, n. 6, p. 602 – 606, 2003.

TOBLER, L.H. ; STRAMER, S.L. ; LEE, S.R. ; MASECAR, B.L. ; PETERSON, J.E. ; DAVIS, E.A. et al. Impact of HCV 3.0 EIA relative to HCV 2.0 EIA on blood-donor screening. **Transfusion**. v. 43, p. 1452 – 1459, 2003.

TORRES, K.L.; MALHEIRO, A.; TATENO, A.; LIMA ,T.A.; MAIA, L.P.V.; PIMENTEL, J.P.D. et al. Hepatitis C vírus in blood donors, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, n. 4, p. 676 – 678, 2009.

URDEA, M.S.; Wuestehube LJ, Laurenson PM, Wilber JC. Hepatitis C – diagnosis and monitoring. **Clinical Chemistry**. v. 43, n. 8, p. 1507 – 1511, 1997.

VIAZOV, S.; ROSS, S.S.; KYUREGYAN, K.K.; TIMM, J.; NEUMANN-HAEFELIN, C.; ISAEVA, O.V. et al. Hepatitis C virus recombinants are rare even among intravenous drug users. **Journal of Medical Virology**. v. 82, p. 232–238, 2010.

ZARIFE, M.A.S.; SILVA, L.K.; SILVA, M.B.S.; LOPES, G.B.; BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 100, p. 663-668, 2006.

ZARIFE, M.A.S.; OLIVEIRA, E.C.P.; ROMEU, J.M.S.L.; REIS, M.G. Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 6, p. 567-569, 2006.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C vírus genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 2, p. 223 -235, 2000.

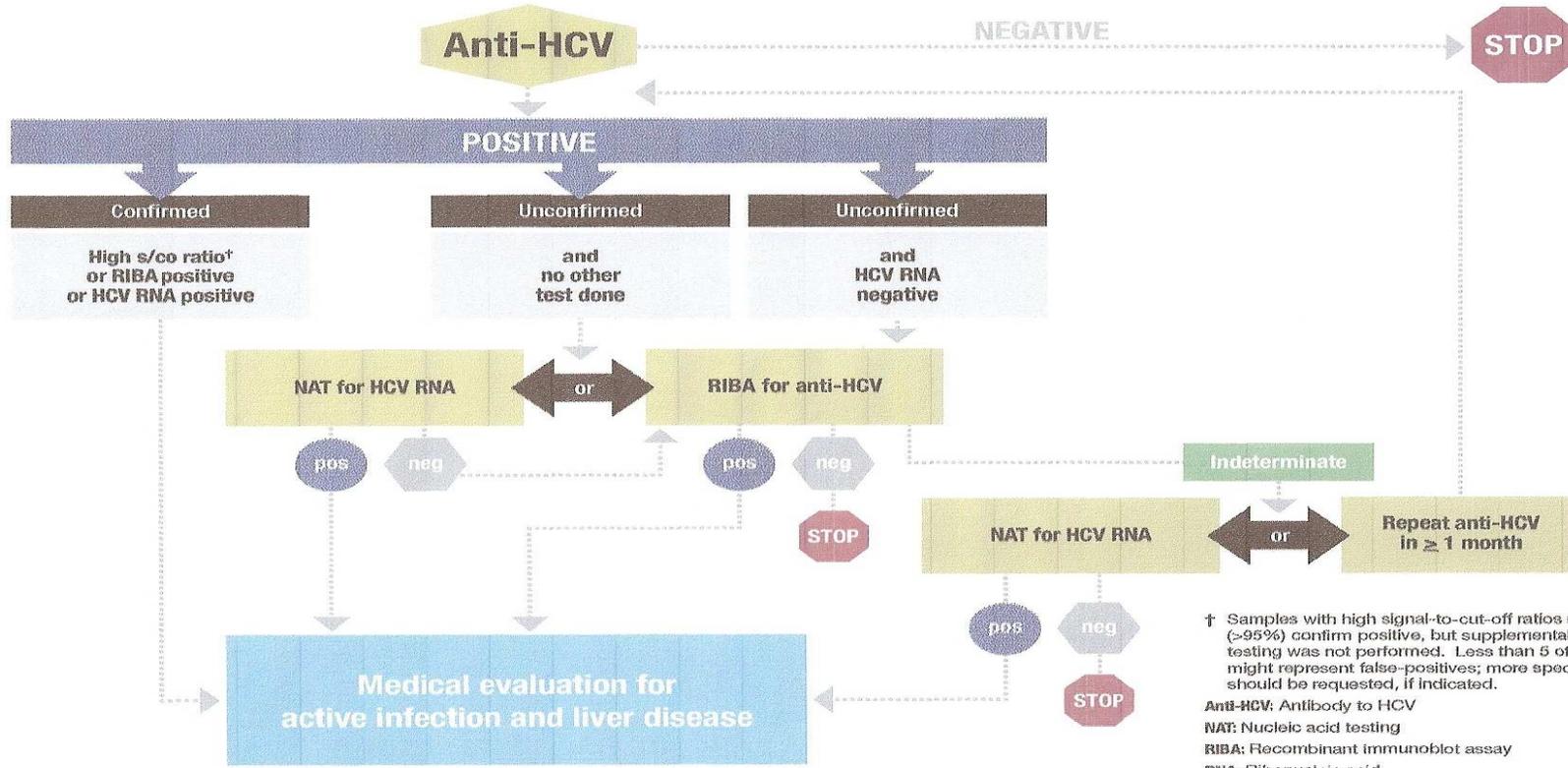
ANEXO I

Screening Test Kit Name	Manufacturer	Assay Format	Signal-to-cut-off ratio predictive of a true positive $\geq 95\%$ of the time
Ortho HCV Version 3.0 ELISA Test System	Ortho	EIA (Enzyme Immunoassay)	$\geq 3,8$
Abbott HCV EIA 2.0	Abbott	EIA (Enzyme Immunoassay)	$\geq 3,8$
VITROS Anti-HCV	Ortho	CIA (Chemiluminescent Immunoassay)	$\geq 8,0$
AXSYM Anti-HCV	Abbott	MEIA (Microparticle Immunoassay)	$\geq 10,0$
Architect anti-HCV	Abbott	CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)	$\geq 5,0$
Advia Centaur HCV	Bayer	CIA (Chemiluminescent Immunoassay)	$\geq 11,0$

Fonte: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/LabTesting.htm>

ANEXO II

Hepatitis C Virus (HCV) Infection Testing for Diagnosis



DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES
 Centers for Disease Control and Prevention
 Division of Viral Hepatitis



www.cdc.gov/hepatitis

Reference for Interpretation of Hepatitis C Virus (HCV) Test Results

If Your HCV Test Result Is:			Interpretation		Action
Anti HCV Screening Test*	Anti-HCV Supplemental Test RIBA†	HCV RNA	Anti HCV	HCV Infection	Additional Testing or Evaluation
Negative	Not Needed	Not Needed	Negative	None	No
Positive	Not Done	Not Done	Not Known	Not Known	Supplemental anti-HCV (RIBA) or HCV RNA
Positive	Not Done	Negative	Not Known	Not Known‡	Supplemental anti-HCV (RIBA)
Positive (high s/co ratio§)	Not Done	Not Done	Positive	Past/Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Negative	Not Needed	Negative	None	No
Positive	Positive	Not Done	Positive	Past/Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Positive	Negative	Positive	Past/Current‡	Repeat HCV RNA; Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Positive/Not Done	Positive	Positive	Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Indeterminate	Not Done	Indeterminate	Not Known	Test for HCV RNA or repeat anti-HCV testing
Positive	Indeterminate	Positive	Positive	Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Indeterminate	Negative	Indeterminate	Not Known‡	Test for HCV RNA or repeat anti-HCV testing

* EIA (enzyme immunoassay) or CIA (enhanced chemiluminescence immunoassay).

† RIBA (recombinant immunoblot assay), a more specific anti-HCV assay.

‡ Single negative HCV RNA result cannot determine infection status, as persons might have intermittent viremia.

§ Samples with high signal-to-cut-off ratios usually (>95%) confirm positive, but supplemental serologic testing was not performed. Less than 5 of every 100 might represent false positives; more specific testing should be requested, if indicated.

Anti-HCV: Antibody to HCV

RNA: Ribonucleic acid



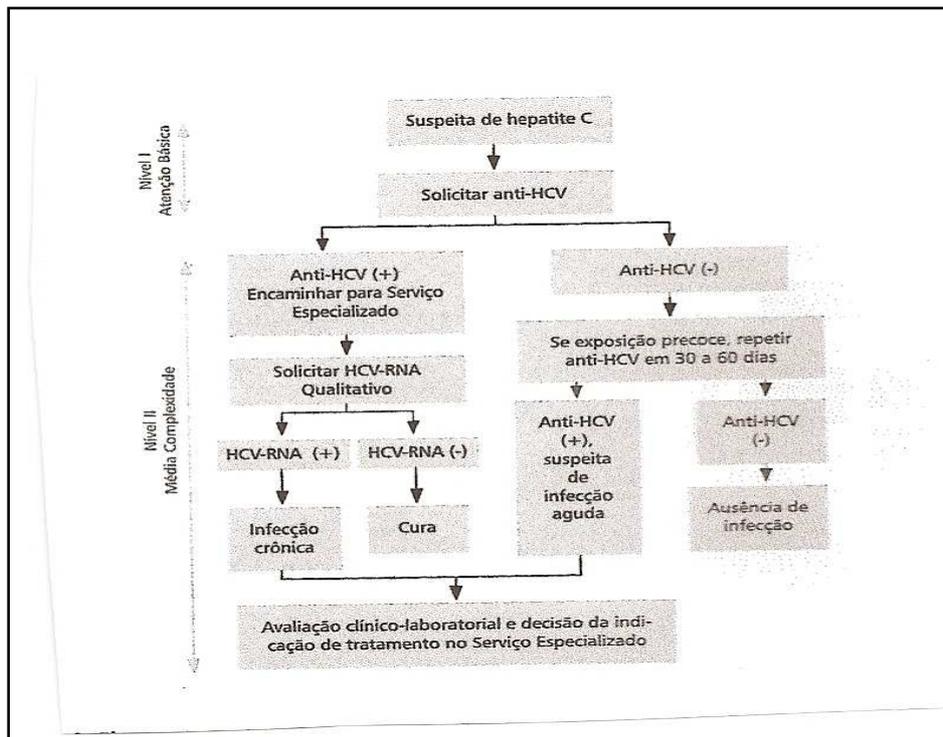
DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES
Centers for Disease Control and Prevention

Division of Viral Hepatitis



www.cdc.gov/hepatitis

ANEXO IV



FONTE: HEPATITES VIRAIS: O BRASIL ESTÁ ATENTO, 2008.

ANEXO V

Tabela 2. Valores de índice das amostras anti-VHC positivas com resultado do RIBA e suas proteínas.

AMOSTRA	ANTI-VHC INDEX	RIBA	C100	C33	C22	NS5
1	1,36	NEGATIVO	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
2	1,58	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE
3	1,66	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE
4	1,66	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE
5	2,07	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE
6	2,11	NEGATIVO	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
7	2,17	INDETERMINADO	AUSENTE	1+	AUSENTE	AUSENTE
8	2,34	INDETERMINADO	AUSENTE	3+	AUSENTE	AUSENTE
9	2,91	INDETERMINADO	AUSENTE	3+	AUSENTE	AUSENTE
10	3,18	POSITIVO	AUSENTE	2+	AUSENTE	1+
11	3,51	INDETERMINADO	AUSENTE	AUSENTE	3+	AUSENTE
12	3,74	INDETERMINADO	AUSENTE	AUSENTE	3+	AUSENTE
13	3,97	NEGATIVO	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
14	4,69	INDETERMINADO	AUSENTE	AUSENTE	3+	AUSENTE
15	4,76	INDETERMINADO	AUSENTE	3+	AUSENTE	AUSENTE
16	7,34	POSITIVO	2+	3+	2+	AUSENTE
17	8,06	POSITIVO	AUSENTE	4+	4+	AUSENTE
18	10,65	POSITIVO	1+	4+	4+	1+
19	10,74	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
20	11,21	POSITIVO	AUSENTE	4+	4+	3+
21	11,22	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
22	11,54	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
23	11,75	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
24	12,17	POSITIVO	4+	4+	4+	AUSENTE
25	12,62	POSITIVO	3+	4+	4+	4+
26	12,88	POSITIVO	4+	4+	4+	AUSENTE
27	12,88	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
28	13,43	POSITIVO	3+	4+	4+	AUSENTE
29	13,7	POSITIVO	4+	4+	4+	4+

Continuação

AMOSTRA	ANTI-VHC INDEX	RIBA	C100	C33	C22	NS5
30	13,85	POSITIVO	1+	4+	4+	4+
31	13,97	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
32	14,06	POSITIVO	AUSENTE	1+	4+	AUSENTE
33	14,1	POSITIVO	3+	4+	4+	4+
34	14,64	POSITIVO	3+	4+	4+	4+
35	14,68	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
36	15,16	POSITIVO	1+	2+	4+	AUSENTE
37	15,19	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
38	24,53	POSITIVO	4+	4+	4+	4+
39	24,74	POSITIVO	3+	4+	4+	AUSENTE