



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Oswaldo Cruz

**PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO ACADÊMICO**

**IMPACTO DE TESTES SOROLÓGICOS E MOLECULARES NA
AVALIAÇÃO CLÍNICA DA FASE INICIAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
DA HEPATITE C**

CARLOS AUGUSTO DA SILVA FERNANDES

Rio de Janeiro

Mai 2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

F363

Fernandes, Carlos Augusto da Silva

Impactos de testes sorológicos e moleculares na avaliação clínica da fase inicial da infecção pelo vírus da hepatite C / Carlos Augusto da Silva Fernandes. – Rio de Janeiro, 2010.

xvii, 118 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2010.

Bibliografia: f. 73-94

1. Hepatite C aguda. 2. Viremia intermitente. 3. Diagnóstico sorológico e molecular. 4. Prognóstico. I. Título.

CDD 616.362 3



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO ACADÊMICO**

**IMPACTO DE TESTES SOROLÓGICOS E MOLECULARES NA
AVALIAÇÃO CLÍNICA DA FASE INICIAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
DA HEPATITE C**

CARLOS AUGUSTO DA SILVA FERNANDES

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Medicina Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues

Rio de Janeiro

Maiο 2012

IMPACTO DE TESTES SOROLÓGICOS E MOLECULARES NA AVALIAÇÃO CLÍNICA DA FASE INICIAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

CARLOS AUGUSTO DA SILVA FERNANDES

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Medicina Tropical, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Avaliado e aprovado pela Banca Examinadora em 10 de maio de 2012 composta por:

Titulares:

Dra. Elisabeth Lampe – Presidente – IOC/Fiocruz

Dr. Davis Fernandes Ferreira – UFRJ

Dr. Adilson José de Almeida – UNIRIO

Suplentes:

Dra. Cristiane Alves Villela Nogueira – UFRJ

Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira – IOC/FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu chegar até este ponto da minha vida com sacrifício, mas dignidade.

Aos meus pais, Yara da Silva Fernandes e Augusto da Silva Fernandes (*in memoriam*) que me ensinaram que, além da escola, a família é o mais importante elo na formação do caráter de uma pessoa.

À minha orientadora, Dra. Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues, por me doar seu tempo, seu conhecimento e sua paciência.

À Dra. Clara Fumiko Tachibana Yoshida, uma fonte de conhecimento, carinho e inspiração.

À Dra. Elisabeth Lampe, pelo incentivo, apoio e esclarecimento no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da bancada de Hepatites Virais e diretoria do Laboratório Central Noel Nutels – LACEN/RJ, pela colaboração na realização das técnicas sorológicas e moleculares.

Aos também colegas do AVH – Ambulatório de Hepatites Virais e do LAHEP – Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais do IOC/FIOCRUZ, pela cooperação importante que deram neste trabalho.

À colega, Patrícia Pais Martins, pela sua generosidade na sessão dos dados de sua dissertação, que muito ajudou na formulação deste trabalho.

Aos amigos Marcelo Damiano Ferreira e Renata Mendonça, do Lab. de Virologia da UFRJ, pela ajuda com os conceitos, esquemas, opiniões e incentivo para que eu pudesse desenvolver o trabalho da melhor maneira possível.

Aos vários professores que tive na vida escolar e acadêmica, pela formação, informação e cultura que me transmitiram.

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência...”

(Rui Barbosa)

RESUMO

A partir da descoberta do vírus da hepatite C (HCV), vários testes sorológicos e moleculares têm sido desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HCV. Os objetivos deste estudo foram avaliar a dinâmica dos anticorpos anti-HCV, obtida pela leitura em densidade ótica/ponto de corte (do/co) dos testes sorológicos e, principalmente, o desempenho de metodologias moleculares para detecção do RNA do HCV em pacientes com resultados intermitentes na fase inicial da doença. Nos estudos sorológicos, foram realizados levantamentos epidemiológicos e dos valores de do/co dos anticorpos anti-HCV em 65 amostras de pacientes acompanhados desde a fase inicial de infecção pelo HCV. No estudo molecular, 244 amostras seriadas, coletadas durante a fase inicial de infecção pelo HCV, foram obtidas de 50 indivíduos que apresentavam viremia intermitente. As amostras foram submetidas a várias técnicas qualitativas para detecção do RNA do HCV e que foram realizadas de acordo com a disponibilidade à época dos testes. Porém, todas foram testadas pela técnica de Amplificação Mediada por Transcrição (TMA), que possui o maior limite inferior de detecção atualmente (9,6 UI/mL). Nos testes sorológicos constatamos uma relação significativa entre os valores dos anticorpos, medidos em do/co, com a evolução da infecção pelo HCV em fase inicial da doença e, verificando a dinâmica dos anticorpos, observamos que a queda rápida dos valores de do/co do anti-HCV é um excelente preditor de cura espontânea. Todas as técnicas moleculares obtiveram percentual elevado de resultados discordantes e acurácia baixa ou moderada, demonstrando a dificuldade em detectar níveis muito baixos de viremia. Nossos dados sorológicos demonstraram que o comportamento dos valores de leitura do/co dos anticorpos anti-HCV, em amostras seriadas mais frequentes, podem auxiliar no prognóstico de cura do paciente e na decisão de iniciar ou não o tratamento antiviral ainda no início da doença. O resultado não detectável por técnicas moleculares, dependendo dos limites de detecção da técnica utilizada, deve ser avaliado com cautela e, em caso de dúvida, optar pela realização de metodologias mais sensíveis.

Palavras-chave: Hepatite C aguda, viremia intermitente, diagnóstico sorológico e molecular, prognóstico.

ABSTRACT

THE IMPACT OF SEROLOGICAL AND MOLECULAR ASSAYS IN THE CLINICAL EVALUATION OF HEPATITIS C INFECTION IN THE INITIAL STAGE OF DISEASE

Since the discovery of the hepatitis C virus (HCV), several serological and molecular tests have been developed to aid in the diagnosis of HCV infection. The objectives of this study were to evaluate the dynamics of anti-HCV antibodies, obtained by reading optical density/cut-off (od/co) of serological tests, and especially the performance of molecular methods for detection of HCV RNA in patients with intermittent results in the initial phase of the disease. In the serological studies, epidemiological surveys were performed and values od/co from the anti-HCV antibodies of the samples from 65 patients treated at an early stage of HCV infection. In the molecular study, 244 serial samples collected during the initial phase of HCV infection were obtained from 50 individuals who presented intermittent viremia. The samples were subjected to several qualitative techniques for detection of HCV RNA which was performed according to the availability at the time of testing. However, all were tested by the Transcription Mediated Amplification (TMA), which currently has the highest sensitivity (9.6 IU / mL). In the serological tests we found a significant relationship between the values of antibodies measured in the od/co, with the evolution of HCV infection in the early stages of the disease, and verifying the dynamic of the antibodies, we observed that the quickly drop of the values of od/co from anti-HCV antibodies is an excellent predictor of spontaneous healing. All molecular techniques had a high percentage of discordant results and low or moderate accuracy, demonstrating the difficulty in detecting very low levels of viremia. Our serological data showed that the behavior of the reading values of od/co from anti-HCV antibodies in fresh serial samples may help in the healing prognosis of the patient and the decision to start or not the antiviral treatment yet in the initial phase of the disease. The results not detectable by molecular techniques, depending on the detection limits of the technique used, must be evaluated carefully and, if in case of doubt, choose to take more sensitive methodologies.

Keywords: Acute hepatitis C, intermittent viremia, serological and molecular diagnosis, prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático do genoma e da poliproteína do HCV.....	4
Figura 2. Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões brasileiras.....	6
Figura 3. Representação esquemática do ciclo replicativo do HCV.....	8
Figura 4. Prevalência da infecção pelo HCV por região geográfica.....	11
Figura 5. Esquema da reação de síntese de cDNA após ação da transcriptase reversa.....	18
Figura 6. Representação esquemática da reação de amplificação mediada por transcrição (TMA).....	20
Figura 7. Representação esquemática da reação de quantificação do RNA do HCV pela técnica do DNA ramificado.....	22
Figura 8. Distribuição temporal da realização dos diversos testes moleculares durante o estudo.....	38
Figura 9. Extrato da planilha de resultados moleculares dos pacientes em acompanhamento no AHV/IOC/Fiocruz e selecionados para nosso estudo...	39
Figura 10. Alinhamento de sequências da região 5'NC do RNA do HCV correspondente às posições dos iniciadores usados na técnica RT-PCR “in house”	45
Figura 11. Curva padrão obtida com 10 diluições de RNA do HCV sintético modificado, transcrição reversa e amplificação por PCR em tempo real.....	46
Figura 12. Representação gráfica da amostra de estudo e sua estratificação em elegíveis e não elegíveis.....	50
Figura 13. Gráfico da frequência de resultados de viremias intermitentes nas amostras selecionadas de pacientes que evoluíram para infecção crônica e cura espontânea, em relação ao período de acompanhamento.....	53
Figura 14. Padrões longitudinais de respostas seriadas de anticorpos anti- HCV (do/co) em 65 pacientes com infecção aguda pelo HCV durante os primeiros 12 meses de acompanhamento após a data estimada de infecção	55
Figura 15. Gráfico percentual de resultados obtidos pelas metodologias qualitativas e frequência de resultados concordantes e discordantes em relação a metodologia TMA.....	57

Figura 16. Valores percentuais de acurácia dos vários testes moleculares do estudo tendo como padrão-ouro o teste qualitativo por metodologia

TMA..... 60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos utilizados nos testes de detecção sorológica de anticorpos anti-HCV.....	15
Quadro 2. Características dos ensaios moleculares de RNA do HCV.....	24
Quadro 3. Oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-nested-PCR no LAHEP/IOC/Fiocruz.....	40
Tabela 1. Distribuição da amostra estudada de pacientes com infecção aguda pelo HCV segundo sexo e faixa etária.....	48
Tabela 2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais das amostras do estudo.....	50
Tabela 3. Características da amostra de estudo, considerando o perfil dos pacientes crônicos e com cura espontânea, em relação às variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais.....	52
Tabela 4. Características das amostras em relação à fase do tratamento antiviral e à concordância de resultados dos testes moleculares utilizados <i>versus</i> TMA.....	54
Tabela 5. Resultados obtidos pelas metodologias qualitativas durante o estudo e frequência de resultados concordantes e discordantes em relação aos encontrados pela metodologia TMA.....	57
Tabela 6. Número de testes moleculares quantitativos realizados por metodologia nas amostras do estudo.....	58
Tabela 7. Resultados obtidos pelas metodologias quantitativas durante o estudo e frequência de resultados concordantes e discordantes em relação aos encontrados pelo método de amplificação mediada por transcrição.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpos
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Vírus</i>
Anti-HCV	Anticorpo contra o antígeno “core” e “ns” do HCV
bDNA	<i>Branched DNA</i> ou DNA ramificado
C	Proteína do Core
CD36	<i>Cluster of differentiation</i> ou Grupo de diferenciação 36
CD81	<i>Cluster of differentiation</i> ou Grupo de diferenciação 81
cDNA	DNA complementar
CLDN1	Claudina 1
CLIA	Quimioluminescência
CMIA	Quimioluminescência por micropartículas
CO	<i>Cut-Off</i> (ponto de corte)
C _T	<i>Cycle Threshold</i>
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal (COOH) da proteína
CypA	Ciclofilina A
DDTC	Doença difusa do tecido conjuntivo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
E1	Glicoproteína do Envelope 1
E2	Glicoproteína do Envelope 2
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAN	Fator Antinuclear
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAG	Glicosaminoglicana
HAV	<i>Hepatitis A Virus</i> ou Vírus da hepatite A
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> ou Vírus da hepatite B
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> ou Vírus da hepatite C
HEV	<i>Hepatitis E Virus</i> ou Vírus da hepatite E
IL28B	Interleucina 28B
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
JFH1	Células da Hepatite Fulminante Japonesa 1
LAHEP	Laboratório de Hepatites Virais
miR-122	microRNA - 122
MEIA	Enzimaimunoensaio por micropartículas
MMLV	Vírus da leucemia murina de Moloney
NC	Não codificante
NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5A	Proteína não-estrutural 5A

NS5B	Proteína não-estrutural 5B
N-terminal	Extremidade Amino-terminal (NH ₂) da proteína
NTPase	Nucleotídeo-trifosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta
pb	Pares de bases
P7	Proteína P7
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG-IFN	Interferon Peguilado
RBV	Ribavirina
RE	Retículo endoplasmático
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RIBA	<i>Recombinant Immunoblot Assay</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RNase	Ribonuclease
RNA _{sin}	<i>RNase Inhibitor</i>
RNA _t	Ácido Ribonucleico transportador
RT-PCR	<i>Reverse transcription - polymerase chain reaction</i>
RVFT	Resposta virológica ao final do tratamento
RVP	Resposta virológica precoce
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SR-B1	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
T7	T7 RNA polimerase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification</i> – Amplificação Mediada por Transcrição
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> – Região não traduzida
3'UTR ou 3'NC	Região 3' não codificante ou não traduzida do HCV
5'UTR ou 5'NC	Região 5' não codificante ou não traduzida do HCV

LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Percentual
°C	Graus Celcius
=	Igual
>	Maior
<	Menor
/	Fração
±	Mais ou menos
5' – 3'	Sentido 5' – 3'
g	Gramas
kb	kilobases
mL	Mililitro
µL	Microlitro
min	minutos
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RLU	Unidade Relativa de Luz
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
<i>p</i>	Valor de probabilidade

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O VÍRUS DA HEPATITE C	1
1.1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ESTUTURA GENÔMICA	1
1.1.2 DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS	4
1.1.3 CICLO REPLICATIVO	7
1.2 PATOGENIA E TRANSMISSÃO	9
1.3 EPIDEMIOLOGIA	10
1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	12
1.4.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	13
1.4.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	16
1.4.2.1 Testes Qualitativos de RNA do HCV	17
1.4.2.2 Testes Quantitativos de RNA do HCV	20
1.4.2.3 Genotipagem do HCV	25
1.5 TRATAMENTO	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32

4. METODOLOGIA	33
4.1 DESENHO DO ESTUDO	33
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	33
4.3 AMBULATÓRIO DE HEPATITES VIRAIS – AHV	33
4.4 PACIENTES E AMOSTRAS BIOLÓGICAS	34
4.5 MÉTODOS	37
4.5.1 TESTES MOLECULARES QUALITATIVOS	40
4.5.1.1 RT- <i>nested</i> -PCR “in house”	40
4.5.1.2 Amplificação Mediada por Transcrição (TMA)	41
4.5.1.3 RT-PCR ELISA qualitativa	41
4.5.2 TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS	42
4.5.2.1 RT-PCR ELISA quantitativa	42
4.5.2.2 DNA ramificado (bDNA)	43
4.5.2.3 RT-PCR em tempo real	43
4.6 ANÁLISE DOS DADOS	47
5. RESULTADOS	48
5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE ESTUDO	48
5.1.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA INFECÇÃO CRÔNICA	51
5.1.2 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA ELIMINAÇÃO VIRAL	51
5.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ESTUDO	52
5.3 TESTES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HCV	54
5.4 TESTES MOLECULARES QUALITATIVOS	56
5.5 TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS	57
5.6 VERIFICAÇÃO DA ACURÁCIA DOS TESTES MOLECULARES	59
6. DISCUSSÃO	61
6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
6.2 ESTUDOS SOROLÓGICOS	62
6.3 ESTUDO MOLECULAR	65
7. CONCLUSÕES	72

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	95
ANEXO A. Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP/FIOCRUZ)	96
ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	98
ANEXO C. Publicações Científicas	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS DA HEPATITE C

Quando, no início da década de 70, foi possível o diagnóstico das hepatites A e B, ficou evidente que havia hepatites parenterais, pós-transfusionais, que não estavam associadas a esses vírus. Esses casos foram denominados de hepatites não-A não-B e, após anos de investigação, em 1989, Qui-Lim-Choo e colaboradores identificaram o vírus da hepatite C (HCV) como principal agente etiológico das hepatites não-A não-B (Choo *et al.* 1989). Este vírus foi responsável por 80 a 90% dos casos de hepatites pós-transfusionais (Houghton 2009), bem como o fato de ser a causa mais frequente de transplante hepático, fazendo com que constitua grave problema de saúde pública (Strauss 2001). Estima-se que a infecção pelo HCV tenha prevalência de 2,2% a 3,0% na população humana, correspondendo a cerca de 170 a 200 milhões de indivíduos no mundo, e que, após 20 anos de infecção crônica pelo HCV, cerca de 25% dos doentes desenvolvam cirrose hepática que, por sua vez, podem evoluir para carcinoma hepatocelular ou para a falência hepática (Caldwell & Park 2009; Lavanchy 2009).

1.1.1 CLASSIFICAÇÃO TAXÔNOMICA E ESTRUTURA GENÔMICA

A organização genômica do HCV é similar à dos vírus da família *Flaviviridae*, tal como dengue e febre amarela, sendo considerado do gênero *Hepacivirus* (Lloyd *et al.* 2007). A análise filogenética do HCV evidenciou uma similaridade com o genoma dos flavivírus e pestivírus (Giannini & Brechot 2003), embora possua muitas diferenças na sua organização a partir do genoma original dessas famílias e seja incomum para um vírus de genoma constituído de ácido ribonucleico (RNA) estabelecer infecção persistente na maioria dos indivíduos expostos (Simmonds 2004).

O HCV é constituído de uma partícula esférica com diâmetro de aproximadamente 60 a 75 nm, com um genoma de RNA fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 9600 nucleotídeos ou 9,6 kb e, até o momento, foram classificados seis genótipos e vários subtipos (Simmonds *et al.* 2005).

A análise do DNA complementar (cDNA) clonado do genoma do HCV revelou duas regiões não-codificantes em suas extremidades – 5'UTR (“Untranslated region”) e 3'UTR, também denominadas 5'NC (Não-codificante) e 3'NC - com uma sequência aberta de leitura entre elas (“Open Reading Frame – ORF”), que codifica uma poliproteína com aproximadamente 3010 a 3033 aminoácidos, dependendo do genótipo. A região 5'NC é formada por 341 nucleotídeos cuja sequência é altamente conservada entre os diferentes isolados do HCV, com mais de 92% de identidade nucleotídica. Esta região apresenta uma série de estruturas secundárias, denominada de “Internal Ribosome Entry Site (IRES)” ou sítio de entrada interna do ribossomo, responsável pela ligação do RNA viral ao ribossomo, determinando o início da síntese da poliproteína viral (Kato 2001). A região 3'NC consiste em uma sequência pouco conservada de aproximadamente 40 nucleotídeos, um trato de polipirimidina (poli-U ou poli-UC) de extensão variável e uma sequência altamente conservada contendo estruturas secundárias, de aproximadamente 98 nucleotídeos, chamada cauda X ou 3'X (Drexler *et al.* 2009). A região 3'NC possui papel importante na replicação viral durante a produção da fita negativa (Choo *et al.* 1991; Friebe & Bartenschlager 2002). Após a tradução sob ação autoproteolítica e proteolítica da célula hospedeira e das proteases virais, são produzidas as proteínas estruturais – Core (C) e Envelope (E1 e E2) – e as não-estruturais – p7 (também chamada de NS1), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Lindenbach & Rice 2005; Rehmann 2009).

Os genes estruturais estão situados mais próximos à extremidade 5'NC e codificam as proteínas integrantes da partícula viral: o gene C codifica a proteína do capsídeo e os genes E1 e E2 as glicoproteínas dos envelopes correspondentes. A proteína core é uma proteína estrutural que participa da formação do nucleocapsídeo viral e é uma das proteínas mais conservadas do HCV (Choo *et al.* 1991; Kaito *et al.* 1994). As duas glicoproteínas de envelope, E1 e E2, desempenham papel importante na entrada do vírus na célula por meio da ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira e posterior indução da fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula (Bartosch & Cosset 2006; Cocquerel *et al.* 2006), além de participar da montagem das partículas infecciosas (Wakita *et al.* 2005). Entre as regiões E2 e NS2, separando as proteínas estruturais das não-estruturais, existe uma região hipervariável, p7, que codifica uma proteína de membrana da família das viroporinas, atuando como um canal de íons cálcio (Gonzalez & Carrasco 2003). Possui dois segmentos transmembrana ligados por

alça citoplasmática. Não está envolvida na replicação *in vitro*, mas estudos mostram que possui importante papel no processo de entrada celular, devido a sua interatividade com o receptor de membrana CD81 (Drummer & McKeating 2011; Farquhar *et al.* 2012; Harris *et al.* 2008), na maturação e liberação do vírus *in vivo* (Griffin *et al.* 2003). Também parece ser essencial para a infectividade do HCV em chimpanzés, além de conter sequências genótipo-específicas (Sakai *et al.* 2003).

A proteína NS2, cuja função é formar o complexo proteolítico NS2-NS3, é a responsável pela clivagem autocatalítica da junção NS2/NS3, com liberação de NS2 e NS3 e auxilia também na fosforilação da NS5A. A NS3 possui atividade de serino-protease em sua extremidade N-terminal e atividades de RNA-helicase e nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) em sua extremidade C-terminal (Raney *et al.* 2010). Com a NS4A forma um complexo estável e promove a clivagem da poliproteína na região posterior adjacente a NS3, liberando os componentes do complexo de replicação viral (Lindenbach & Rice 2005). A NS4B é uma proteína altamente hidrofóbica que parece atuar no complexo replicativo, sendo detectada em associação às membranas do retículo endoplasmático (RE). A NS5A é uma proteína que está ancorada no RE por meio de sua parte N-terminal (Gretton *et al.* 2005), sendo essencial para a replicação do genoma (Appel *et al.* 2006; Seeger 2005). A proteína NS5B tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), sendo desprovida de atividade reparadora na incorporação incorreta de novas bases (“proofreading”), o que leva a formação de *quasispecies* (Bartenschlager *et al.* 2004; Ranjith-Kumar & Kao 2006).

A figura 1 ilustra um modelo esquemático do genoma do HCV e da poliproteína codificada pela sua ORF.

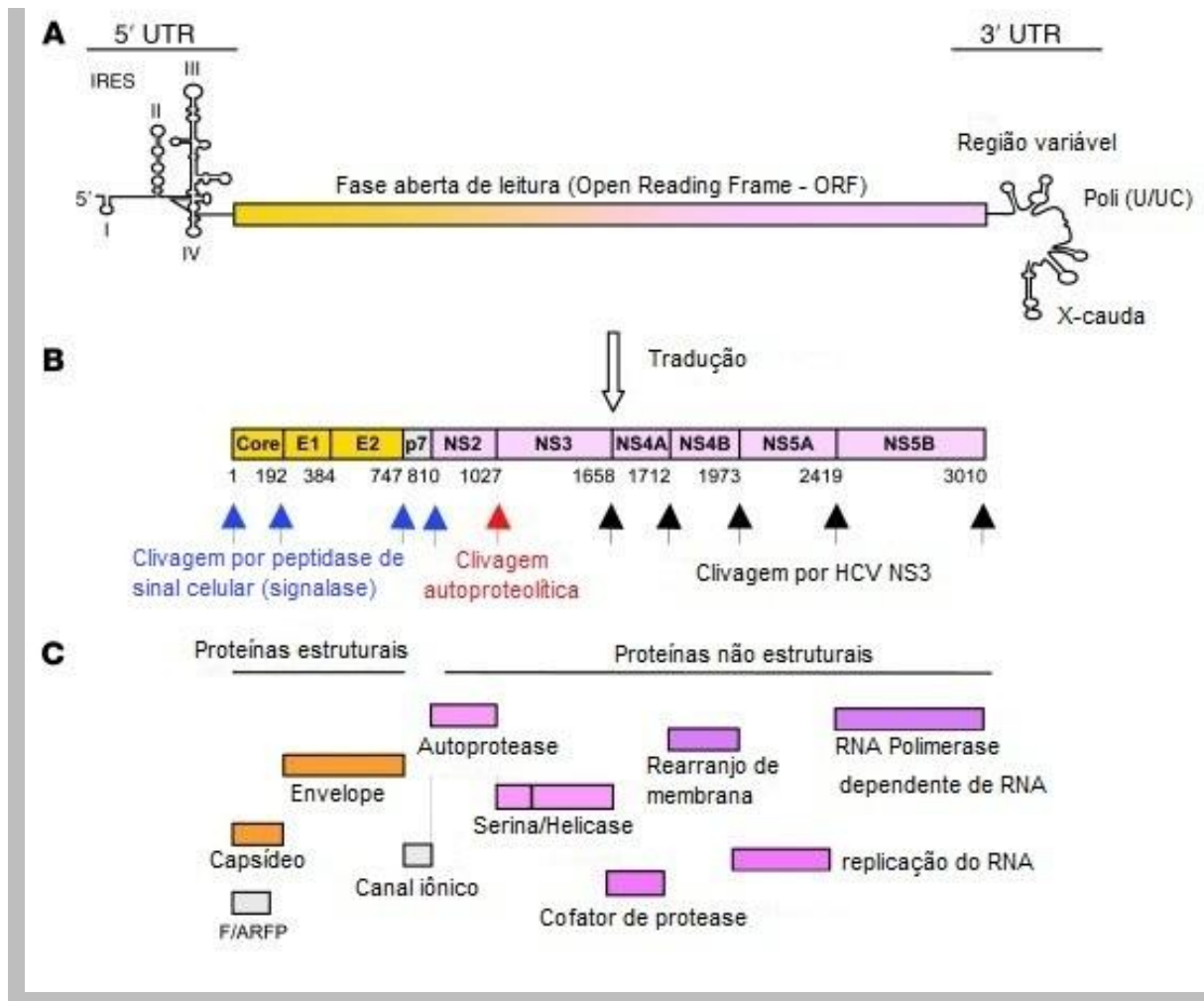


Figura 1. (A) O genoma fita simples do RNA do HCV codifica uma fase de leitura aberta (ORF) flanqueada por duas regiões não-codificantes (UTR), que contêm sinais para a proteína viral e síntese de RNA e à coordenação de ambos os processos. A tradução é iniciada através de um sítio interno de entrada ribossomal (IRES), na extremidade 5'UTR. U = uridina; C = citidina. **(B)** A poliproteína traduzida é processada por proteases celulares e virais. Os números abaixo da poliproteína indicam as posições dos aminoácidos nos sítios de clivagem. **(C)** Resultam 10 proteínas estruturais e não-estruturais. A proteína F ("frameshift") é traduzida a partir de uma fase de leitura alternativa (ARF). Fonte adaptada: Rehemann (2009).

1.1.2 DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBTIPOS

A análise filogenética de isolados do HCV obtidos em várias regiões do mundo levou a identificação de diferentes genótipos do HCV, incluindo seis tipos principais, enumerados de 1 a 6, e um grande número de subgrupos dentro destes genótipos, chamados "subclados" ou "subtipos" e identificados por letras minúsculas (1a, 1b, etc.). Um novo isolado está sendo proposto com o objetivo de ser classificado como genótipo 7 (Kuiken & Simmonds 2009; Murphy *et al.* 2007). Os genótipos diferem de 31% a 33% em suas sequências de nucleotídeos, enquanto os

subtipos diferem em 20% a 25% em suas sequências, com importantes diferenças conforme a região genômica (Simmonds *et al.* 2005).

A variabilidade genética, ocasionada pela incorporação errônea de nucleotídeos, é observada em vários níveis: genótipos, subtipos e *quasispecies*, que são variantes com certo grau de heterogeneidade genética entre sequências de um mesmo genótipo, porém, muito relacionadas entre si. Isso é possível devido à falta de atividade corretiva da RNA polimerase viral durante a replicação, fazendo surgir pequenas e constantes mutações com importantes consequências biológicas (Lauring & Andino 2010). Isto pode permitir que o HCV escape da resposta imunológica e estabeleça infecção crônica (Burke & Cox 2010; Gal-Tanamy *et al.* 2008; Sklan *et al.* 2009). Devido a esta grande quantidade de erros na replicação, pode ocorrer uma taxa de erro entre 1/10.000 e 1/100.000 pares de bases associada a uma taxa de “turnover” de 10^{12} vírions por dia, o que explica parte da altíssima variabilidade nucleotídica do HCV (Blackard *et al.* 2008; Simmonds 2004).

A maior ou menor diversidade das *quasispecies* parece estar relacionada com a pressão imunológica (Jardim *et al.* 2009). Apesar desta diversidade entre as sequências, todos os genótipos possuem a mesma organização genômica, ciclo de replicação e capacidade de desenvolver infecção crônica (Simmonds 2004).

A ocorrência de *quasispecies* no HCV pode ser mais bem ilustrada pela análise de um segmento curto, mas acentuadamente variável, na região codificante do envelope viral, principalmente na glicoproteína E2, designada região hipervariável 1 (HVR1). As glicoproteínas E1 e E2 possuem um elevado grau de variabilidade e são responsáveis pela ligação dos vírus à superfície das células (Timm & Roggendorf 2007; Vieyres *et al.* 2011). O aumento dessa diversidade parece estar relacionado à pressão imunológica do hospedeiro, já que foi observado que prejudicam o reconhecimento e ligação dos anticorpos neutralizantes (Sklan *et al.* 2009), sendo uma das causas da dificuldade em se encontrar terapia antiviral eficaz (Law *et al.* 2008).

Em relação à prevalência dos genótipos do HCV, foi observado que se originaram a partir de diversas áreas na África e Ásia e alguns deles se espalharam amplamente por todos os continentes. O genótipo 1 (subtipos 1a e 1b) é de longe o mais prevalente na população mundial, com maior prevalência do subtipo 1b na Europa e 1a nos EUA. Na América do Sul, predomina o subtipo 1b, também o mais frequente no Japão (Smith *et al.* 1997; Sy & Jamal 2006). O genótipo 2 é encontrado em agregados na região do Mediterrâneo (EASL 2011). Na China, os genótipos 2 e

3 são os mais comuns. Na Tailândia, o genótipo 3 (subtipo 3a) foi o mais predominante, seguido dos genótipos 1 (subtipos 1a e 1b) e 6. O genótipo 3 é altamente prevalente no subcontinente indiano e em Europeus usuários de drogas intravenosas. Neste grupo, atualmente, tem ocorrido um aumento da incidência e prevalência de infecções relacionadas com o genótipo 4 do HCV. O genótipo 4 é o genótipo mais prevalente na África e no Oriente Médio. O genótipo 5 ocorre na África do Sul e o 6 na Ásia (Nainan *et al.* 2006; Sy & Jamal 2006).

Na figura 2 é apresentada a distribuição dos genótipos no Brasil. O genótipo 1 é o mais prevalente seguido do genótipo 3 e genótipo 2 (Campiotto *et al.* 2005). O genótipo 1 tem prevalência que varia de 51,7% a 74,1%, seguido do genótipo 3, com taxa aproximada de 30,6% e do genótipo 2, com taxa de prevalência de aproximadamente 4,6%. Na região sul, há um equilíbrio maior entre as prevalências dos genótipos 1 e 3, com taxas de 54% e 41%, respectivamente (Espírito-Santo *et al.* 2007; Silva *et al.* 2007). Os genótipos 4 e 5 são pouco comuns, porém, já foram descritos em alguns estudos (Lampe *et al.* 2002; Levi *et al.* 2002).

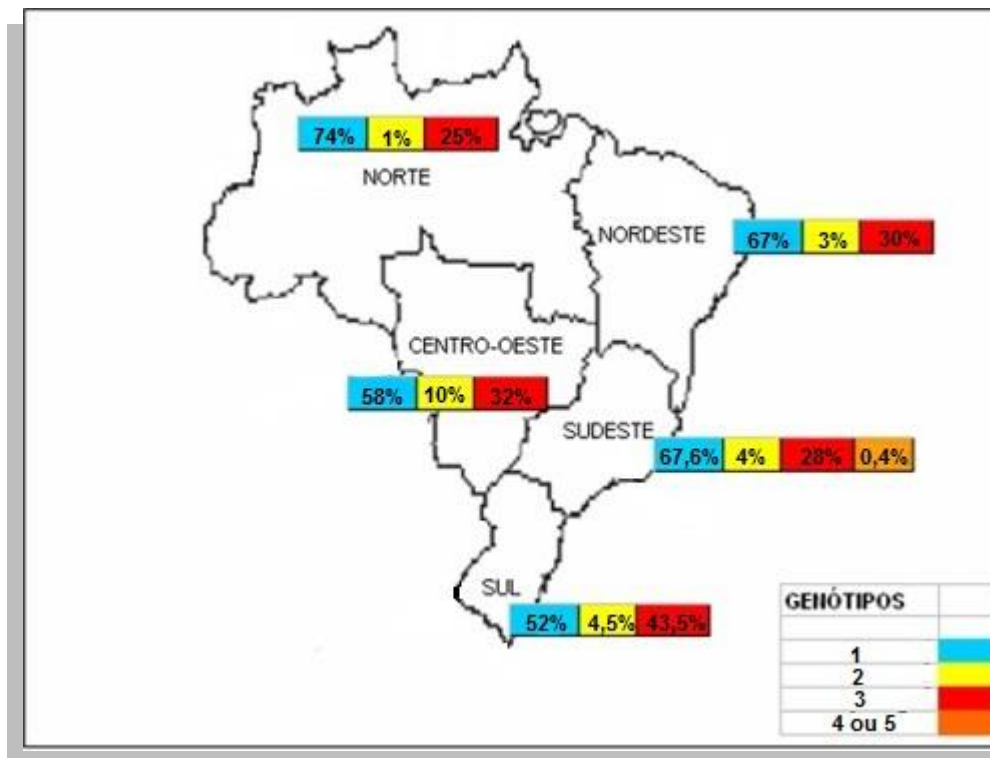


Figura 2. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C nas diferentes regiões brasileiras. Os valores percentuais foram aproximados. Fonte modificada: Campiotto *et al.* 2005.

1.1.3 CICLO REPLICATIVO

Tal como acontece em toda família *Flaviviridae*, após o processo de adsorção da partícula viral segue a endocitose da partícula e a imediata fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica (endossomos), cobertas por clatrininas (Helle & Dubuisson 2008). Vários receptores celulares e moléculas correceptoras estão envolvidos no processo de adsorção do vírus à célula hospedeira, como por exemplo: moléculas de superfície celular da superfamília CD36 denominadas SR-B1 (“Scavenger receptor class B type I”); receptor da lipoproteína de baixa densidade (VLDL); fibronectina; glicoproteína plaquetária VI; lectinas tipo C; glicosaminoglicanas (GAG); e proteína claudina-1 (CLDN-1). É também atribuído o papel de receptor de membrana à molécula CD81, da superfamília das tetraspaninas, presente em hepatócitos e linfócitos, que se ligaria à fração glicoproteica E2 do envelope viral (Farquhar *et al.* 2012; Harris *et al.* 2008; Sabahi 2009; Timpe *et al.* 2008; Witteveldt *et al.* 2009).

Após a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, o genoma viral é liberado para o citossol. A exposição do vírion ao pH ácido dos endossomos, que provavelmente induz mudanças conformacionais das proteínas do envelope, seguido por um retorno até pH neutro, não afeta a infectividade do HCV, sugerindo que as proteínas do envelope do HCV precisam de um gatilho adicional, tais como interação do receptor, para se tornar sensíveis ao pH baixo (Dubuisson *et al.* 2008).

Inicia-se a tradução do RNA em que os ribossomos reconhecem a sequência *IRES*, que se localiza junto ao códon AUG, na extremidade 5'NC. À medida que a tradução ocorre, os aminoácidos que surgem sinalizam para que o complexo traducional (RNAm – ribossomos – RNAt – peptídeo) se dirija para a membrana do RE. No RE rugoso, a sequência é deslocada para a luz do retículo, pois é lá que estão presentes as enzimas peptidases celulares que executarão as clivagens proteolíticas antes da incorporação dos carboidratos necessários para a constituição dos novos envelopes. As proteases celulares executam as clivagens que originam as proteínas estruturais (C, E1 e E2) e o polipeptídeo p7 (Moradpour *et al.* 2007; Penin *et al.* 2004a). Uma vez liberada a primeira das proteínas não-estruturais, a NS2, inicia-se sua autoclivagem e uma série de eventos bioquímicos que dão origem as outras proteínas não-estruturais (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), a partir do restante da cadeia proteica. A associação da NS5A com a NS5B inicia a atividade da RNA polimerase-dependente de RNA (RpRd), gerando fitas negativas de RNA

complementar ao RNA viral que servem de molde para que as RpRd sintetizem as novas fitas de RNA de polaridade positiva. A sequência de vários desses eventos gera acúmulo de elementos que serão usados para a montagem das novas partículas virais (Giannini & Brechot 2003; Moradpour *et al.* 2007; Pawlotsky *et al.* 2007). As novas fitas de RNA viral são então encapsidadas no RE, formando os nucleocapsídeos, os quais são a seguir envelopados e maturados no aparelho de Golgi, antes de serem liberados no espaço pericelular por exocitose (Penin *et al.* 2004b). A Figura 3 esquematiza o ciclo replicativo do HCV desde sua entrada, desnudamento, tradução no RE, processamento, “empacotamento”, maturação e liberação da partícula infectante (HCV).

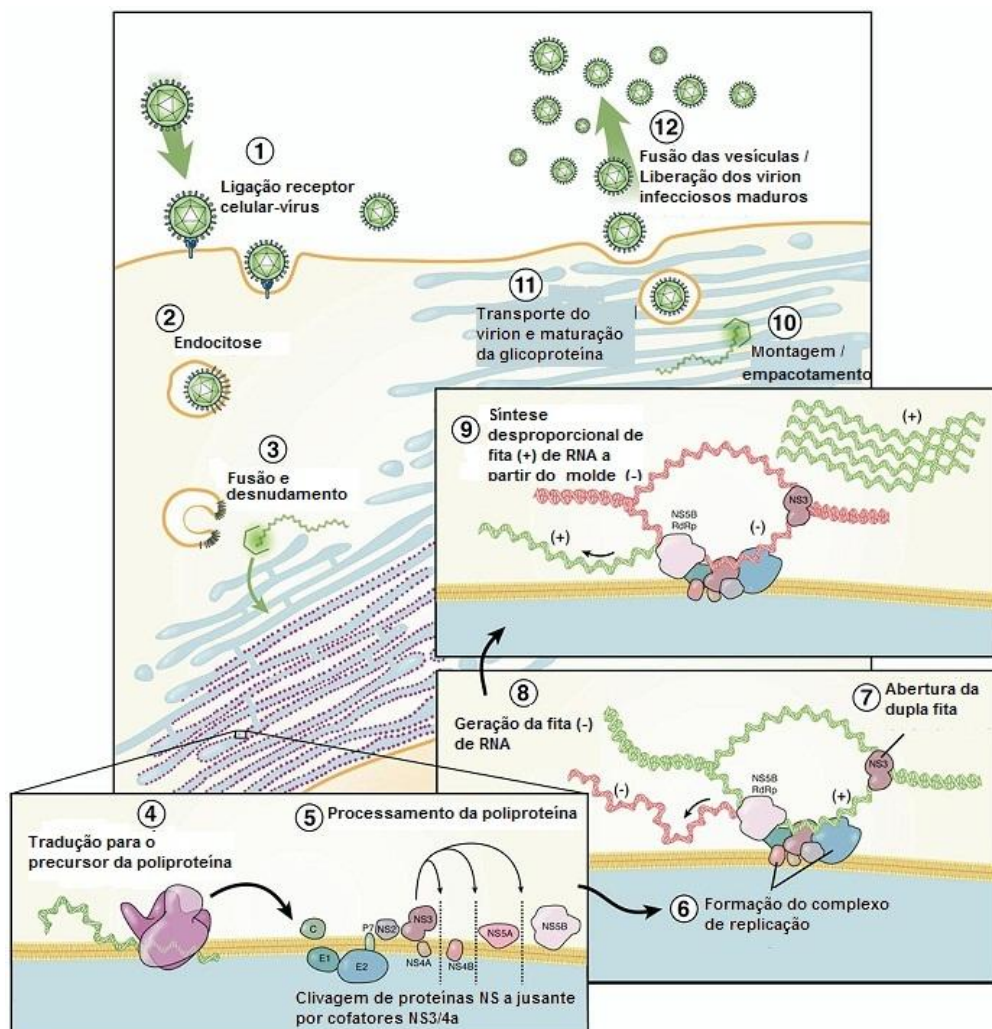


Figura 3. Representação esquemática do ciclo replicativo do HCV. (1) Interação dos receptores de membrana celular e partículas virais com internalização do vírus; (2) Endocitose; (3) Desnudamento e liberação citoplasmática; (4) Tradução mediada por IRES e processamento do precursor da poliproteína; (5) Processamento da poliproteína com a clivagem das proteínas não-estruturais; (6) Formação do complexo de replicação; (7, 8 e 9) Replicação do RNA; (10) Empacotamento e montagem; (11) Maturação do vírion nas vesículas de transporte; (12) Liberação do vírion. Fonte modificada: Pawlotsky *et al.* 2007.

Após a infecção, o HCV se distribui rapidamente pela corrente sanguínea até os hepatócitos. Contudo, há evidências da presença do vírus também em linfócitos, plaquetas, células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (de Almeida *et al.* 2009; Flint *et al.* 2001; Yan *et al.* 2000).

1.2 PATOGENIA E TRANSMISSÃO

O HCV é responsável por cerca de 90% dos casos relacionados à hepatite viral crônica. Entretanto, é dificilmente reconhecido na fase inicial (também denominada aguda ou precoce) da infecção devido à ausência de sintomas que, quando presentes, são geralmente discretos (Guobuzaitė *et al.* 2008). As formas crônicas, por sua vez, podem evoluir para casos graves e fatais de doença hepática (Pawlotsky 2009). Por convenção, o termo “agudo” refere-se aos primeiros seis meses de infecção com ou sem sintomas após uma presumida exposição ao HCV (Blackard *et al.* 2008).

Apesar de 20% a 50% dos indivíduos infectados com HCV alcançarem resolução espontânea na fase inicial da doença, entre 50% a 80% dos indivíduos irão progredir para infecção crônica (Kamal 2008). Aproximadamente 20% dos pacientes com infecção crônica podem desenvolver cirrose 20 a 30 anos após a infecção (Schiff 2011) e, destes, 4% irão evoluir para hepatocarcinoma (Thomas & Seeff 2005).

Dentre os possíveis modos de transmissão do HCV destacam-se as transfusões sanguíneas, hemodiálise, contaminação com agulhas, seringas e materiais intravenosos (Fagundes *et al.* 2008). Seu potencial infeccioso por via sexual não é eficiente, mas a precocidade e promiscuidade, sem barreira protetora, aumentam os riscos de contaminação. A transmissão vertical também é considerada pouco comum e ocorre quando há altas concentrações do vírus na mãe, provavelmente, no momento do parto (Rakela *et al.* 2003).

Usuários toxicodependentes de drogas endovenosas são, hoje, o principal grupo de risco pelo uso compartilhado de agulhas e seringas, uso múltiplo de medicações endovenosas e acessórios para uso de drogas injetáveis contaminados pelo HCV (Lopes *et al.* 2009; McGovern *et al.* 2006; Williams 2004). A transmissão nosocomial tem sido relatada como uma via de transmissão comum em muitos

países como Brasil e Espanha (Ferreira A de *et al.* 2011; Martinez-Bauer *et al.* 2008).

Um grupo de risco importante é formado por pessoas transfundidas antes de 1993, pois os primeiros testes imunoenzimáticos surgiram naquele ano (Chen & Morgan 2006). Outros grupos de risco relevantes são os indivíduos portadores de HIV e presidiários (Fagundes *et al.* 2008).

As manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV são as mais variadas possíveis. A infecção crônica está fortemente associada à crioglobulinemia mista, glomerulonefrite membrano-proliferativa e porfiria cutânea tardia (Bataille *et al.* 2012). Com associação patogênica menos evidente, encontra-se também relacionada com úlcera corneana de Mooren, líquen plano e fibrose pulmonar. A ocorrência de anticorpos antitireoidianos e hipotireoidismo tem sido relatada em associação com a infecção crônica em mulheres. As associações entre a infecção crônica pelo HCV, a presença de fator reumatoide e anticorpo antinuclear (FAN), fenômeno de Raynaud e doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC), como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren e vasculites sistêmicas, são relatadas em alguns trabalhos. A fibromialgia também tem sido considerada como muito prevalente em pacientes infectados pelo HCV, especialmente mulheres (Cacoub *et al.* 1999; Chen & Morgan 2006; Ribeiro *et al.* 2007).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Mesmo com os dados escassos até o momento, estima-se que cerca de 3% da população mundial, o equivalente a aproximadamente 170 milhões de pessoas, estejam infectadas pelo HCV com variações que dependem da área geográfica, quer seja no mesmo continente, quer seja no mesmo país e, dentro de um mesmo país, entre cidades diferentes (Pawlotsky 2009).

A morbidade e mortalidade relacionadas com o HCV registrada na atualidade é o resultado de um aumento na disseminação do HCV durante o século 20. A ampla disponibilidade de terapias injetáveis e uso ilícito de drogas injetáveis parece ser uma das responsáveis por este aumento (Alter 2007). Estima-se que morrem todos os anos cerca de 250.000 a 350.000 pessoas com relatos de cirrose

descompensada ou hepatocarcinoma associadas à infecção crônica pelo HCV (Chevaliez & Pawlotsky 2007).

A dificuldade de se obter dados precisos de prevalência deve-se à falta de estudos que envolvam amostras representativas da população. A maioria dos estudos de prevalência da infecção pelo HCV tem-se limitado aos pré-doadores de sangue, o que contribui para subestimar os dados de prevalência da infecção pelo HCV.

A prevalência é considerada baixa, entre 0,01% a 0,5%, na Europa Ocidental e em alguns países das Américas e Austrália. De maneira geral, o continente africano é considerado de prevalência intermediária, da mesma forma que Europa Oriental, Ásia, Oriente Médio e Índia. Em alguns países da África, como Ruanda e Camarões, as taxas de prevalência são elevadas, mas a maior prevalência de anticorpos anti-HCV é no Egito, entre 17% e 26%. Igualmente elevada é a prevalência em países como Mongólia e Paquistão (Alter 2007; Shepard *et al.* 2005; Wasley & Alter 2000; Yen *et al.* 2003) (Figura 4).

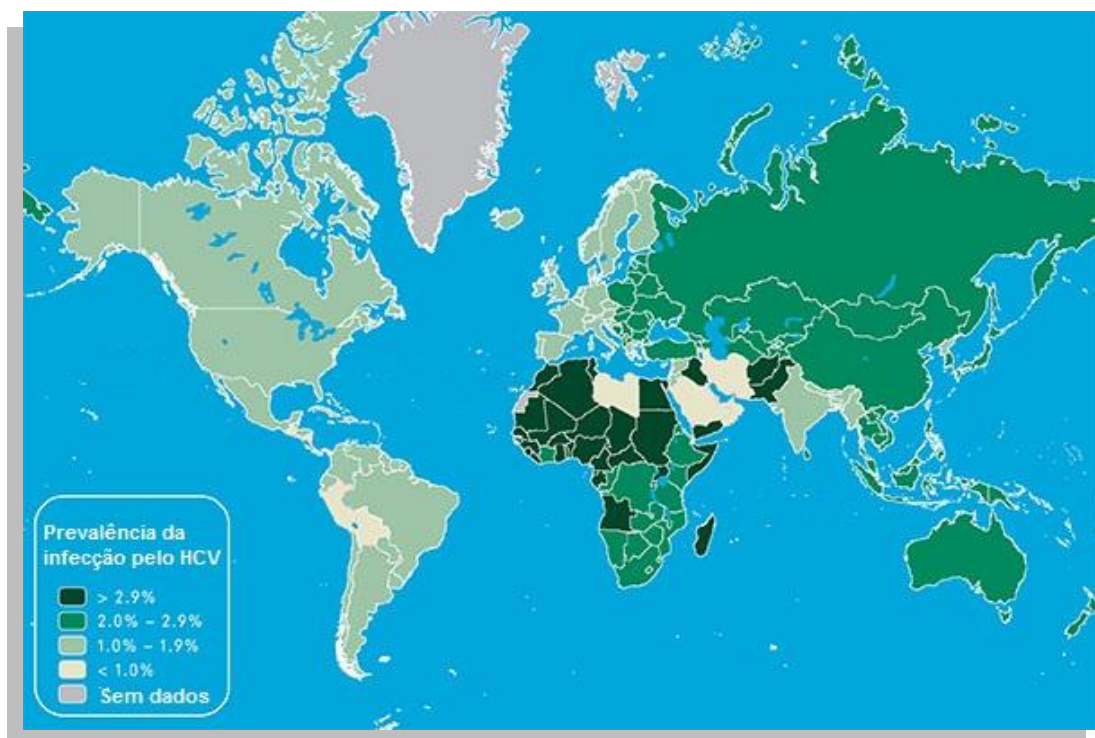


Figura 4. Prevalência mundial da infecção pelo HCV por região geográfica. Fonte modificada: (CDC 2011; Chevaliez & Pawlotsky 2006).

Nos EUA, aproximadamente cinco milhões de pessoas têm hepatite C crônica (Zeremski *et al.* 2009). Isso está associado ao fato da difusão da toxicod dependência

endovenosa, pois o uso de drogas injetáveis é, atualmente, o principal modo de transmissão do HCV em países desenvolvidos (Afdhal 2004; Shepard *et al.* 2005).

Com base em vários estudos, identificaram-se três padrões epidemiológicos distintos para faixa etária. O primeiro caracteriza-se por baixa prevalência em indivíduos com menos de 20 anos, com aumento dos 30 aos 50 anos e declínio após os 50 anos. Este perfil sugere que a infecção ocorreu em passado recente. É o que se observa em países como EUA, Austrália e Brasil. O segundo padrão descreve prevalência elevada em população idosa de países como Itália e Japão. Isso demonstra que a transmissão ocorreu em passado distante. O terceiro padrão é caracterizado por aumento progressivo da infecção com a idade, mantendo-se alta em todas as idades, onde o risco persiste, como no Egito (Wasley & Alter 2000; Yen *et al.* 2003).

Os poucos estudos sobre a prevalência da infecção pelo HCV no Brasil referem-se a doadores de sangue, hemodialisados e hemofílicos. Com base em dados da rede de hemocentros de pré-doadores de sangue, em 2002, a distribuição da infecção pelo HCV variou entre as regiões brasileiras: 0,62% no Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul (Paltanin & Reiche 2002; Valente *et al.* 2005).

Segundo resultados do recente “Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil”, publicado pelo Ministério da Saúde e pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a prevalência do marcador sorológico anti-HCV foi, em média, de 1,56% na faixa etária de 20 a 69 anos, correspondendo a cerca de três milhões de pessoas portadoras do HCV no Brasil (Ministério da Saúde 2010).

1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico precoce da infecção pelo HCV é fundamental na evolução da doença, uma vez que a resposta terapêutica na fase inicial da infecção é mais eficaz (Gerlach *et al.* 2003).

Como a infecção aguda pelo HCV é assintomática na maioria dos casos são escassas as informações sobre o curso natural da doença nesta fase (Cox *et al.* 2009), bem como os mecanismos imunológicos envolvidos na resolução espontânea da doença (Takaki *et al.* 2000). Além disso, a falta de um marcador específico para a

fase inicial torna difícil a sua investigação clínica e laboratorial (Santantonio *et al.* 2008). O diagnóstico da infecção aguda pelo HCV é impreciso, já que os testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HCV não diferenciam entre infecção aguda e crônica. Embora as características virológicas, como flutuações da carga viral e baixos níveis de viremia, sejam consideradas por alguns pesquisadores sinais de infecção aguda pelo HCV, esses parâmetros não têm sido utilizados para o seu diagnóstico (McGovern *et al.* 2009).

Ensaio moleculares foram desenvolvidos para detectar, quantificar e/ou caracterizar o genoma do HCV em indivíduos infectados (Gretch 1997). O desenvolvimento e a utilização da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção do HCV se iniciaram há pouco mais de 20 anos e sua sensibilidade e especificidade permitiram a detecção da infecção antes mesmo do aparecimento de anticorpos anti-HCV (Garson *et al.* 1990; Zaaijer *et al.* 1993). O período de janela imunológica é caracterizado pela soroconversão 2 a 3 meses após a exposição ao vírus. Desta forma, a detecção do RNA viral tornou-se uma ferramenta essencial para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCV. Uma das principais vantagens da detecção do RNA do HCV é a possibilidade de se obter um diagnóstico precoce da infecção viral aguda (Germer & Zein 2001).

A detecção do RNA do HCV constitui método padrão-ouro para diagnóstico e monitoramento terapêutico da infecção pelo HCV e a análise quantitativa ou carga viral é importante para a avaliação da resposta virológica do portador da hepatite C que se encontra em tratamento antiviral (Brandao *et al.* 2001; Calvaruso & Craxi 2012; Davis 2002).

1.4.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O teste imunoenzimático de detecção de anticorpos anti-HCV apresenta como vantagens o fácil manuseio, rapidez no processamento, alta confiabilidade e custo relativamente baixo. São amplamente utilizados para triagem e sua utilização em bancos de sangue se tornou obrigatória no Brasil a partir de 1993 (Portaria nº 1.376 de 19 de Novembro de 1993) (Ministério da Saúde 1993; Moller & Krarup 2003).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HCV foram aprimorados ao longo dos anos. Os primeiros testes utilizados foram os testes de

rastreamento “Enzyme Immunoassay (EIA)” e “Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)” e os testes suplementares “Recombinant Immunoblot Assay (RIBA)” e “Line Immunoassay (LIA)”. Os testes ELISA de primeira geração (ELISA I) tinham como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3 (derivado da região não-estrutural limite entre NS3 e NS4), com sensibilidade de 80% (Gretch *et al.* 1992). A segunda geração de testes ELISA (ELISA II) foi desenvolvida em 1992, nos EUA, com a incorporação de duas proteínas recombinantes do HCV: a c22-3 (derivada da região estrutural core) e a c33-c (derivada da região não-estrutural NS3). A proteína c33-c foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste e, dessa forma, reduziu o tempo médio de detecção de anticorpos durante o período de soroconversão (Alter 1992; Tobler *et al.* 1993). Foram incluídos, no teste ELISA de terceira geração (ELISA III), antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e adicionado um antígeno da região NS5. A principal vantagem desta nova geração de ELISA foi a redução ainda maior do tempo médio de detecção de anticorpos. Entretanto, o aumento na sensibilidade do ELISA III foi atribuído à nova configuração dos antígenos e não à presença do antígeno NS5. (Barrera *et al.* 1995; Gretch 1997; Maertens *et al.* 1999; Uyttendaele *et al.* 1994). A detecção precoce também pode ser realizada pelo teste de quarta geração de ELISA (ELISA IV), já disponível no mercado, que detecta antígeno core do HCV e anticorpos anti-core e anti-NS3 em amostras de soro ou plasma, permitindo redução do período de janela imunológica com alta sensibilidade e especificidade (Lambert 2007; Tuke *et al.* 2008).

A baixa especificidade dos testes ELISA I e II determinou o desenvolvimento de testes suplementares para o diagnóstico da infecção pelo HCV em indivíduos com resultados positivos ao ELISA. Os testes suplementares mais utilizados são comercializados com o nome de RIBA (Chiron Corporations, EUA) e INNO-LIA (Innogenetics, EUA). O princípio dos testes é idêntico: uma fita de nitrocelulose, revestida com proteínas recombinantes de antígenos de regiões específicas do HCV, permite a identificação de cada anticorpo pela região viral correspondente. O resultado é obtido pelo surgimento de bandas na fita que são comparadas a um cartão de leitura (Brandao *et al.* 2001; Maertens *et al.* 1999).

O quadro 1 mostra as proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos empregados nas três gerações dos testes ELISA e RIBA. Tecnicamente, os testes suplementares não são considerados confirmatórios, uma vez que contêm os mesmos antígenos presentes nos testes ELISA (Brandao *et al.* 2001; Gretch 1997).

Quadro 1. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos utilizados nos testes de detecção sorológica de anticorpos anti-HCV

Antígeno (região do genoma)	ELISA I	RIBA I	ELISA II	RIBA II	ELISA III	RIBA III
5-1-1 (NS4)		x		x		
c100-3 (NS3/NS4)	x	x	x	x		x
c33-c (NS3)			x	x		x
c200 (fusão c100-3/c33-c)			x		x	
c22-3 (core)			x	x	x	x
NS5					x	x

(Modificado de Brandão *et al* 2001)

A detecção de anticorpos anti-HCV no plasma ou soro é baseada no uso da terceira geração de EIA ou ELISA para detectar misturas de anticorpos dirigidos contra diferentes epítopos de proteínas do HCV. A especificidade da terceira geração dos testes sorológicos para anti-HCV é maior do que 99%. Sua sensibilidade é mais difícil de determinar dada à ausência de um método padrão-ouro, mas é excelente em pacientes imunocompetentes. Esses testes podem ser totalmente automatizados e estão bem adaptados para testagem de grande número de amostras. Antígenos recombinantes são usados para capturar anticorpos anti-HCV nos poços de placas de microtitulação, microesferas ou detentores específicos adaptados para dispositivos automatizados, como os de micropartículas. A presença de anticorpos anti-HCV é revelada por antianticorpos marcados com uma enzima que catalisa a transformação de um substrato em um composto colorido ou fluorescente. A densidade óptica (do) da reação é proporcional à quantidade de anticorpos no soro ou plasma. Testes “immunoblot”, como RIBA, tornaram-se de uso mais restrito devido ao bom desempenho da terceira geração de anti-HCV por EIA ou ELISA (Chevaliez & Pawlotsky 2006; Colin *et al.* 2001; Pawlotsky 2002).

Com o desenvolvimento da tecnologia de automação, vários testes surgiram baseados nos mesmos princípios e antígenos utilizados por EIA de terceira geração. Entre os vários testes sorológicos por automação mais utilizados encontramos os de quimioluminescência (“Chemiluminescence Immunoassay” - CLIA), EIA por micropartículas (MEIA) e quimioluminescência por micropartículas (CMIA). Os testes de quimioluminescência baseiam-se na emissão de luz por reação química utilizando ésteres de acridina ligados a anticorpos específicos. A introdução de micropartículas à técnica tem por função aumentar a superfície de aderência dos anticorpos. A técnica sorológica MEIA HCV 3.0v AxSym da Abbott (Abbott Laboratories, CA, EUA) para detecção dos anticorpos anti-HCV é realizada no equipamento AxSym System do mesmo fabricante. Por esta metodologia, as amostras são incubadas com

micropartículas revestidas com antígenos específicos às regiões virais, levando à formação de complexos antígenos-anticorpos. A reação é transferida para uma matriz de fibra de vidro e, após lavagem para retirada do material não ligado, é adicionado um conjugado de fosfatase alcalina com anticorpos de cabra anti-IgG humano. Os anticorpos anti-IgG humano se ligam ao complexo antígeno-anticorpo fortemente aderido na matriz de fibra de vidro. Após nova lavagem, um substrato formado por 4-metilumbeliferil-fosfato é adicionado que, por catalisação da fosfatase alcalina presente no conjugado, é convertido em um composto fluorescente, a 4-metilumbeliferona. Este composto é medido pelo sistema ótico do equipamento e a presença ou ausência de anticorpos anti-HCV é determinada por meio da comparação da taxa de formação do produto fluorescente com a taxa de corte (Hennig *et al.* 2000).

Em junho de 2010, a agência reguladora de alimentos e medicamentos dos EUA (“FDA – Food and Drug Administration”), aprovou o primeiro teste rápido, por imunocromatografia, para a detecção de anticorpos anti-HCV. O teste é realizado em sangue venoso e o resultado é liberado em 20 minutos (Schiff 2011).

1.4.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Esforços para compreender o ciclo replicativo do HCV e identificar agentes antivirais eficazes têm sido dificultados pela falta de um sistema eficiente de cultura de células para este vírus. Muitas tentativas para desenvolver um sistema para a infecção e replicação do HCV em cultura de células já foram realizados. No entanto, as eficiências de replicação viral referidos nestes estudos foram modestas, exigindo a detecção por reação molecular como a reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) (Wakita & Kato 2006).

Vários métodos, além da PCR, podem ser utilizados para detectar a presença do RNA do HCV, mas todos se utilizam de sondas ou iniciadores (“primers”), que são estruturas de RNA complementar a regiões do genoma do HCV que se quer identificar, capazes de amplificar uma única sequência genética específica do HCV em milhões de outras (Brandao *et al.* 2001). Suas vantagens incluem a possibilidade do diagnóstico na ausência de anticorpos anti-HCV, perfil este que pode ser encontrado na fase inicial de infecção, em indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos, como os portadores de HIV, hemodialisados e transplantados, e

na confirmação em situações específicas, como em resultados sorológicos indeterminados ou em recém-nascidos de mães infectadas pelo HCV (Germer & Zein 2001). O RNA do HCV deve ser detectado por método molecular sensível (≤ 50 UI/mL). Para o diagnóstico de hepatite C aguda, o teste de RNA do HCV é exigido, pois ele é detectado antes mesmo que os anticorpos anti-HCV possam ser mensurados (Calvaruso & Craxi 2012).

Os ensaios moleculares para a hepatite C podem ser classificados em:

- 1) Teste qualitativo – teste que detecta a presença do genoma do HCV no plasma ou soro;
- 2) Teste quantitativo – teste que avalia a quantidade de RNA do HCV em amostras de plasma ou soro, sendo também chamado “carga viral”; e
- 3) Teste de genotipagem – teste que determina o genótipo do HCV (Gretch 1997).

1.4.2.1 Testes qualitativos de detecção do RNA do HCV

Os ensaios de detecção qualitativa, semi- ou automatizados, baseiam-se no princípio da amplificação do alvo usando a “clássica” RT-PCR, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, com detecção colorimétrica (RT-PCR-ELISA) ou amplificação mediada por transcrição (TMA) (Brandao *et al.* 2001; Pawlotsky 2002).

A utilização da técnica RT-PCR para detecção do HCV se iniciou na década de 90 e apresenta boa sensibilidade e especificidade (Garson *et al.* 1990; Zaaijer *et al.* 1993). A PCR se inicia com a extração do RNA do HCV, seguida da síntese de DNA de cadeia dupla complementar (cDNA) por ação da enzima transcriptase reversa, que atua como catalizadora desse processo denominado transcrição reversa. O cDNA formado é transformado, por uma reação cíclica enzimática, em um grande número de cópias detectáveis da sequência-alvo do genoma do HCV (Chevaliez & Pawlotsky 2006; Pawlotsky 2002) (Figura 5).

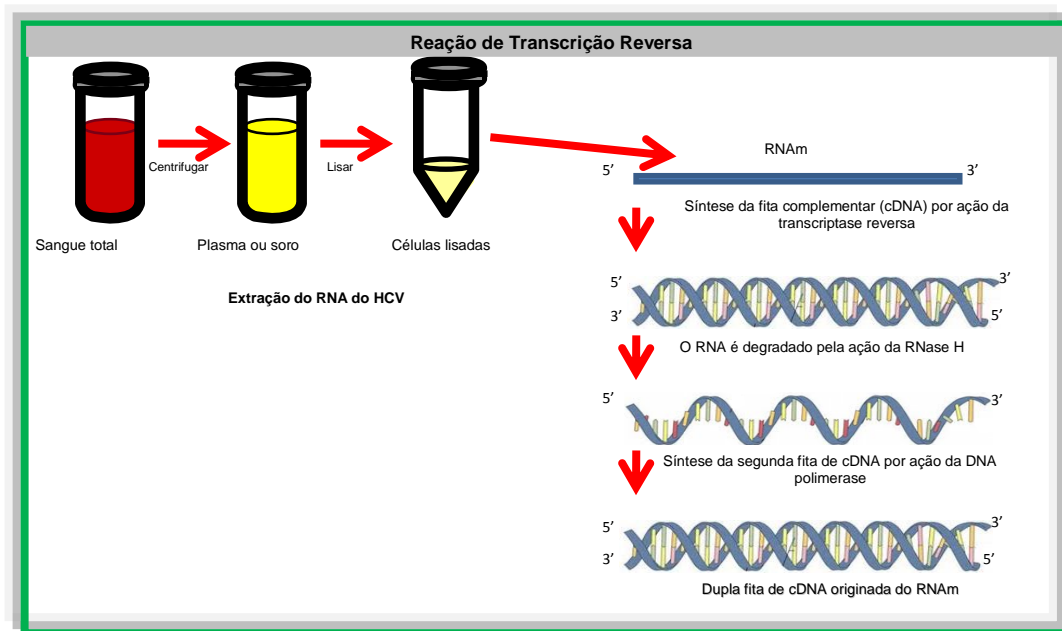


Figura 5. Esquema da reação de síntese de cDNA após ação da transcriptase reversa. Fonte adaptada: (Alberts *et al.* 2008).

A reação de RT-PCR ocorre em duas etapas: (1) a transcrição reversa e (2) a amplificação do cDNA propriamente dita. Seu principal diferencial é que o estudo direto do RNA é inviável, devido à instabilidade molecular dos ácidos ribonucleicos. Usualmente, para catalisar a reação são utilizadas enzimas da classe das transcriptases extraídas de vírus: *Avian Myeloblastosis Vírus - AMV* e *Moloney Murine Leukemia Vírus - MMLV*. Também pode ser utilizada a enzima extraída da bactéria *Thermus thermophilus - Tth*, que em presença de íons Mn^{2+} age como transcriptase reversa. Além disso, são utilizados iniciadores, inespecíficos e nunca aos pares. Esses iniciadores são oligonucleotídeos compostos de uma cauda *poli-T*, formada por várias timinas consecutivas (6 a 35), que se ligam às regiões *poli-A* do RNA, ricas em adeninas (*A-Rich*). Após este ciclo, obtém-se o cDNA que será utilizado na PCR. É importante ressaltar que a etapa de transcrição reversa não altera o número de fitas de RNA ou DNA (Alberts *et al.* 2008). A RT-PCR combina a síntese de cDNA, a partir de modelos de RNA, com a PCR para fornecer um método rápido e sensível para a análise da detecção genômica do HCV. A RT-PCR é utilizada para detectar ou quantificar mRNA, muitas vezes a partir de uma pequena concentração de RNA-alvo (Santos *et al.* 2004).

A RT-PCR-ELISA baseia-se em cinco processos principais: extração do RNA viral de amostras biológicas; transcrição reversa do RNA-alvo para produzir cDNA; amplificação por PCR do cDNA-alvo, utilizando-se iniciadores complementares específicos para o HCV; hibridização dos produtos amplificados

com sondas oligonucleotídicas específicas para os alvos; e detecção colorimétrica dos produtos amplificados e hibridizados à sonda. Um dos testes comerciais cujo princípio é a RT-PCR-ELISA é o teste COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). Ao se combinar a sensibilidade da PCR com a simplicidade de detecção do ELISA e a especificidade de sondas de DNA, é possível obter de forma simultânea e rápida, a transcrição reversa seguida de amplificação do RNA-alvo do HCV e do RNA de um controle interno do HCV disponível no ensaio. O reagente da mistura principal contém um par de iniciadores específicos para o RNA do HCV e outro para o RNA do controle interno do HCV. A detecção de DNA amplificado é efetuada por meio do uso de sondas oligonucleotídicas específicas, que permitem a identificação independente do produto amplificado do HCV e do controle interno do HCV (Lee *et al.* 2000; Richter 2002; Wang *et al.* 2007).

Na amplificação mediada por transcrição (TMA) (Figura 6), todas as fases do teste, incluindo a preparação da amostra, amplificação e detecção do alvo, ocorrem em um único tubo. A reação é isotérmica e utiliza duas enzimas – uma transcriptase reversa, a *MMLV*, e uma T7 RNA polimerase – e dois iniciadores. Os produtos amplificados ou amplicons consistem em moléculas de RNA fita simples. A técnica envolve a hibridização do RNA viral com sondas de oligonucleotídeos de captura complementar à região 5'NC (Pawlotsky 2002; Scott & Gretch 2007). Estes alvos são capturados por partículas magnéticas e os iniciadores da reação se ligam ao RNA-alvo que será transcrito pela *MMLV*. O RNA é degradado pela atividade de RNase H da transcriptase reversa e um segundo iniciador se hibridiza à fita de DNA que será replicada pela função DNA polimerase da *MMLV*. Este DNA de fita dupla inclui a região promotora para T7 que estava ligada ao primeiro iniciador. A T7 RNA polimerase se liga à região promotora e transcreve o DNA de forma a produzir 100 a 1000 cópias do RNA. Estas cópias são RNA de polaridade negativa e todo o processo se repetirá para a formação de fitas de RNA de polaridade positiva que são complementares às sondas. Estas sondas são marcadas com duas moléculas de ésteres de acridina que apresentam propriedade quimioluminescente. Em seguida, o luminômetro mede os sinais específicos para o HCV e para os controles internos de cada amostra em Unidades Relativas de Luz (RLU) e os resultados são registrados por um programa específico. Cada resultado de teste será considerado válido se o resultado do controle interno (CI) for reagente para essa amostra (Arnold *et al.* 1989; Bastos *et al.* 2012; Morishima *et al.* 2008; Nelson *et al.* 1996).

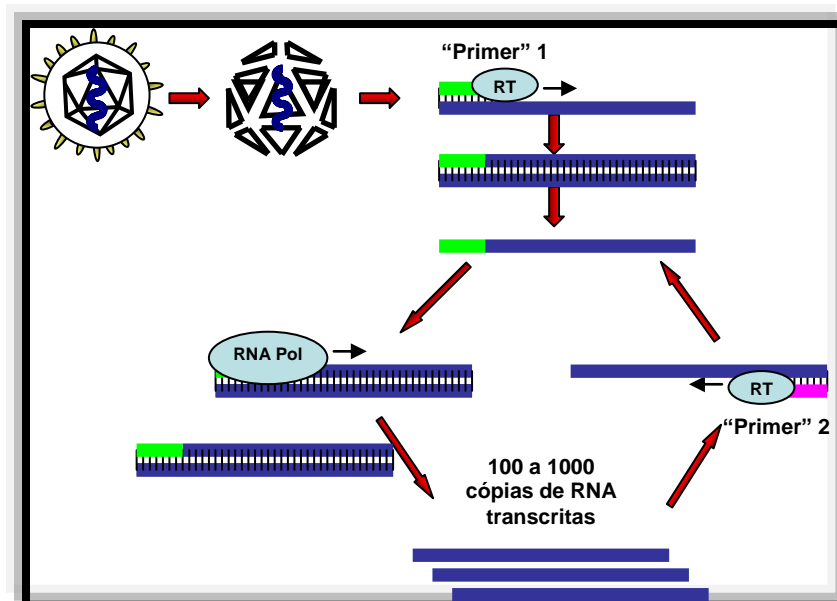


Figura 6. Representação esquemática da reação de amplificação mediada por transcrição (TMA). Adaptado de (Chevaliez & Pawlotsky 2006; Kacian & Fultz 1995).

Um dos testes comercializados no Brasil e que utiliza a tecnologia TMA é o VERSANT[®] HCV RNA Qualitative Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA), o mais sensível hoje no mercado brasileiro, com um limite inferior de detecção aproximado de 5 a 10 UI/mL de RNA do HCV (Morishima *et al.* 2008; Pawlotsky 2002) e, por este motivo, tem sido utilizado na identificação de infecção pelo HCV, principalmente em pacientes que apresentam viremia intermitente, como os hemodialisados, coinfectados e em tratamento antiviral (Bastos *et al.* 2012). Há alguns anos a Siemens melhorou o desempenho de seu teste de TMA, o que contribuiu para baixar ainda mais o limite inferior de detecção para 5,3 UI/mL (SIEMENS 2012).

1.4.2.2 Testes quantitativos de detecção do RNA do HCV

As recomendações atuais para o manejo do tratamento da infecção crônica pelo HCV são baseadas na determinação de RNA do HCV antes, durante e após a terapia antiviral (NIH 2002). Ensaio quantitativos de RNA do HCV permitem tanto a detecção quanto a quantificação dos níveis de carga viral, que tem valor não só para o monitoramento como também para o prognóstico, em termos de resultados do tratamento (Sherman *et al.* 2002).

Os testes quantitativos devem apresentar elevada sensibilidade para determinação da carga viral antes e durante o tratamento antiviral (Strauss 2001).

Atualmente, a quantificação do RNA do HCV é realizada por uma das seguintes técnicas de amplificação do alvo: RT-PCR-ELISA, RT-PCR em tempo real; ou pela técnica de amplificação do sinal: DNA ramificado (branched DNA ou bDNA). A perspectiva mais promissora são os ensaios totalmente automatizados de PCR em tempo real, que são mais rápidos, mais sensíveis e não são propensos à contaminação (Chevaliez & Pawlotsky 2006).

A metodologia da RT-PCR para quantificação do HCV no soro vem sendo empregada há longa data, com bons resultados, em muitos laboratórios de diagnóstico (Zeuzem *et al.* 1994). Entretanto, o declínio da carga viral do HCV avaliada durante a terapia antiviral pode dar resultados diferentes, independentemente da expressão dos resultados em UI/mL. Resultados falso-positivos e falso-negativos, bem como variações no nível de RNA do HCV de até 2 log, têm sido observados em alguns estudos, o que pode provocar um impacto no tratamento de pacientes, particularmente se as decisões de tratamento são feitas usando uma única determinação de RNA do HCV para avaliação (Zeuzem *et al.* 2009).

O teste COBAS[®] AMPLICOR HCV MONITOR v2.0 (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), utilizado para quantificação do RNA do HCV, apresenta o mesmo princípio do teste qualitativo COBAS[®] AMPLICOR HCV v2.0, porém, no primeiro ocorre a detecção simultânea do RNA-alvo e do RNA do padrão de quantificação em cada amostra. Deste modo, a quantificação do RNA do HCV é efetuada comparando-se o sinal do RNA-alvo do HCV com o sinal do padrão de quantificação do HCV em cada amostra. O padrão de quantificação é um transcrito de RNA não-infeccioso com locais de ligação do iniciador idênticos aos do RNA-alvo do HCV e uma região específica de ligação da sonda que permite que o amplicon do padrão de quantificação se diferencie do amplicon de quantificação do HCV. O padrão de quantificação é incorporado em um número de cópias conhecidas em cada amostra e processado em conjunto com o RNA-alvo do HCV em todas as etapas do ensaio (Sherman *et al.* 2002).

Outro teste de quantificação do RNA do HCV, comercializado pela Siemens, o Versant[®] HCV RNA 3.0 Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA), é baseado na técnica de bDNA, semi-automatizada, que se fundamenta na hibridização específica dos oligonucleotídeos sintéticos das regiões 5'NC e core (C)

do genoma do HCV, imobilizados na superfície da microplaca. Moléculas sintéticas de bDNA amplificadas, marcadas com uma sonda de fosfatase alcalina, são hibridizadas ao complexo imobilizado. O complexo é incubado com um substrato (dioxetano) quimioluminescente e a emissão de luz, gerada na reação, é medida pelo equipamento. A técnica semi-automatizada tem sua fase inicial, de preparação de reagentes e amostras, realizada de forma manual e a continuidade da reação até a leitura ocorre no interior do equipamento Siemens Versant® modelos 340 ou 440. A intensidade do sinal é proporcional à quantidade de ácido nucleico-alvo, a qual é determinada por comparação a uma curva-padrão. A faixa de detecção do ensaio é de 615 a 7.700.000 UI/mL (Sherman *et al.* 2002; Smith *et al.* 1996).

A Figura 7 esquematiza a detecção quantitativa do RNA do HCV pela técnica bDNA.

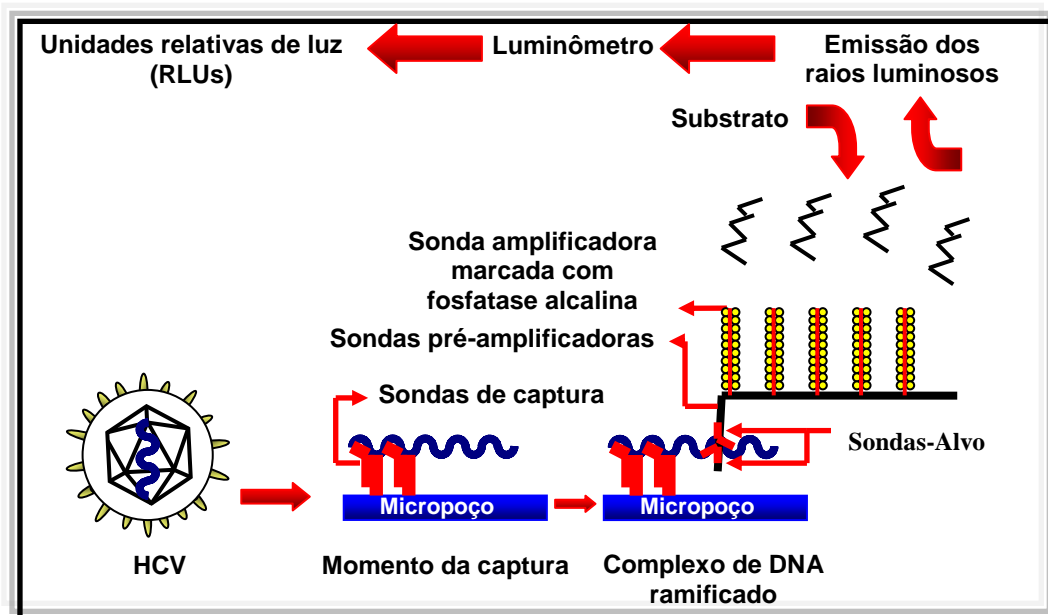


Figura 7. Representação da reação de quantificação do RNA do HCV pela técnica de DNA ramificado. Fonte adaptada de (Benner & Sismour 2005; CDC 2011).

Alguns avanços no desenvolvimento das técnicas realizadas na década de 90, utilizados conjuntamente, trouxeram possibilidades consideráveis ao método tradicional de PCR:

- 1) O emprego da atividade 5' - 3' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase para gerar um sinal específico detectável concomitante à reação de PCR (Holland *et al.* 1991);
- 2) Um sistema de detecção de sinal fluorescente simultâneo à realização da reação de PCR (Higuchi *et al.* 1992);

- 3) O uso de sonda ligada covalentemente a um fluoróforo na reação de PCR (Lee 1993).

Os avanços adquiridos no decorrer dos anos possibilitaram a criação da técnica de PCR em tempo real (qPCR – “Real Time” PCR), capaz de permitir a detecção do produto de PCR na medida em que ele vai sendo formado e não somente ao final da reação. Dessa forma, acrescentou-se ao extremamente sensível método da PCR, maior praticidade, menor tempo para obtenção do resultado e diminuição da possibilidade de contaminação cruzada (Heid *et al.* 1996; Livak *et al.* 1995). A qPCR é uma técnica altamente sensível e reprodutível, porque determina o nível de amplificação durante a fase exponencial da reação, evitando qualquer variação mínima na eficiência de amplificação que possa produzir dramáticas diferenças na quantificação do produto final, tornando o resultado extremamente confiável. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de “Cycle Threshold (C_T)”. Este ponto permite a quantificação exata baseada na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto amplificado de PCR. Esta técnica permite a análise rápida de amostras em larga escala como, por exemplo, no diagnóstico de indivíduos com hepatite C crônica (Cikos & Koppel 2009; Watzinger *et al.* 2006).

Os ensaios disponíveis para RNA do HCV em tempo real são padronizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com base em painéis do genótipo 1 do HCV e pouco se sabe sobre a variação entre os ensaios, com diferentes genótipos do HCV, apesar da padronização em UI/mL (Sarrazin *et al.* 2006).

No quadro 2 podemos observar as características e diferenças dos testes moleculares comercialmente utilizados para detecção e quantificação do RNA do HCV.

Quadro 2. Características dos ensaios moleculares de RNA do HCV

Nome comercial (Fabricante)	Método	Princípio	Limite inferior de detecção em UI/mL	Faixa de detecção em UI/mL
Cobas® Amplicor® HCV v2.0 (Roche)	RT-PCR Semiautomático	Amplificação do alvo	50	N/A
Versant® HCV RNA Qualitative (Siemens)	TMA Manual	Amplificação do alvo	5 - 10	N/A
Cobas® Amplicor HCV Monitor v2.0 (Roche)	RT-PCR Semiautomático	Amplificação do alvo	600	600 – 500.000
Versant® HCV RNA 3.0 Assay (Siemens)	bDNA Semiautomático	Amplificação do sinal	615	615 – 7.700.000
LCx HCV RNA Quantitative Assay (Abbott)	RT-PCR Semiautomático	Amplificação do alvo	25	25 – 2.630.000
Cobas® TaqMan HCV Test (Roche)	qPCR Semiautomático	Amplificação do alvo	25	25 – 391.000.000
RealTime HCV (Abbott)	qPCR Semiautomático	Amplificação do alvo	12	12 – 100.000.000

[RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa; qPCR: RT-PCR em tempo real; TMA: amplificação mediada por transcrição; bDNA: "DNA ramificado". Fontes adaptadas: (Chevaliez & Pawlotsky 2006; Colucci *et al.* 2007; Scott & Gretch 2007; Zeuzem *et al.* 2009)]

Diferentes variações do princípio de “reporter” e “quencher” são utilizadas pelos diferentes ensaios disponíveis comercialmente. O “reporter” é uma molécula fluorescente, normalmente com um curto comprimento de onda como o de coloração verde, anexada à extremidade 5’ da sonda. O “quencher” é uma molécula supressora de fluorescência, anexada à extremidade 3’ da sonda, com comprimento de onda longo como o vermelho que, próxima à molécula “reporter”, inibe a emissão do sinal fluorescente. A fluorescência ocorre pela ação da 5’-3’ exonuclease da enzima Taq polimerase que, durante a extensão e adição de nucleotídeos para formação da sequência complementar, acarreta o distanciamento das moléculas “reporter” e “quencher”, liberando a fluorescência (Johansson 2006). O sinal de fluorescência, medido a cada rodada de amplificação, é proporcional à quantidade de RNA na amostra inicial. A quantificação em números absolutos é conseguida por meio da comparação da cinética da amplificação-alvo com a cinética de amplificação de um controle interno com uma concentração inicial definida (Chevaliez *et al.* 2007; Vermehren *et al.* 2008).

As técnicas de PCR em tempo real para determinação do RNA do HCV mais eficazes e quase completamente automatizadas foram introduzidas pela Roche Molecular Systems (EUA) e Abbott Molecular Laboratories (EUA). As principais diferenças entre elas, segundo Lange & Sarrazin (2010) são as seguintes:

- a) O Cobas TaqMan HCV Test (Roche Diagnostics) usa “reporter” e “quencher” específicos para a região 5'NC do genoma do HCV e para o modelo do controle interno, um RNA sintético, que se liga aos mesmos iniciadores do RNA do HCV. A transcrição reversa e amplificação de cDNA são executadas por uma DNA Z05 polimerase, que é uma polimerase com atividade 5' – 3' exonuclease. A extração pode ser manual, utilizando o conjunto de reagentes “High Pure System kit” (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), que é baseado na extração com colunas de fibra de vidro, ou o sistema automatizado Cobas AmpliPrep TaqMan (CAP / CTM) que realiza a extração utilizando partículas magnéticas. Realizados em conjunto, a execução das amostras com o ensaio Cobas TaqMan CAP / CTM, mostra-se qualitativamente sensível e quantitativamente linear, com excelente desempenho para detecção do RNA do HCV, com exceção do genótipo 4 do HCV (Colucci *et al.* 2007; Vermehren *et al.* 2008);
- b) Abbott Real Time HCV Test (Abbott Molecular Laboratories, EUA) também utiliza “reporter” e “quencher” específicos para a região 5'NC do genoma do HCV. Entretanto, a concentração de RNA do HCV é quantificada por comparação com as curvas de amplificação de um cDNA, a partir da piruvato hidroxil-redutase, que é utilizado como um padrão interno. Este padrão interno é amplificado com iniciadores diferentes dos utilizados para o RNA do HCV e pode ser essa a razão para a quantificação linear de concentrações muito baixas, independentemente do genótipo (Sabato *et al.* 2007; Vermehren *et al.* 2008).

1.4.2.3 Genotipagem do HCV

A genotipagem deve ser realizada uma vez que a infecção pelo HCV é confirmada: é útil para o manejo do tratamento e é recomendada em todos os pacientes com infecção pelo HCV antes do tratamento com interferon (IFN) (Schiff 2011).

São vários os métodos para genotipagem utilizados:

- a) Sequenciamento nucleotídico de certas regiões do genoma do HCV (E1, NS5B, core, 5'NC), seguido por análise filogenética, é o padrão-ouro para genotipagem (Forns & Costa 2006; Zein 2000);

b) RT-PCR utilizando iniciadores genótipo-específicos, em geral, para a região core do genoma do HCV (Okamoto *et al.* 1992; Widell *et al.* 1994);

c) Hibridização reversa com sondas de oligonucleotídeos ligadas à membrana de nitrocelulose e específicas para a região 5'NC, capaz de identificar os principais genótipos do HCV (“Line probe assay” ou LIPA). Entretanto, mesmo tendo boa sensibilidade, os métodos que utilizam a região 5'NC de 5% a 10% dos casos não conseguem distinguir o subtipo 1a de 1b, nem tampouco o subtipo 2a de 2c (Maertens & Stuyver 1997; Smith *et al.* 1995);

d) Sorotipagem é um método baseado em ensaios imunoenzimáticos que visam à detecção de anticorpos séricos genótipo-específicos contra epítomos do core ou NS4 (De Cock & Vranckx 2003; Mondelli *et al.* 1994);

e) Análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (“Restriction fragment length polymorphism” ou RFLP). A técnica RT-PCR/RFLP é bastante empregada em estudos epidemiológicos e baseia-se na digestão dos produtos amplificados do HCV por enzimas de restrição, que são separados de acordo com seus tamanhos em eletroforese em gel (Nakao *et al.* 1991).

1.5 TRATAMENTO

A imunoprofilaxia passiva contra o HCV utilizando imunoglobulina contendo níveis detectáveis de anticorpos anti-HCV ainda não foi convincentemente documentada e a imunoprofilaxia ativa é uma meta ainda para o futuro. A dificuldade está exatamente na diversidade genética do HCV. A falta de modelos *in vitro* e *in vivo* adequados para a análise da infecção pelo HCV tem dificultado a elucidação do ciclo replicativo do HCV e o desenvolvimento de estratégias, tanto profiláticas como terapêuticas (Aly *et al.* 2012).

Os avanços atuais nos estudos, tanto os que se relacionam ao ciclo replicativo do HCV como aqueles que buscam alternativas terapêuticas, só foi possível com o isolamento de células infecciosas clonadas a partir do soro de um paciente japonês com hepatite fulminante pelo genótipo 2a do HCV, denominadas JFH1 (hepatite fulminante japonesa) (Kato *et al.* 2003). Recentemente, foram clonadas células JFH1 a partir de soros com outros genótipos (Jensen *et al.* 2008; Scheel *et al.* 2008). Esses clones foram semeados em cultura celular da linhagem Huh7 do hepatoma humano extraídos de chimpanzés. Mesmo assim, este sistema

possui várias limitações, principalmente a baixa titulação viral e consequente baixa infecção celular (Buhler & Bartenschlager 2012; Jo *et al.* 2011; Ploss *et al.* 2010; Podevin *et al.* 2010; Wakita *et al.* 2005; Woerz *et al.* 2009).

O tratamento atual com IFN na fase inicial da infecção pelo HCV ou 2 a 4 meses após a exposição, propicia a eliminação do vírus em cerca de 80% de casos (Santantonio *et al.* 2008; WHO 2012).

O padrão atual de tratamento para pacientes com doença crônica pelo HCV consiste na terapia combinada de injeções subcutâneas de interferon peguado alfa-2a ou 2b (PEG-IFN α) mais ribavirina (RBV) por via oral. Apesar de cada agente acarretar riscos de efeitos secundários graves, os riscos são ainda maiores com a terapia combinada, onde neutropenia e anemia são particularmente preocupantes (Schiff 2011).

Esta terapia combinada é bastante eficaz em pacientes infectados com genótipos 2 ou 3, levando a resposta virológica sustentada – RVS (definida como a ausência de RNA do HCV detectável no soro ou plasma 24 semanas após o término do tratamento antiviral) em cerca de 65% a 82% dos pacientes. No entanto, em pacientes infectados com os genótipos 1 ou 4, apenas 40% a 54% dos indivíduos tratados alcançam RVS. A carga viral do RNA do HCV no início da terapia é fator determinante em pacientes com infecção pelo genótipo 1. Outros preditores importantes para a obtenção da RVS, segundo o último consenso da “European Association of the Study of the Liver – EASL”, são o estágio de fibrose hepática e a presença de polimorfismos genéticos no cromossomo 19 (IL28B), principalmente naqueles infectados pelo genótipo 1, este último bastante estudado nos últimos anos (Cavalcante *et al.* 2012; Pineda *et al.* 2010; Renda *et al.* 2011). Segundo o mesmo consenso, a determinação da carga viral deve ser realizada nas semanas 4, 12 e 24 do tratamento antiviral para ajudar no manejo do tratamento (Calvaruso & Craxi 2012; Cavalcante *et al.* 2012; Ghany *et al.* 2011; Pineda *et al.* 2010; Rong & Perelson 2010).

Duas drogas inibidoras da protease NS3/4A, o telaprevir e o boceprevir, foram aprovadas recentemente, principalmente no tratamento dos indivíduos infectados pelo genótipo 1, para associação com PEG-IFN α /RBV e vários estudos surgiram mostrando os avanços na terapia com os inibidores de protease (Butt & Kanwal 2012; Jacobson *et al.* 2011; Liapakis & Jacobson 2011; Limalye *et al.* 2011; Pawlotsky 2011; Poordad & Khungar 2011). Além disso, duas outras proteínas virais, RpRd (residente em NS5B) e NS5A, têm sido alvos de drogas promissoras, os

inibidores de polimerase e NS5A, respectivamente, e um grande número de antivirais, tendo como alvo estas e outras proteínas virais, estão sendo testadas em diferentes fases dos ensaios clínicos (Sarrazin *et al.* 2012). Alternativas promissoras também são os inibidores de fatores celulares, que reduzem o risco de desenvolvimento de resistência antiviral e aumentam a chance para a atividade de largo espectro (abrangendo todos os genótipos do HCV), pois agem diretamente nos fatores celulares do hospedeiro usados para replicação viral. Trabalhos desenvolvidos nos últimos anos identificaram como fatores-alvo, entre outros, ciclofilinas, especialmente ciclofilina A (CypA), microRNA-122 (miR-122) e fosfatidilinositol-4-quinase III alfa. Com relação aos inibidores da CypA, estes se mostraram eficazes quando em combinação com a terapia com PEG-IFN/RBV em aumentar a RVS (Buhler & Bartenschlager 2011; Buhler & Bartenschlager 2012; Ghany *et al.* 2011; Raney *et al.* 2010; Rong & Perelson 2010).

Por meio da Portaria do Ministério da Saúde do Brasil, nº 221 de 13 de julho de 2011, foi atualizado o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Em linhas gerais, de acordo com este protocolo, os pacientes infectados pelo HCV em fase inicial, de qualquer genótipo, devem ser tratados com IFN α convencional em associação ou não com RBV por 24 semanas. Na infecção crônica pelo HCV, os portadores de genótipo 2 ou 3 deverão completar 24 semanas de tratamento com IFN α convencional e RBV e os infectados com os genótipos 1, 4 ou 5, 48 a 72 semanas de tratamento com PEG-IFN α e RBV. Em todos os casos, o tratamento só deverá ser completado se for observada a presença de resposta virológica precoce (RVP) na 12^a semana de tratamento, com negatificação ou redução de 2 log (100 vezes) dos níveis de RNA do HCV em relação ao pré-tratamento. Ao término da terapia antiviral deverá ser realizado o teste qualitativo para avaliação da resposta virológica ao final do tratamento (RVFT) e, caso este exame indique resultado não detectado, o exame deverá ser repetido após 24 semanas para avaliação da RVS (Ministério da Saúde 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Desde a sua descoberta em 1989 (Choo *et al.* 1989), ficou demonstrado que o HCV é a principal causa de hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma em todo o mundo (Maheshwari *et al.* 2008). A rotina de diagnóstico virológico desta infecção baseia-se na detecção do RNA do HCV, dos anticorpos contra o HCV e na elevação da alanina aminotransferase (ALT). No entanto, nenhum destes marcadores, isoladamente ou em combinação pode ser usado para identificar a infecção aguda, uma vez que também podem ser detectados durante a fase crônica da infecção pelo HCV. Além disso, distinguir infecção aguda de infecção crônica com base na história clínica, fatores de risco epidemiológico e sintomas, pode ser difícil porque a maioria dos pacientes não apresenta sintomas nesta fase da infecção (Araujo *et al.* 2011). Outro fator importante que dificulta a definição de infecção recente ou passada é o fato de que os anticorpos não conferem imunidade (Kobayashi *et al.* 1993; Wolfe *et al.* 1994).

A detecção do RNA do HCV constitui o método padrão-ouro para diagnóstico e monitoramento terapêutico da infecção pelo HCV, segundo as diretrizes de consenso da Associação Europeia para o Estudo do Fígado (European Association for the Study of Liver, 2011) e Norte-Americana (National Institutes of Health Consensus, 2002) (Calvaruso & Craxi 2012; EASL 2011; Ghany *et al.* 2011; NIH 2002).

Na prática médica, tradicionalmente, são feitas avaliações clínicas com base na presença de sintomas, viremia, níveis anormais de ALT sérica e história prévia de sorologia anti-HCV negativa. Contudo, sinais, sintomas e testes de laboratório apresentam limitações inerentes à prática clínica. Como, geralmente, o tempo médio de soroconversão é de 2 a 3 meses, a maioria dos pacientes já é soropositiva na fase inicial da infecção. A identificação precisa de indivíduos com infecção aguda é importante, pois a terapia antiviral precoce pode levar a uma maior taxa de RVS (Gerlach *et al.* 2003; Grebely *et al.* 2011).

Em contraste, os estudos de infecção aguda pelo HCV demonstraram que muitos pacientes têm baixos níveis de viremia, que pode ser reflexo de qualquer queda viral imediatamente antes da eliminação espontânea, possivelmente pela ação do sistema imunológico (Guobuzaitė *et al.* 2008; McGovern *et al.* 2009).

Os testes qualitativos são utilizados para confirmar viremia, especialmente quando na infecção aguda pelo HCV (Scott & Gretch 2007). Como a maioria das decisões de tratamento são baseadas em níveis indetectáveis de RNA de HCV em pontos de tempo diferentes, o limite inferior de detecção dos ensaios comerciais tornou-se crítico. Desta maneira, a determinação repetida dos níveis de RNA do HCV na fase inicial (durante 24 semanas após o início clínico) parece servir como um bom indicador do desfecho da infecção aguda, podendo ser usado como um critério útil para avaliar o início do tratamento antiviral (Page *et al.* 2009; Pawlotsky 2010).

Deste modo, é fundamental a avaliação das metodologias qualitativas e quantitativas para detecção do RNA do HCV, a fim de se estabelecer as metodologias mais adequadas em diferentes estágios da infecção, tal como antes ou durante o tratamento. Os testes moleculares devem ser capazes de detectar o mínimo possível de UI/mL do RNA do HCV, de forma a apresentar ótimo desempenho quanto ao diagnóstico da infecção (Calvaruso & Craxi 2012; Chevaliez & Pawlotsky 2006; EASL 2011; Pawlotsky 2010).

A portaria em vigor (nº 221 de 18 de julho de 2011), da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil, dispõe sobre o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para hepatite viral C, e considera que os pacientes que apresentarem dois resultados negativos por testes moleculares estão excluídos do tratamento por apresentarem cura espontânea ou resposta virológica sustentada ao tratamento com antivirais (Ministério da Saúde 2011). Na situação em que o paciente apresenta baixa viremia ou viremia intermitente, isto pode levar o clínico a um erro no julgamento da oportunidade do tratamento.

A determinação da técnica mais eficiente em detectar níveis mais baixos do RNA do HCV poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias efetivas voltadas ao diagnóstico precoce, monitoramento, cura espontânea e pós-tratamento da infecção pelo HCV e colaborar para o conhecimento da história natural da infecção em fase inicial.

Além disso, a maioria dos estudos realizados em outros países na fase inicial de infecção pelo HCV foi feita em usuários de drogas ilícitas ou profissionais de saúde com acidentes biológicos. As investigações em indivíduos infectados por outras vias de transmissão são escassas, talvez devido ao fato de que a grande maioria cursa como uma doença assintomática. Um acompanhamento por longo tempo em um número grande de indivíduos com infecção aguda pelo HCV, com

diferentes vias de transmissão, manifestações clínicas e evolução da doença é um recurso extremamente importante para aumentar o nosso conhecimento sobre a história natural da doença e a sua patogenia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os resultados de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico da fase inicial de infecção pelo HCV e sua relação com a evolução para doença crônica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a dinâmica dos valores de anticorpos anti-HCV nos indivíduos durante a fase inicial da infecção pelo HCV.
- Avaliar o desempenho de diferentes técnicas moleculares para detecção do RNA do HCV em indivíduos que apresentaram viremia intermitente durante a fase inicial da infecção pelo HCV;

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo está inserido dentro de um estudo prospectivo que vem sendo desenvolvido no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV), unidade de atendimento ambulatorial integrante do Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais (LAHEP) do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, em conjunto com o Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels (LACEN-RJ), para triagem do diagnóstico precoce de hepatite viral aguda, que inclui, entre seus agentes biológicos, o HCV. Colaboram também neste estudo: Unidade de Doenças Infecciosas da Escola de Medicina de Harvard (Boston, EUA) e Laboratório de Biologia Molecular e Celular para Hepatites Virais da bioMérieux (Lyon, França).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo é parte integrante do projeto: “Fase aguda de infecção pelo vírus da hepatite C: avaliação da resposta imunológica celular e humoral”, financiado pelo “National Institute of Health (NIH)” / EUA sob nº U19 AI066345-01 (CFDA Nº 93.856), desde 2005 com renovação até 2015. Analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (CEP/Fiocruz 0142/2001) (Anexo A) e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 2830), com o consentimento livre informado obtido de todos os participantes (Anexo B).

4.3 AMBULATÓRIO DE HEPATITES VIRAIS – AHV

O Laboratório de Hepatites Virais – LAHEP, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), foi credenciado, em 1986, como laboratório de referência nacional pelo Ministério da Saúde, desempenhando importante papel na assessoria a este Ministério, por meio de várias atividades voltadas às ações relacionadas às diferentes hepatites virais.

O AHV, criado em 1997, é o local de captação dos pacientes e amostras para nossos estudos. Sua atuação está centrada na investigação e esclarecimento dos diferentes quadros e tipos de hepatites virais. Desde sua criação até 2011 foram registrados, pelo menos, 18 mil atendimentos de casos suspeitos de hepatites virais, com aproximadamente 100 casos já caracterizados de hepatite C aguda.

Um dos programas desenvolvidos no AHV é o do diagnóstico precoce das hepatites virais. Por conta destas atividades do AHV, em 2005, o LAHEP passou a condição de centro de cooperação internacional em pesquisa para hepatite C. Atualmente, tem o maior acervo de amostras biológicas coletadas de pacientes com hepatite C aguda, englobando aproximadamente 30 mil amostras armazenadas desde 2001, quando se iniciou o projeto colaborativo. Dessa forma, foi possível encaminhar para tratamento antiviral em um período em que a terapia é mais eficaz.

4.4 PACIENTES E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A amostra de estudo é composta de pacientes com infecção pelo HCV, acompanhados desde a fase inicial da infecção. Estes pacientes eram sintomáticos, apresentando icterícia e/ou colúria (urina escura) e ALT alterada; ou assintomáticos, em sua maioria, doadores de sangue regulares ou indivíduos com exposição acidental recente para HCV por material biológico infectado, com soroconversão para anti-HCV. Para cada grupo foi definido um protocolo de acompanhamento (Lewis-Ximenez *et al.* 2010):

- a) O grupo assintomático é acompanhado clínica e sorologicamente por, no mínimo, 6 meses. Além da testagem sorológica para detecção de anti-HCV, são realizados testes de detecção do RNA do HCV e determinação periódica dos níveis séricos de ALT. O retorno à consulta e a coleta sanguínea são previamente agendados, até avaliação final do caso.
- b) Nos sintomáticos, são realizados marcadores sorológicos para hepatites virais A, B e C, leptospirose, aspartato aminotransferase (AST) e ALT. Indivíduos com níveis séricos elevados de ALT, mas sem sorologia positiva (não-A, não-B, não-C e leptospirose), são testados para outros vírus hepatotrópicos, além de realizarem provas de função hepática, avaliação hematológica, tempo de protrombina (TP) e ultrassonografia abdominal, como ferramenta complementar de diagnóstico para possíveis casos avançados de doenças

crônicas do fígado, como hipertensão portal e cirrose. Os marcadores sorológicos das hepatites virais foram repetidos, depois de aproximadamente 30 dias da primeira visita clínica, a fim de se excluir a possibilidade de que estivessem no período de janela imunológica, entre o início da viremia e a soroconversão, pela ocorrência de resultados falso-negativos.

Como o diagnóstico de infecção aguda pelo HCV é bastante difícil, mediante a ausência de um marcador específico, os critérios de inclusão foram definidos da seguinte forma:

Caso confirmado: indivíduos com resultado sorológico negativo para anticorpo anti-HCV, seguido de resultados anti-HCV positivos e RNA do HCV detectado; ou,

Caso provável: indivíduos com resultado positivo no ensaio sorológico para anticorpo anti-HCV, com teste negativo nos últimos 12 meses, níveis séricos detectáveis de RNA do HCV, mesmo que seguido de repetidos resultados não detectáveis, e fator de risco compatível com a transmissão pelo HCV; ou,

Caso suspeito: indivíduos com resultado positivo pelos testes sorológicos para o anti-HCV, fator de risco compatível com a transmissão pelo HCV, elevação dos níveis de ALT, pelo menos 5 vezes acima do normal, e/ou história clínica nos últimos 6 meses, incluindo icterícia, RNA do HCV detectável, pelo menos na primeira amostra coletada, com flutuação viral superior a 1 log e/ou carga viral abaixo de 10^5 UI/mL. O que o diferencia do caso provável é a falta de um teste sorológico negativo nos últimos 12 meses anteriores à primeira visita e a elevação de ALT.

A exposição de alto risco foi definida como: riscos médicos por intervenções cirúrgicas ou procedimentos endoscópicos, com acesso por via intravenosa, ou procedimentos odontológicos, usuários de drogas, tatuagem e piercing.

A data de início da infecção pelo HCV foi estimada como o dia da exposição de alto risco, se disponível, ou na ausência da informação, seis semanas antes do início dos sintomas em pacientes sintomáticos; ou seis semanas antes da soroconversão em pacientes assintomáticos segundo Lewis-Ximenez e colaboradores (2010).

No geral, 85% das amostras de sangue foram obtidas com o agendamento das consultas. As amostras seriadas de soro ou plasma foram centrifugadas e aliquotadas para testes sorológicos e moleculares. Todas as etapas foram realizadas em salas separadas e a separação das amostras foi feita em capela de fluxo laminar para evitar contaminação e utilizados frascos estéreis livres de RNase/DNase, devidamente identificados e armazenados em freezer a -80°C .

Os dados epidemiológicos (sexo, idade, fatores de risco) foram bem documentados e obtidos durante a avaliação médica e o teste sorológico anti-HCV foi estendido para familiares ou parceiros sexuais. Das amostras sanguíneas seriadas e coletadas em cada consulta foi feita avaliação bioquímica, virológica e da resposta imune celular e humoral.

O diagnóstico foi feito por médicos experientes do AHV, após avaliação do quadro clínico e dos dados laboratoriais do paciente. Os pacientes foram acompanhados prospectivamente com visitas agendadas para avaliação clínica e laboratorial, quando foram realizadas coletas de amostras de sangue total:

- a) semanal no primeiro mês;
- b) quinzenal no segundo e terceiro mês;
- c) mensalmente até 12 meses, após o quarto mês;
- d) quatro vezes por ano no segundo e terceiro anos;
- e) três vezes por ano no quarto ano; e,
- f) após o quarto ano, pelo menos uma vez por ano.

Os pacientes que não obtiveram eliminação (“clearance”) do RNA do HCV antes do quarto mês de acompanhamento foram encaminhados para hospital público de referência para terapia antiviral. A eliminação viral espontânea foi definida como níveis indetectáveis de RNA do HCV, por meio de ensaios qualitativos por PCR no soro, nos primeiros seis meses de acompanhamento, após a data estimada de início da infecção e na ausência de tratamento. Para sustentar a classificação de cura espontânea, mais dois testes consecutivos de detecção do RNA do HCV com resultado indetectável foram realizados, devido à frequência de viremia intermitente, observada em alguns pacientes na fase aguda da infecção pelo HCV (Lewis-Ximenez *et al.* 2010).

Nos estudos sorológicos, publicados por Lewis-Ximenez e colaboradores (2010) e Strasak e colaboradores (2011), anexo C, a amostragem selecionada incluiu 65 pacientes, acompanhados no AHV de janeiro de 2001 a dezembro de 2009.

No estudo de desempenho dos testes moleculares, a amostragem incluída para acompanhamento no AHV, de janeiro de 2001 a dezembro de 2011, consistiu de 99 pacientes, sendo que um paciente abandonou o acompanhamento antes de completar seis meses de avaliação (n=98). Como critério de inclusão, os pacientes deveriam apresentar viremia intermitente, definida como a ocorrência de pelo menos um resultado indetectável do RNA do HCV, durante o curso da doença. Foram

excluídos os pacientes que, além de não apresentarem viremia intermitente no curso do acompanhamento, fossem portadores de algum tipo de comorbidade, como por exemplo, coinfeções HIV/HCV, HBV/HCV, entre outras. As amostras biológicas selecionadas (n=244) foram adequadamente preservadas para realização dos testes moleculares. Estas amostras foram analisadas, ao longo dos anos, por metodologias qualitativas ou quantitativas, descritas a seguir, e que variaram, em metodologia e fabricante, dependendo da disponibilidade para aquisição e realização dos testes à época das análises.

Todas as amostras selecionadas para o estudo foram submetidas a uma nova avaliação pela técnica de amplificação mediada por transcrição (TMA) (VERSANT[®] HCV RNA qualitative assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Tanytown, NY, EUA), com limite de detecção de 9,6 UI/mL, que possui sensibilidade maior que as anteriormente testadas, para verificar a relação de concordância entre elas.

4.5 MÉTODOS

Em relação à testagem sorológica para avaliar a dinâmica dos anticorpos anti-HCV foi utilizado o imunoensaio enzimático de micropartículas – MEIA (AxSym HCV 3.0v, Abbott Laboratories, CA, EUA). Os resultados foram obtidos a partir da razão entre a absorbância (do) da amostra e o ponto de corte (co), calculado para cada amostra (Lewis-Ximenez *et al.* 2010; Strasak *et al.* 2011). Os detalhes da metodologia utilizada nos testes sorológicos podem ser verificados nos manuscritos das publicações científicas constantes do anexo C.

Para o estudo molecular, algumas amostras foram testadas por detecção qualitativa, outras por detecção quantitativa e ainda algumas por mais de uma técnica para detecção do RNA do HCV.

A detecção qualitativa do RNA do HCV foi realizada de acordo com a disponibilidade dos testes oferecidos à época (Figura 8): reação em cadeia da polimerase após síntese de cDNA por transcrição reversa (RT-*nested*-PCR, técnica padronizada no LAHEP/IOC/Fiocruz; RT-PCR-ELISA qualitativa (COBAS[®] AMPLICOR v2.0, Roche Diagnostics, França); e TMA, amplificação mediada por transcrição (VERSANT[®] HCV RNA qualitative assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Tanytown, NY, EUA).

A quantificação do RNA do HCV também foi realizada de acordo com a disponibilidade e por um dos métodos seguintes (Figura 8): RT-PCR-ELISA quantitativa (COBAS® AMPLICOR HCV MONITOR test, Roche Diagnostics, França); DNA ramificado (bDNA VERSANT® HCV RNA 3.0 Assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Tanytown, NY, EUA); RT-PCR em Tempo Real “in house” (HCV “in house” bioMérieux, bioMérieux, Boxtel, The Netherlands); RT-PCR em Tempo Real Roche (COBAS® TaqMan HCV test 2.0v, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, EUA); e RT-PCR HCV em Tempo Real Abbott (Real Time HCV Assay, Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, EUA).

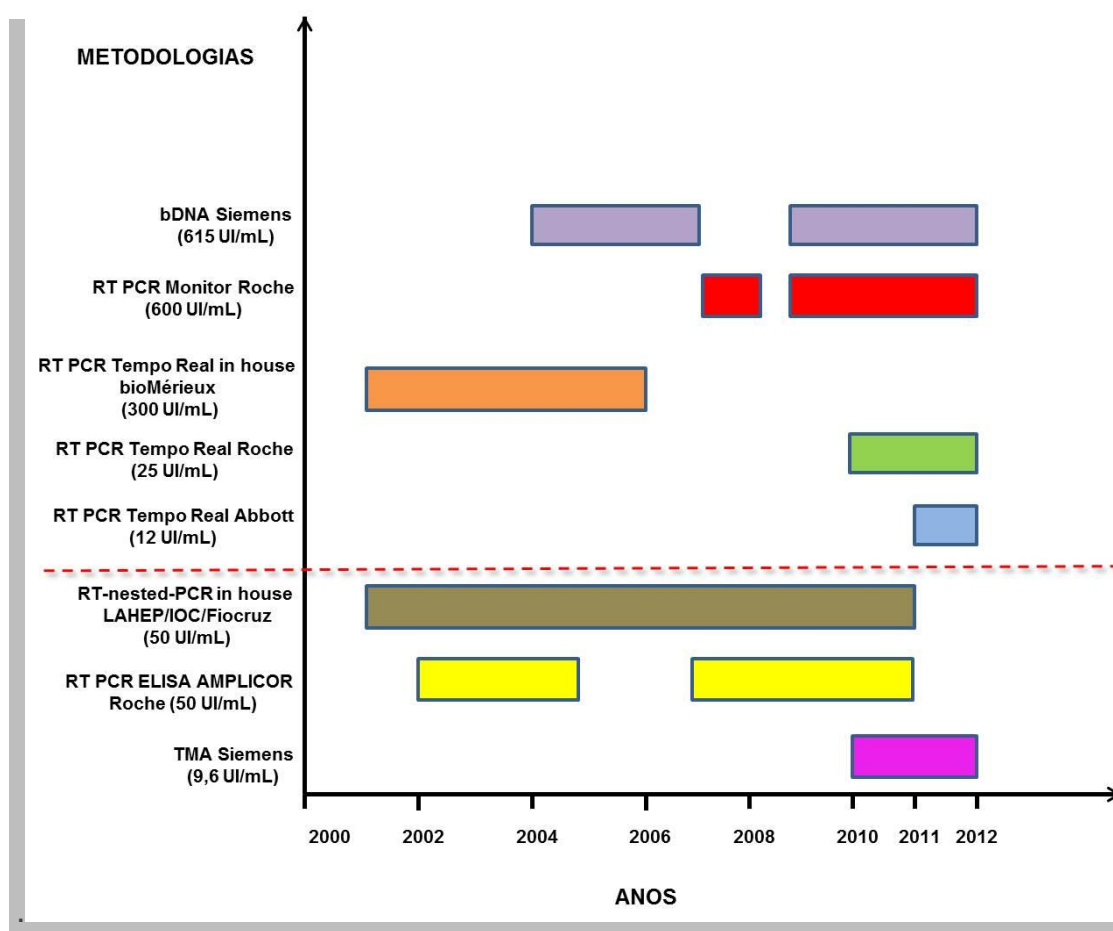


Figura 8. Distribuição temporal da realização dos diversos testes moleculares durante o estudo. Abaixo da linha vermelha tracejada estão relacionados os testes moleculares qualitativos e acima da linha os testes moleculares quantitativos. Entre parênteses os valores mínimos de detecção de cada teste padronizados em UI/mL.

Na figura 9 é apresentado um extrato da planilha de acompanhamento dos pacientes selecionados para o estudo contendo os resultados moleculares obtidos em todas as coletas seriadas realizadas. Alguns desses resultados foram obtidos por metodologias qualitativas e outros por metodologias quantitativas. Nela observamos,

em alguns casos, resultados indetectáveis e detectáveis intermitentes, o que poderia ocasionar avaliação equivocada na evolução do paciente. Foram essas observações que nos levaram a avaliar a eficácia de testes mais sensíveis para a tomada de decisão clínica.

Prontuário	p0	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8	p9	p10	p11	p12	p13	p14	p15	p16	p17	p18	p19	p20	p21	p22	p23	p24	p25	p26	p27	p28	p29	p30
16	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
139	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
182	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
320	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
393	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
475	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
515	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
554	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
764	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
903	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
904	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
920	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
926	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
928	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
941	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
949	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1130	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1245	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1372	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1434	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1437	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1455	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1515	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1524	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1816	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1827	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1872	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2142	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2627	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3163	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3187	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3246	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3283	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3299	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3377	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3496	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3537	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3548	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3599	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3674	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3821	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4205	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4246	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ RNA do HCV detectado
- RNA do HCV não detectado
 NÃO REALIZADO
 TRATAMENTO

Figura 9. Extrato da planilha de resultados moleculares dos pacientes em acompanhamento no AHV/IOC/Fiocruz e selecionados para nosso estudo. Os círculos apresentam alguns exemplos de resultados consistentes com viremia intermitente. Os valores de p correspondem ao número da amostra coletada de cada paciente, mas não mantém relação de tempo entre si.

4.5.1 TESTES MOLECULARES QUALITATIVOS

4.5.1.1 RT-nested-PCR “in house”

Para a realização da RT-nested-PCR foi seguido rigorosamente o protocolo estabelecido no LAHEP para esta técnica. O teste foi realizado no período de 2001 até o ano de 2011. A detecção verificada para o teste é de 50 UI/mL (de Almeida *et al.* 2007), padronizada após 2006, quando foi realizada a mudança dos iniciadores, com vistas a melhoria do desempenho do teste. O RNA viral foi extraído utilizando-se um conjunto de reagentes de extração comercial baseado no princípio de sílica (QIAamp Viral RNA mini Kit, Qiagen Sciences, Maryland, EUA) e os procedimentos foram executados conforme instruções do fabricante. Após a extração, foi realizada a transcrição reversa do RNA em cDNA, utilizando-se um iniciador randômico comercial (Invitrogen, Escócia) e a enzima SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen, CA, EUA). A segunda etapa do teste consiste na amplificação do genoma viral pela reação em cadeia de polimerase (reação de RT-PCR), utilizando-se os oligonucleotídeos específicos 1B e 2A da região conservada 5'NC do RNA do HCV, sendo este último o iniciador da transcrição reversa. A terceira e última etapa da técnica consiste em um segundo ciclo de PCR (nested-PCR), utilizando iniciadores internos K15 e K16, necessária para a visualização do produto da reação de PCR em gel de agarose (Quadro 3).

Foram utilizados nas reações de PCR os seguintes oligonucleotídeos:

Quadro 3. Oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-nested-PCR no LAHEP/IOC/Fiocruz
Fonte: Autorizado por (Martins 2010)

Oligonucleotídeo	Polaridade / sentido 5'- 3'	Posição genoma	Sequência (5'- 3')
1B	Negativa / anti-senso	339 → 322	GGG TGC AGC GTC TAC GAG ACC
2A	Positiva / senso	21 → 33	GGC GAC ACT CCR CCA T
K15	Positiva / senso	32 → 48	ACC ATR RAT CAC TCC CCT GT
K16	Negativa / anti-senso	304 → 288	CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT

4.5.1.2 Amplificação Mediada por Transcrição (TMA)

Para TMA foi utilizado o conjunto de reagentes comerciais VERSANT[®] HCV RNA qualitative assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Tanytown, NY, EUA). Os procedimentos foram seguidos conforme recomendações do fabricante. Os testes foram realizados nas dependências do LACEN/RJ, no período de 2010 a 2011.

Na TMA, a reação é isotérmica e utiliza duas enzimas: transcriptase reversa (*MMLV*) e T7 RNA polimerase. Os produtos amplificados consistem em fita simples de RNA do HCV. A técnica envolve a hibridização do RNA viral com sondas de oligonucleotídeos de captura complementar a região 5'NC. Estes alvos são capturados por partículas magnéticas e os iniciadores da reação se ligam ao RNA-alvo que será transcrito pela transcriptase reversa. O RNA é degradado pela atividade de RNase H da transcriptase reversa e um segundo iniciador se hibridiza à fita de DNA que será replicada pela função DNA polimerase da transcriptase reversa. Este DNA de fita dupla inclui a região promotora para T7 que fazia parte do primeiro iniciador. A T7 RNA polimerase se liga à região promotora e transcreve o DNA em várias cópias do RNA. Estas cópias são RNA de polaridade negativa e todo o processo se repetirá para a formação de fitas de RNA de polaridade positiva que são complementares às sondas. Estas sondas são marcadas com duas moléculas de ésteres de acridina que apresentam propriedade quimioluminescente. Em seguida, um luminômetro mede os sinais específicos para o HCV e para os controles internos de cada amostra em Unidades Relativas de Luz (RLU) e os resultados são registrados por um programa específico. O limite inferior de detecção da técnica de TMA estabelecida pelo fabricante, à época de nosso estudo, era de 9,6 UI/mL (Bastos *et al.* 2012; SIEMENS 2012).

4.5.1.3 RT-PCR-ELISA qualitativa

A RT-PCR-ELISA qualitativa foi realizada com o conjunto de reagentes comerciais COBAS[®] AMPLICOR HCV Test versão 2.0 (Roche Diagnostics, França), sendo seguidas rigorosamente as instruções do fabricante. Para esta técnica o limite inferior de detecção estabelecido pelo fabricante é de 50 UI/mL. O teste foi realizado no LAHEP, pela equipe do laboratório, no período compreendido entre os anos de 2002 a 2005 e de 2007 a 2011.

A técnica une os princípios da RT-PCR para detecção dos produtos amplificados do RNA-alvo do HCV com a determinação enzimático-colorimétrica do tipo ELISA (Lee *et al.* 2000). A PCR ocorre em termociclador por meio de uma série de ciclos de diferentes temperaturas. Primeiramente, a temperatura é elevada (94-95°C) para promover a separação da cadeia dupla de DNA em dois filamentos, sendo este processo conhecido como “desnaturação”. Em seguida, a temperatura é diminuída (em média de 45-65°C) para que ocorra a ligação dos iniciadores às sequências-alvo, sendo denominada “anelamento”. Após a ligação dos iniciadores às sequências complementares de DNA, a temperatura é ajustada para aquela ótima (72°C) ao desempenho da enzima responsável pela replicação da cadeia de DNA, a Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase. O objetivo da PCR não é replicar a cadeia inteira de DNA, mas apenas a sequência de interesse que é determinada pelos iniciadores (Alberts *et al.* 2008).

4.5.2 TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS

4.5.2.1 RT-PCR-ELISA quantitativa

Para esta técnica foi utilizado o conjunto de reagentes comerciais COBAS® AMPLICOR MONITOR HCV Test versão 2.0 (Roche Diagnostics, França) e seguidas todas as orientações determinadas pelo fabricante. A faixa de detecção para este teste é de 600 a 500.000 UI/mL. Foi realizado nas dependências do LAHEP, nos anos de 2007 e 2008 e entre os anos de 2009 e 2011.

A detecção dos produtos amplificados obtidos por PCR é fundamentada na hibridização específica de sondas de oligonucleótidos. Os amplicons-sonda híbridos são revelados em uma reação enzimática, seguido por detecção de um sinal colorido. A quantificação baseia-se na amplificação competitiva do modelo viral com uma quantidade conhecida de padrão sintético (QS) adicionado a cada tubo de reação. O QS é um transcrito de RNA sintético contendo regiões de ligação do iniciador idênticas aos da sequência-alvo do HCV, uma sequência aleatória interna de comprimento semelhante, composição de bases como a sequência-alvo do HCV e uma região sonda com uma única ligação que diferencia o QS do fragmento-alvo amplificado (Gerken *et al.* 2000). As quantidades relativas do amplicon viral e do

padrão são medidas no final do procedimento e os resultados são obtidos a partir de uma curva padrão criada em paralelo (Pawlotsky 2002).

4.5.2.2 DNA ramificado (*branched* DNA – bDNA)

A técnica bDNA é realizada utilizando-se o conjunto de reagentes comerciais RNA HCV VERSANT® 3.0 Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA). Foram realizados todos os procedimentos definidos pelo fabricante na bula do teste. Os testes foram realizados no equipamento Versant 440 System (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA), que automatiza a execução da técnica. A faixa de detecção estabelecida para o teste é de 615 a 7.700.000 UI/mL (Desombere *et al.* 2005). Os testes foram realizados no LACEN/RJ no período compreendido entre os anos de 2004 a 2007 e 2009 a 2011.

Diferentemente das metodologias de PCR, o bDNA não amplifica o alvo, mas sim o sinal emitido por sondas marcadas que são agregadas ao alvo. Ou seja, o genoma viral é hibridizado com um “suporte” usando sondas específicas de oligonucleotídeos de captura. Em seguida, o sinal emitido pelos híbridos é amplificado para detecção e medição, usando moléculas amplificadas de DNA ramificado que servem como sítios para a hibridização com conjugados de fosfatase alcalina e sondas de oligonucleotídeos. A detecção é obtida pela emissão de quimioluminescência a partir de um substrato catalisado pela fosfatase alcalina. A quantificação é calculada com a utilização de uma curva padrão gerada simultaneamente e utilizando padrões conhecidos (Pawlotsky 2002).

4.5.2.3 RT-PCR em tempo real

Algumas amostras foram quantificadas, durante nosso estudo, por técnicas comerciais de RT-PCR em tempo real de origens diferentes e com características próprias:

a) RT-PCR em tempo real – Roche

Nesta técnica foi utilizado o conjunto de reagentes comerciais COBAS® TaqMan HCV test versão 2.0 (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, EUA). É um ensaio em tempo real de amplificação de ácido nucleico para a detecção quantitativa do RNA do HCV no soro ou plasma humano. Este ensaio foi desenvolvido para utilização com o analisador automatizado Cobas TaqMan 48 (CTM 48, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA) e software Amplilink, v 3.0.1 (Roche Diagnostics, Meylan, França). A extração, amplificação e detecção foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A faixa de detecção vai de 25 UI/mL a 390.000.000 UI/mL, utilizando 1 mL de soro (ROCHE 2012). Os testes foram realizados no LAHEP nos anos de 2010 e 2011. A extração das amostras foi realizada de forma manual utilizando o conjunto de reagentes High Pure System (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, EUA). A preparação de amostras é seguida por transcrição reversa, amplificação por RT-PCR (TaqMan), detecção em tempo real de clivados duplamente marcados com corante fluorescente em sondas de oligonucleotídeos, que permitem a detecção e quantificação específica e simultânea da sequência-alvo, bem como de um padrão interno de quantificação do HCV, que são medidos e calculados pelo equipamento CTM 48 (Germer *et al.* 2005).

b) RT-PCR em tempo real – Abbott

O ensaio utilizado para esta técnica foi o teste comercial Real Time HCV Assay (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, EUA), de acordo com as especificações do fabricante e detectado pelo instrumento Abbott m2000rt.

Entretanto, somente uma amostra foi quantificada por esta técnica, motivo pelo qual não pode ser incluída na nossa análise. Trata-se de técnica de menor limite de detecção do RNA do HCV disponível comercialmente, depois do TMA, apresentando uma faixa dinâmica de detecção de 12 a 100 milhões UI/mL (Halfon *et al.* 2006).

c) RT-PCR em tempo real – bioMérieux

Os testes de RT-PCR em tempo real realizados pela bioMérieux foram executados na cidade de Lyon, França, nos laboratórios bioMérieux, no período compreendido entre os anos de 2001 e 2006, utilizando o protocolo “in house” de RT-PCR em tempo real desenvolvido pela pesquisadora Florence Komurian-Pradel e colaboradores (Komurian-Pradel *et al.* 2001). A execução do teste seguiu as indicações do protocolo, com um limite inferior de detecção de aproximadamente 1000 cópias/mL, com 3,31 cópias/mL correspondendo a 1 UI/mL. Assim, após conversão, a detecção do teste passou a ser de aproximadamente 300 UI/mL.

A extração do RNA viral foi realizada com o conjunto de reagentes QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). A técnica utiliza a transcriptase reversa Thermoscript[®] Reverse Transcriptase (GibcoBRL, Life Technologies) na composição do “master mix”. A PCR ocorre com a adição de dois iniciadores, construídos para amplificar um fragmento de 220 pb de uma sequência bem conservada da região 5'NC do RNA do HCV: RC1 (5' – GTCTAGCCATGGCGTTAGTA – 3') e RC21 (5' – CTCCCGGGGCACTCGCAAGC – 3'), como demonstrado na figura 10. A PCR em tempo real foi executada no equipamento LightCycler[®] (Roche Diagnostics) e cada etapa de alongamento foram monitoradas em presença de SYBR Green I (LC DNA Master SYBR Green I, Roche Diagnostics).

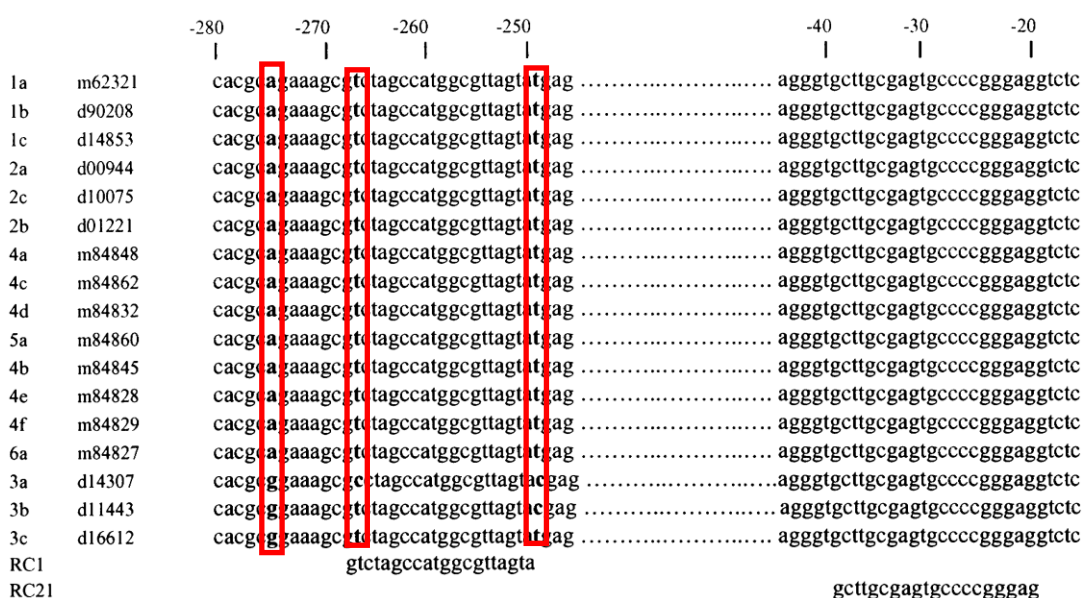


Figura 10. Alinhamento de sequências da região 5'NC do RNA do HCV correspondente às posições dos iniciadores usados na técnica RT-PCR “in house”. As duas colunas da esquerda indicam o genótipo viral e o número de acesso ao Genbank dos isolados de HCV. A sequência dos iniciadores RC1 e RC21 está indicada nas duas últimas linhas. Os nucleotídeos em destaque referem-se a mutações observadas entre os isolados de HCV. Fonte adaptada: (Komurian-Pradel *et al.* 2001).

A determinação quantitativa foi realizada utilizando uma curva padrão. O padrão de RNA foi sintetizado por transcrição *in vitro* a partir de cDNA de HCV modificado contendo uma deleção de 40 pb na região 5'NC e clonado em plasmídeo digerido pela enzima EcoRI (Promega Corp, WI, EUA). A curva padrão foi construída com uma série de 10 diluições do RNA do HCV sintético em soro HCV negativo. Depois que a PCR em tempo real foi concluída, os valores logarítmicos de fluorescência para cada diluição foram traçados contra o número de ciclos (Figura 11A). Uma medição precisa foi obtida ao longo de um grande intervalo de números de cópias. A linearidade foi conservada com as diluições em série do padrão de RNA do HCV sintético, variando de 3,57- 9,57 log de cópias de RNA / mL após correção pelo fator de diluição (Figura 11B).

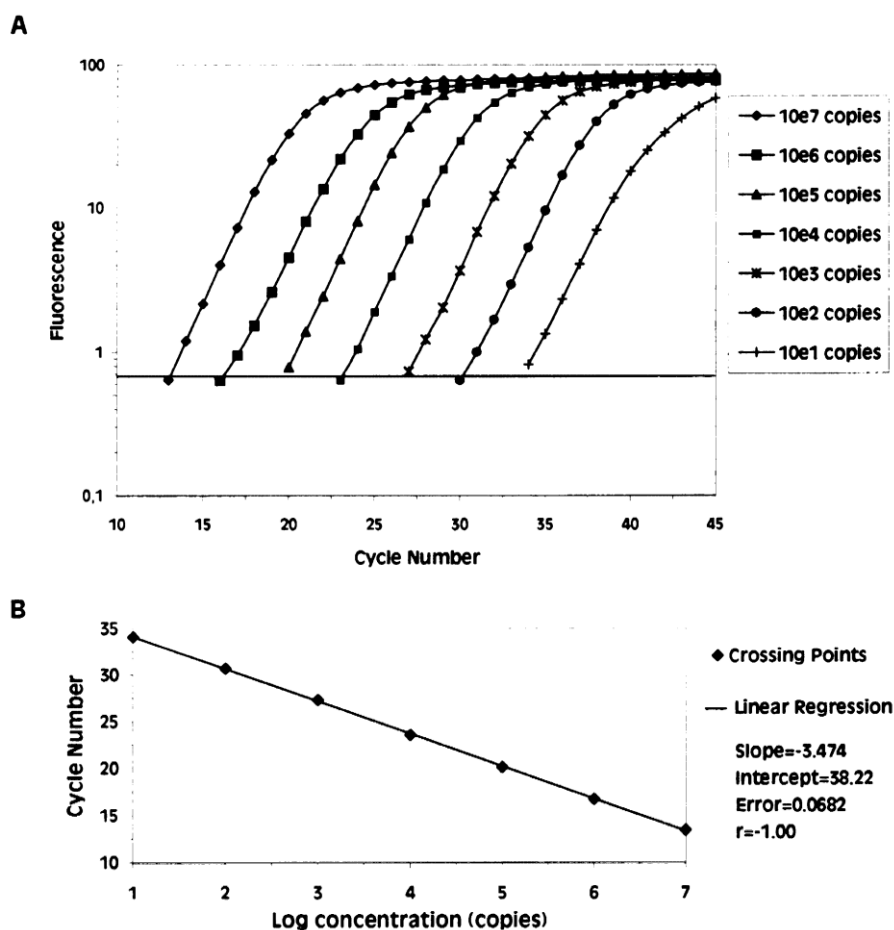


Figura 11. Curva padrão obtida com 10 diluições de RNA do HCV sintético modificado, transcrição reversa e amplificação por PCR em tempo real. **(A)** Gráfico logarítmico de números de fluorescência (eixo y) versus ciclo por diluição (eixo x). A linha horizontal corresponde ao Treshold (CT). **(B)** Pontos de cruzamento (número de ciclos) plotados contra a concentração logarítmica da série de diluições. Fonte: (Komurian-Pradel *et al.* 2001).

4.6 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados demográficos e epidemiológicos, como sexo, idade ou fator de risco, e os resultados obtidos nos testes foram digitados e codificados em uma planilha criada no programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office for Windows). Foi realizada análise estatística descritiva. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATA 6.0 (Stata Corporation, University Drive East College Station, Texas, USA).

O mesmo programa estatístico foi utilizado para avaliação da acurácia dos testes moleculares. Acurácia de um teste é o somatório da proporção dos testes verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos em relação à totalidade dos resultados. É uma medida da relação entre o valor estimado e os valores reais, ou seja, é a habilidade do teste em obter resultados similares a um teste padrão, que em nosso caso foi estabelecido como sendo a metodologia TMA. A acurácia envolve o esforço para diferenciar um teste de outros testes possíveis para chegar ao melhor diagnóstico de determinada doença (de Oliveira *et al.* 2010).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE ESTUDO

Do total de pacientes acompanhados no AHV de 2001 a 2011 ($n=98$), a amostra de pacientes elegíveis para nosso estudo foi composta de 50 indivíduos ($n=50$), por apresentarem pelo menos um episódio de viremia intermitente detectada por meio de testes moleculares qualitativos e/ou quantitativos, durante o período de acompanhamento. Destes, 22 (44%) eram do sexo masculino e 28 (56%) do sexo feminino, com média de idade 43,9 anos \pm 12,1 (20 a 73 anos). Entre os homens, o predomínio se estabeleceu na faixa etária dos 40 aos 49 anos (40,9%), enquanto que entre as mulheres houve predominância da infecção na faixa etária de 30 a 39 anos (42,9%), como observado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Distribuição da amostra estudada de pacientes com infecção aguda pelo HCV segundo sexo e faixa etária ($n=50$)

Faixa etária	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
20 – 29	1 (4,6)	2 (7,1)	3 (6,0)
30 – 39	5 (22,7)	12 (42,9)	17 (34,0)
40 – 49	9 (40,9)	6 (21,4)	15 (30,0)
50 – 59	5 (22,7)	5 (17,9)	10 (20,0)
≥ 60	2 (9,1)	3 (10,7)	5 (10,0)
Total	22 (100)	28 (100)	50 (100)

A análise da variável etnia revelou predomínio da branca (42%) e da parda ou mista (38%), seguidas da negra e outras, como asiática e indígena, que juntas somaram 20%.

Diferentes fatores de risco ou modos de transmissão foram relatados, porém, houve predomínio (58%) da transmissão nosocomial, que engloba os procedimentos cirúrgicos de pequeno ou grande porte, transfusão sanguínea, hemodiálise ou qualquer evento que tenha requerido hospitalização. Verificamos também que o segundo fator de risco mais relatado foi a transmissão sexual (30%), onde estão agrupados não só o sexo desprotegido. Os demais fatores, como acidente biológico,

tatuagem, compartilhamento de instrumentos de manicure, piercing, entre outros, somaram 6% dos relatos. Os que desconheciam ou não se conseguiu determinar o modo de transmissão totalizaram outros 6% da amostra estudada.

O genótipo viral predominante foi o 1 (76%), seguido dos genótipos 2 (12%) e 3 (8%). Foi registrada a ocorrência de um paciente infectado com genótipo 4 (2%). Não foi possível a determinação do genótipo viral em um paciente, tendo em vista a carga viral muito baixa.

Da amostra de estudo molecular ($n=50$), 26 pacientes evoluíram para quadro de infecção crônica (52%), caracterizado pela ausência de eliminação do RNA do HCV após 6 meses. Dos pacientes com infecção crônica, 10 (38,5%) receberam tratamento antiviral ao longo do período de acompanhamento durante a fase aguda. Para os pacientes não tratados ($n=16$), as justificativas foram:

- a) Oito pacientes evoluíram para cura espontânea tardiamente (com mais de 8 meses de acompanhamento);
- b) Dois pacientes, com mais de 70 anos de idade, não tiveram indicação de tratamento;
- c) Seis pacientes, após biópsia hepática, não apresentaram lesão histopatológica em grau para indicação clínica de iniciar tratamento antiviral.

Estes dados demográficos, clínicos e laboratoriais estão apresentados na tabela 2. Na figura 12, visualizamos a amostra de pacientes acompanhados, sua estratificação em pacientes elegíveis (que apresentavam viremia intermitente) e não elegíveis para o estudo e as frequências absolutas e relativas de pacientes com infecção crônica e com cura espontânea desta coorte.

Tabela 2. Características demográficas, clínicas e laboratoriais da amostra do estudo (n=50)

Características	Pacientes (n=50)
Total de pacientes da coorte, 2001-2011	98
Pacientes elegíveis para o estudo ^a	50
Idade em anos, média ± DP	43,9 ± 12,1
Sexo: Masculino	22 (44,0)
Feminino	28 (56,0)
Raça: Branca	21 (42,0)
Negra	8 (16,0)
Parda	19 (38,0)
Outra ^b	2 (4,0)
Fator de risco ou modo de infecção: Nosocomial ^c	29 (58,0)
Sexual	15 (30,0)
Drogas	0
Acidente biológico	1 (2,0)
Outro ^d	2 (4,0)
Desconhecido	3 (6,0)
Genótipo HCV: tipo 1	38 (76,0)
tipo 2	6 (12,0)
tipo 3	4 (8,0)
tipo 4	1 (2,0)
Desconhecido ^e	1 (2,0)
Evolução: Crônicos	26 (52,0)
Cura espontânea	24 (48,0)
Crônicos tratados	10 (38,5)
Crônicos não tratados	16 (61,5)

NOTAS: Os dados são: n° (%) de pacientes, a menos que seja indicado em contrário. DP = Desvio Padrão.

^a Pacientes com viremia intermitente por metodologias moleculares ou resultados moleculares duvidosos

^b Inclui raça asiática e indígena (vermelha).

^c Incluindo pequenas e grandes cirurgias, hospitalização, transfusão sanguínea, hemodiálise.

^d Incluindo manicure, pedicura, tatuagem, piercing.

^e Não foi realizada a genotipagem do HCV

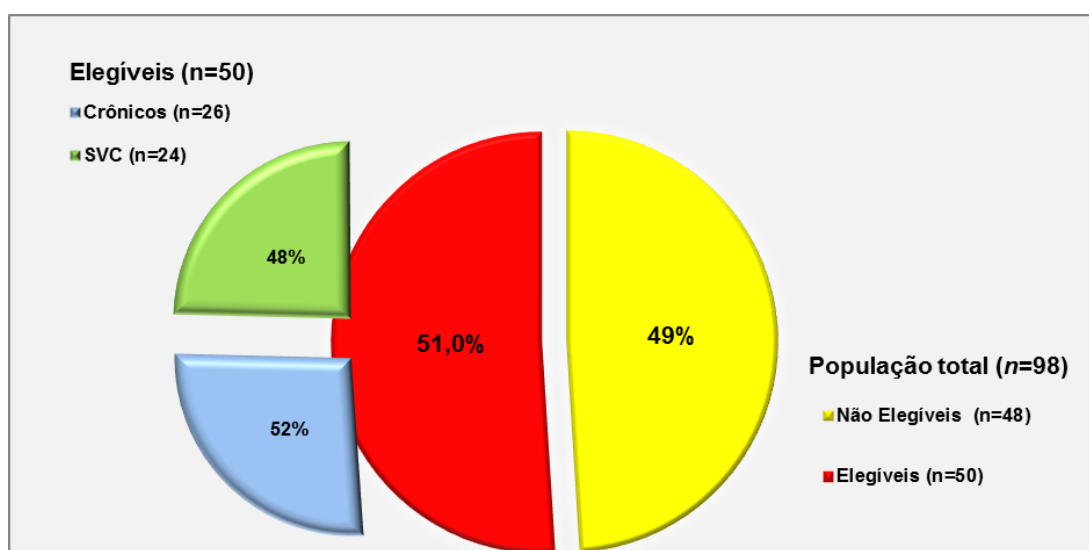


Figura 12. Representação gráfica da amostra de estudo e sua estratificação em elegíveis e não elegíveis. O grupo dos pacientes elegíveis é mostrado com sua subdivisão em crônicos e com cura espontânea. Na legenda é mostrado o tamanho de cada grupo e no gráfico, o seu correspondente percentual.

5.1.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA INFECÇÃO CRÔNICA

Nos pacientes com infecção crônica ($n=26$), a mediana do tempo de acompanhamento foi de 13 meses (1 a 103 meses) e a média da idade foi de 45 anos \pm 12 anos. Houve predominância do sexo feminino (16 / 61,5%). Com relação à etnia observamos que se manteve um perfil idêntico ao da população como um todo, com predomínio dos brancos e pardos (73,1%), seguidos pelos negros (19,23%). Quanto aos fatores de risco relatados pelos pacientes que cronificaram houve predominância da transmissão nosocomial (50%). A transmissão sexual foi a segunda maior causa de transmissão do HCV (34,61%) e os procedimentos envolvendo materiais com risco de contaminação, como objetos de manicure, pedicura, tatuagem e piercing corresponderam a 7,69% dos casos. Com relação ao genótipo viral, observamos predomínio do genótipo 1 (69,2%), seguido do genótipo 2 (23,1%).

5.1.2 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE EVOLUÍRAM COM ELIMINAÇÃO VIRAL

Em relação à análise dos dados dos pacientes que obtiveram eliminação viral espontânea ($n=24$), a mediana do tempo de acompanhamento no AHV foi de 7 meses (1 a 80 meses). A média de idade destes pacientes foi de 42,7 anos \pm 12,2 anos e não houve predominância de sexo, com 12 representantes de cada gênero (50%). Pela análise da variável etnia, houve predomínio de brancos e pardos (87,5%) e três casos constatados da etnia negra (12,5%). O fator de risco mais relatado foi o nosocomial, correspondendo a 66,7% da totalidade dos casos. A transmissão sexual foi a causa provável em seis pacientes (25%) e em dois pacientes estudados (8,3%) não foi possível definir o modo de transmissão. Um total de 83,3% dos pacientes que alcançaram a cura espontânea eram portadores do genótipo 1. Dois pacientes eram portadores do genótipo 3 (8,3%) e um do genótipo 4 (4,2%). Em um paciente (4,2%), que obteve cura espontânea, não foi possível determinar o genótipo, devido à baixa viremia apresentada no curso da doença.

A diferença no percentual de amostras positivas e negativas intermitentes, em ambas as populações, não foi relevante, considerando o tamanho amostral de cada grupo.

Na tabela 3 estão resumidas as características dos dois grupos estudados em relação às variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais.

Tabela 3. Características da amostra de estudo, considerando o perfil dos pacientes crônicos e com cura espontânea, em relação às variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais

Características	Pacientes crônicos (n=26)	Pacientes com cura espontânea (n=24)
Acompanhamento em meses, média ± DP (mediana)	25 ± 25 (13)	13 ± 18 (7)
Idade em anos, média ± DP	45,0 ± 12,0	42,7 ± 12,2
Sexo: Masculino	10 (38,5)	12 (50)
Feminino	16 (61,5)	12 (50)
Raça: Branca	11 (42,3)	10 (41,7)
Preta	5 (19,2)	3 (12,5)
Parda	8 (30,8)	11 (45,8)
Outra	2 (7,7)	0
Fator de risco ou modo de infecção: Nosocomial ^d	13 (50)	16 (66,7)
Sexual	9 (34,6)	6 (25,0)
Drogas	0	0
Ac. biológico	1 (3,9)	0
Outro ^b	2 (7,6)	0
Desconhecido	1 (3,9)	2 (8,3)
Genótipo HCV: tipo 1	18 (69,2)	20 (83,3)
tipo 2	6 (23,1)	0
tipo 3	2 (7,7)	2 (8,3)
tipo 4	0	1 (4,2)
Desconhecido ^c	0	1 (4,2)
Número de amostras selecionadas para o estudo (n=244)	156 (63,9)	88 (36,1)
Amostras intermitentes com resultados positivos	48 (30,8)	27 (30,7)
Amostras intermitentes com resultados negativos	108 (69,2)	61 (69,3)

NOTAS: Os dados são: n^o (%) de pacientes, a menos que seja indicado em contrário. DP = Desvio Padrão.

^a Incluindo pequenas e grandes cirurgias, hospitalização, transfusão sanguínea, hemodiálise.

^b Incluindo manicure, pedicura, tatuagem, piercing.

^c Não foi realizada a genotipagem do HCV.

5.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ESTUDO

Foram selecionadas 244 amostras biológicas que apresentavam viremia intermitente no curso da doença durante o acompanhamento no AHV, sendo que 88/244 (36,1%) amostras foram de pacientes com cura espontânea e 156/244 (63,9%) amostras de pacientes que evoluíram para infecção crônica.

No intervalo da 1^a a 12^a semana foram observadas 42/244 (17,2%) amostras com resultados intermitentes. No intervalo da 13^a a 24^a semana observamos 39/244 (16,0%) amostras. Acima da 24^a semana houve a ocorrência de 163/244 (66,8%) amostras com viremia intermitente. Podemos observar uma frequência elevada destes resultados acima da 24^a semana, tanto no grupo dos pacientes com infecção

crônica, como no de pacientes que evoluíram com cura espontânea, com frequência maior de resultados intermitentes no primeiro grupo.

Na figura 13 estão representadas as frequências com que as amostras apresentaram resultados de viremias intermitentes nas amostras da coorte de estudo.

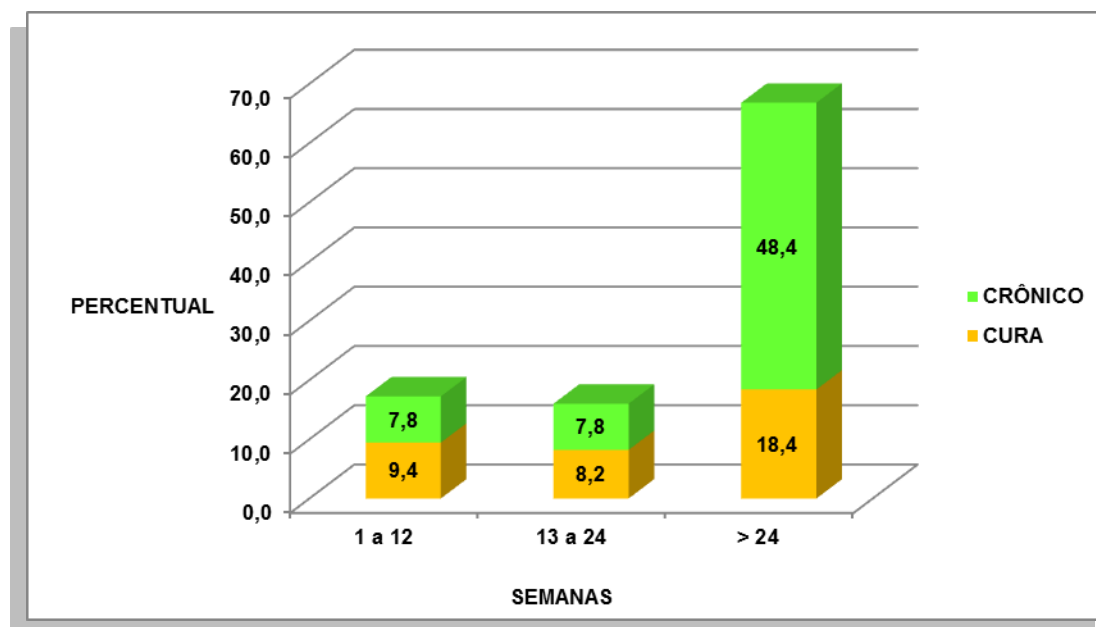


Figura 13. Gráfico da frequência de resultados de viremias intermitentes nas amostras selecionadas de pacientes que evoluíram para infecção crônica e cura espontânea, em relação ao período de acompanhamento.

Em relação à fase de tratamento antiviral, sendo o tratamento exclusivo para os quadros crônicos, as amostras foram selecionadas em diferentes períodos: 92/156 (59,0%) amostras foram coletadas antes do tratamento, 24/156 (15,4%) amostras durante o período do tratamento e 40/156 (25,6%) amostras coletadas em visitas pós-tratamento, conforme pode ser verificado na tabela 4. Nesta, estão apresentadas as características das amostras e a relação de concordância dos resultados obtidos nos testes moleculares, sem considerarmos as diferenças entre as metodologias qualitativas e quantitativas, tomando por padrão o teste TMA. Quando os resultados encontrados por TMA eram iguais aos das outras técnicas moleculares utilizadas, os mesmos foram considerados concordantes. Se os resultados fossem diferentes, os mesmos eram considerados discordantes. Obtivemos resultados concordantes em 147/244 (60,2%) amostras e discordância em 97/244 (39,8%). Sendo que, das 97 amostras, 96 apresentaram resultados não detectáveis por outras metodologias e tiveram nível de viremia detectado por metodologia mais sensível (TMA) e uma amostra que apresentou resultado

detectável por outras metodologias, obteve resultado não detectável por TMA. Isso pode ter sido decorrência de algum erro técnico que não pode ser confirmado por falta de volume suficiente da amostra para repetição.

Tabela 4. Características das amostras em relação à fase do tratamento antiviral e à concordância de resultados dos testes moleculares utilizados *versus* TMA

Características	Amostras de pacientes com cura espontânea (n=88)	Amostras de pacientes crônicos (n=156)	Totais
Total de amostras selecionadas	88 (36,1)	156 (63,9)	244 (100)
Amostras coletadas em relação ao tratamento^a			
Pré-tratamento	-	92 (59,0)	-
Tratamento	-	24 (15,4)	-
Pós-tratamento	-	40 (25,6)	-
Resultados concordantes ^b	44 (50)	103 (66,0)	147 (60,2)
Resultados discordantes ^c	44 (50)	53 (34,0)	97 (39,8)

^a Somente pacientes crônicos foram tratados.

^b Resultados concordantes dos testes moleculares qualitativos e quantitativos *versus* TMA.

^c Resultados discordantes dos testes moleculares qualitativos e quantitativos *versus* TMA.

5.3 TESTES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HCV

Com relação à análise da dinâmica de anticorpos anti-HCV na coorte de estudo, a amostra populacional e as amostras biológicas selecionadas para testagem sorológica apresentaram características distintas em relação às daquelas dos indivíduos do estudo com os testes de detecção do RNA do HCV. Contudo, essas amostras pertencem à mesma casuística de pacientes acompanhados na fase inicial da infecção pelo HCV. Em ambos os estudos publicados e utilizados para nossa avaliação sorológica, o intervalo de acompanhamento dos pacientes abrangeu o período de janeiro de 2001 a dezembro de 2009, com um número menor ($n=65$) de pacientes em relação ao estudo molecular. No nosso primeiro estudo (Lewis-Ximenez *et al.* 2010), que objetivou a análise do perfil amostral para verificação das relações entre os dados demográficos, clínicos ou laboratoriais com a evolução da infecção pelo HCV em pacientes acompanhados no AHV por seis meses, não observamos diferenças significativas da maioria desses dados com os que encontramos no estudo molecular. Entretanto, tomando por base a mediana de 93,5,

calculada para todo o grupo dos pacientes estudados (86,7 versus 109,0; $p=0.015$, conforme Tabela 3, página 106 do artigo), os valores de do/co dos anticorpos anti-HCV relacionados à cura espontânea, foi o parâmetro que apresentou maior significância (2,62; $p=0.028$). Já no segundo estudo (Strasak *et al.* 2011), também com a mesma casuística, o período de avaliação foi estendido para 12 meses, a fim de verificar a relação dos níveis de anticorpos anti-HCV com a evolução da infecção pelo HCV, observada no primeiro estudo. Os dados revelaram que os pacientes com evolução para cura espontânea ($n=34$) obtiveram queda rápida nos valores do/co dos anticorpos anti-HCV, enquanto que os pacientes com evolução para infecção crônica ($n=31$) mantiveram os níveis elevados.

Na Figura 14 são demonstrados os valores de anticorpos anti-HCV obtidos em do/co, onde cada ponto representa o valor para anti-HCV de cada amostra seriada analisada, durante um ano de acompanhamento. Podemos observar no painel A, correspondente aos pacientes crônicos, que os valores obtidos para os anticorpos se mantiveram mais elevados durante o acompanhamento. Diferentemente, no painel B, referente aos pacientes com recuperação espontânea, os valores, além de mais baixos, sofreram um declínio ao longo do tempo.

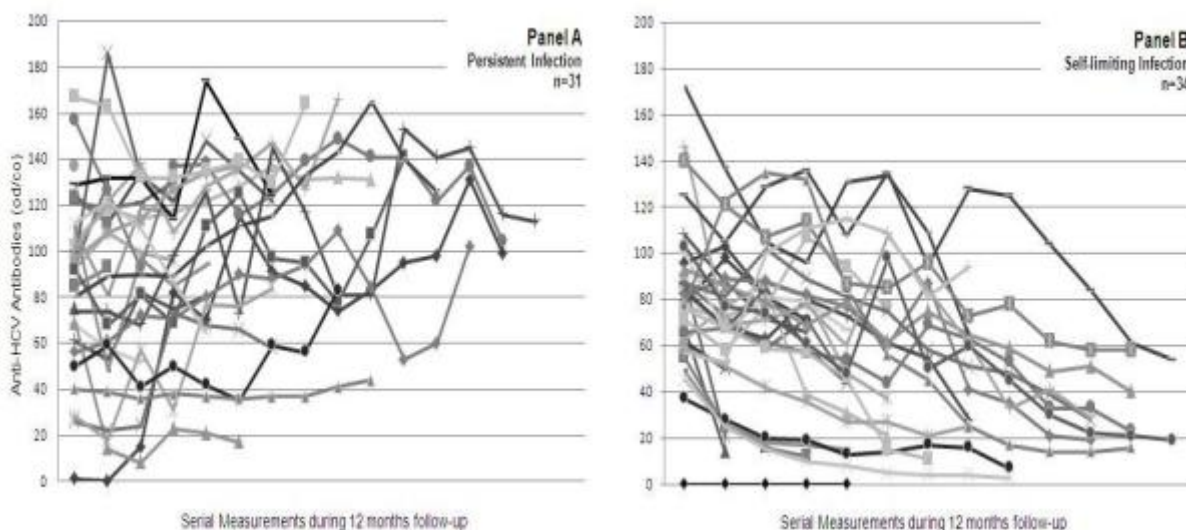


Figura 14. Padrões longitudinais de respostas seriadas de anticorpos anti-HCV (do / co) em 65 pacientes com infecção aguda pelo HCV durante os primeiros 12 meses de acompanhamento após a data estimada de infecção. O painel A mostra pacientes com viremia persistente aos 12 meses de acompanhamento e o painel B mostra pacientes com infecção autolimitada pelo HCV. Rio de Janeiro, Brasil, 2001-2009. Cada ponto na curva corresponde ao valor obtido para o teste. Todas as análises foram realizadas por metodologia MEIA, com o conjunto de reagentes Axsym HCV 3.0v e equipamento automatizado Axsym Abbott (Abbott Laboratories, EUA).

No anexo C, apresentamos as publicações científicas com os resultados completos, que serviram de base para nossos estudos sorológicos sobre a dinâmica dos anticorpos anti-HCV.

5.4 TESTES MOLECULARES QUALITATIVOS

O teste qualitativo por TMA VERSANT[®] HCV Siemens, com limite de 9,6 UI/mL, foi utilizado como padrão para testagem de todas as amostras, por ser o teste comercial mais sensível e, desta forma, permitir detectar amostras com viremias muito baixas.

Foram realizados 147 testes qualitativos pela metodologia RT-*nested*-PCR *in house*, com limite de detecção de 50 UI/mL, em 2006 (de Almeida *et al.* 2007). Foram obtidos 141/147 (95,9%) resultados não detectados e 6/147 (4,1%) resultados detectados. Quando comparamos os resultados em relação ao TMA, verificamos que 68/147 (46,3%) amostras apresentavam resultados concordantes e em 79/147 (53,7%) amostras os resultados eram discordantes.

Outro teste qualitativo realizado com algumas amostras foi a RT-PCR ELISA AMPLICOR[®] HCV da Roche, com limite de detecção de 50 UI/mL (Desombere *et al.* 2005). Por esta técnica, foram realizados 68 testes moleculares, dos quais 15/68 (22,1%) amostras obtiveram resultados detectados e as restantes 53/68 (77,9%) amostras forneceram resultados não detectados para o RNA do HCV. Quando comparados com TMA, encontramos 49/68 (72,1%) resultados concordantes e 19/68 (27,9%) resultados discordantes.

Das 244 amostras testadas por TMA, verificamos que 134/244 (54,9%) amostras apresentaram resultados detectáveis e 110/244 (45,1%) amostras resultaram como não detectáveis.

A tabela 5 apresenta os resultados dos testes moleculares qualitativos ($n=215$) e a frequência de concordância e discordância frente à técnica de TMA nas amostras biológicas realizadas no estudo e na figura 15 estão demonstrados graficamente os dados observados na tabela.

Tabela 5. Resultados obtidos pelas metodologias qualitativas durante o estudo e frequência de resultados concordantes e discordantes em relação aos encontrados pela metodologia TMA ($n=215$)

METODOLOGIAS QUALITATIVAS*	RESULTADOS ($n=215$)		COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS X TMA (9,6 UI/mL)*	
	DETECTADOS	NÃO DETECTADOS	CONCORDANTES	DISCORDANTES
RT-PCR ELISA Roche (50 UI/mL)	15 (22,1)	53 (77,9)	49 (72,1)	19 (27,9)
RT-nested-PCR in house (50 UI/mL)	6 (4,1)	141 (96,0)	68 (46,3)	79 (53,7)
TOTAL	21 (9,8)	194 (90,2)	117 (54,4)	98 (45,6)

* No campo das metodologias, os valores entre parêntesis representam o limite inferior de detecção de cada técnica.

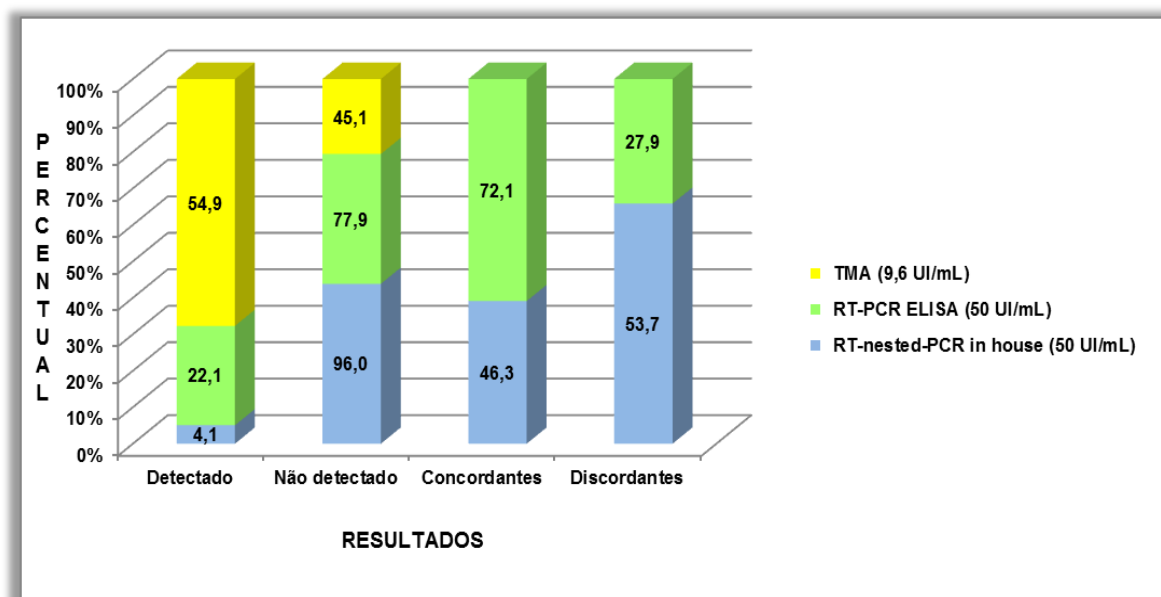


Figura 15. Gráfico percentual de resultados obtidos pelas metodologias qualitativas e frequência de resultados concordantes e discordantes em relação à metodologia TMA.

5.5 TESTES MOLECULARES QUANTITATIVOS

Os testes moleculares quantitativos foram realizados em 129 amostras por diferentes metodologias ao longo do tempo. Na análise geral dos testes quantitativos a tabela 6 mostra o número de amostras testadas em relação à metodologia empregada.

Tabela 6. Número de testes moleculares quantitativos realizados por metodologia nas amostras do estudo ($n=129$)

METODOLOGIAS QUANTITATIVAS (Limite mínimo de detecção)	TESTES REALIZADOS
	<i>n</i> (%)
RT-PCR Tempo Real Abbott (12 UI/mL)	1 (0,8)
RT-PCR Tempo Real Roche (25 UI/mL)	26 (20,1)
RT-PCR Tempo Real in house bioMérieux (300 UI/mL)	85 (65,9)
RT-PCR ELISA AMPLICOR® MONITOR Roche (600 UI/mL)	5 (3,9)
bDNA VERSANT® Siemens (615 UI/mL)	12 (9,3)

Das 129 amostras selecionadas, foi realizado teste molecular quantitativo por RT-PCR em tempo real (Abbott) em apenas 1/129 (0,8%) amostra, revelando resultado detectado para o RNA do HCV, que foi concordante quando comparado com o resultado obtido pela metodologia TMA para a mesma amostra.

Com o uso da RT-PCR em tempo real (COBAS® TaqMan HCV, Roche) foram testadas 26/129 (20,1%) amostras. Os resultados, após análise, revelaram a detecção do RNA do HCV em 8/26 (30,8%) amostras e em 18/26 (69,2%) amostras os resultados foram indetectáveis. Quando foram comparados com os resultados obtidos com o método TMA, encontramos 18/26 (69,2%) amostras nas quais os resultados foram concordantes e em 8/26 (30,8%) amostras os resultados foram discordantes.

Com relação aos testes moleculares quantitativos por RT-PCR em tempo real “in house”, desenvolvido pelo Laboratório bioMérieux, foram analisadas 85/129 (65,9%) amostras. Verificamos que em 44/85 (51,8%) amostras os resultados foram positivos para a presença do RNA do HCV. Nas 41/85 (48,2%) amostras restantes, encontramos resultados indetectáveis. A análise de concordância entre o teste de RT-PCR quantitativo “in house” e o teste qualitativo por TMA revelou que 51/85 (60,0%) amostras obtiveram concordância de resultados e outras 34/85 (40,0%) amostras revelaram resultados discordantes.

Pela técnica de RT-PCR ELISA AMPLICOR® HCV MONITOR da Roche, foram analisadas 5/129 (3,9%) amostras, todas apresentando resultados detectáveis para o RNA do HCV. Entretanto, pela metodologia TMA, 1/5 (20,0%) amostra forneceu resultado indetectável.

Para a quantificação pela metodologia bDNA foram selecionadas 12/129 (9,3%) amostras previamente testadas por este método, onde observamos que 4/12 (33,0%) amostras forneceram resultados detectáveis e 8/12 (67,0%) amostras apresentaram resultados indetectáveis. Na comparação com os resultados obtidos

com uso do método TMA, constatamos a ocorrência de 8/12 (67,0%) amostras com resultados concordantes e 4/12 (33,0%) amostras em que os resultados não apresentaram concordância.

A tabela 7 apresenta os resultados dos diferentes testes moleculares quantitativos ($n=129$) e a frequência de resultados concordantes e discordantes em relação à técnica TMA nas amostras biológicas analisadas.

Tabela 7. Resultados obtidos pelas metodologias quantitativas durante o estudo e frequência de resultados concordantes e discordantes em relação aos encontrados pelo método de amplificação mediada por transcrição ($n=129$)

METODOLOGIAS QUANTITATIVAS*	RESULTADOS		COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS X TMA (9,6 UI/mL)*	
	DETECTADOS	NÃO DETECTADOS	CONCORDANTES	DISCORDANTES
RT-PCR Tempo Real Abbott (12 UI/mL)	1 (100)	0	1 (100)	0
RT-PCR Tempo Real Roche (25 UI/mL)	8 (30,8)	18 (69,2)	18 (69,2)	8 (30,8)
RT-PCR Tempo Real in house bioMérieux (300 UI/mL)	44 (51,8)	41 (48,2)	51 (60,0)	34 (40,0)
RT-PCR ELISA AMPLICOR® MONITOR Roche (600 UI/mL)	5 (100)	0	4 (80,0)	1 (20,0)
bDNA VERSANT® Siemens (615 UI/mL)	4 (33,0)	8 (67,0)	8 (67,0)	4 (33,0)
TOTAL	62 (48,1)	67 (51,9)	82 (63,6)	47 (36,4)

* No campo das metodologias, os valores entre parêntesis representam o limite inferior de detecção de cada técnica.

5.6 VERIFICAÇÃO DA ACURÁCIA DOS TESTES MOLECULARES

A figura 16 mostra os valores de acurácia encontrados para os diversos testes moleculares realizados neste estudo em relação ao teste padrão TMA, para obter o grau de confiabilidade que podemos inferir para cada teste em revelar os valores reais na detecção do RNA do HCV.

O teste RT-PCR em tempo real (Abbott) não foi considerado nesta análise, porque só foi realizado um teste por esta técnica, com resultado concordante em relação ao TMA.

O teste RT-PCR ELISA AMPLICOR® MONITOR HCV (Roche), apesar de sua faixa de detecção com valor inferior elevado (600 UI/mL), foi o que apresentou melhor acurácia (80,0%) para detecção do RNA do HCV em nosso estudo.

Os testes RT-PCR ELISA AMPLICOR® HCV (Roche), RT-PCR em tempo real (Roche), bDNA (Siemens) e RT-PCR em tempo real “in house” (bioMérieux),

revelaram resultados de acurácia moderada em relação ao teste padrão, com valores de 72,0%, 69,0%, 67,0% e 60,0%, respectivamente.

Neste estudo, o teste em que observamos a menor similaridade com os resultados obtidos no teste padrão por TMA foi o teste molecular qualitativo “in house” RT-*nested*-PCR (50 UI/mL). Verificamos que o valor de acurácia encontrado se manteve em faixa extremamente baixa (46,0%).

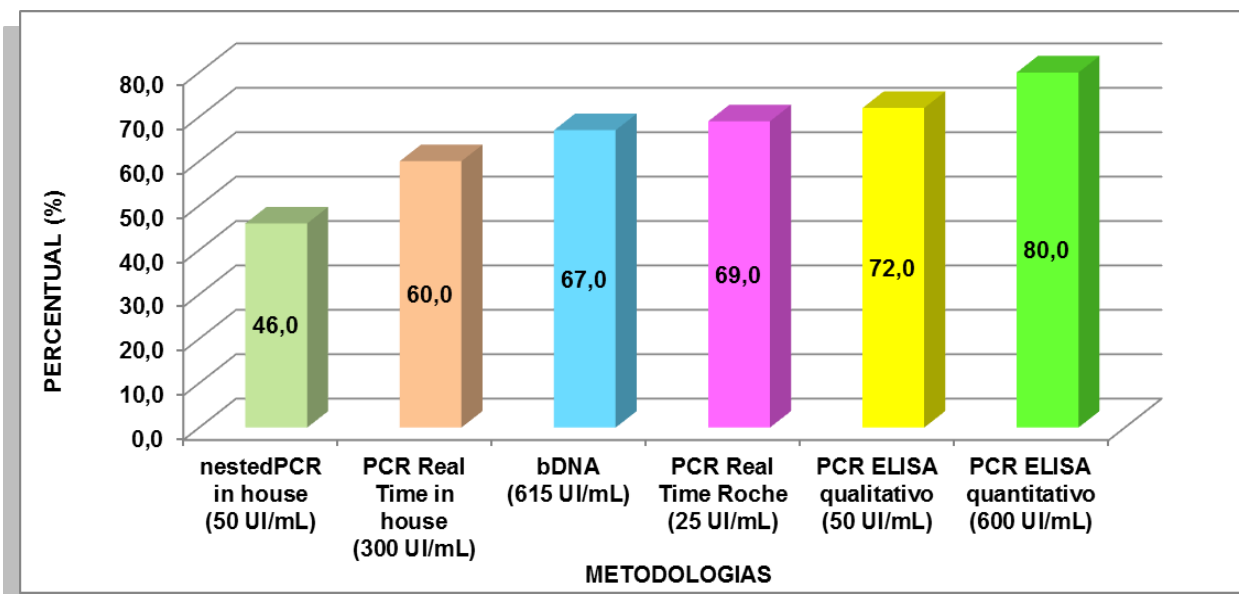


Figura 16. Valores percentuais de acurácia dos vários testes moleculares do estudo tendo como padrão-ouro o teste qualitativo por metodologia TMA.

6. DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A alta prevalência mundial da infecção pelo HCV e sua tradução em elevada morbidade e mortalidade têm conferido a esta doença o *status* de grave problema de saúde pública (Strauss 2001). Além do impacto na saúde de aproximadamente 170 milhões de indivíduos em todo mundo e nas vidas de suas famílias, os custos sociais diretos e indiretos são muitíssimo elevados, tendo na infecção pelo HCV uma das principais causas de hepatites crônicas e transplante hepático (Burke & Cox 2010; GBD 2004; Perz *et al.* 2004). A partir da descoberta do HCV, em 1989 (Choo *et al.* 1989), foi possível o desenvolvimento de testes sorológicos e de detecção de ácido nucleico que permitiram subseqüentes avaliações da magnitude de sua distribuição em diferentes áreas geográficas e grupos populacionais.

O problema é que a hepatite C aguda é, muitas vezes, clinicamente branda ou assintomática e, raramente, é reconhecida fora de um cenário de vigilância prospectiva, após exposição a fatores de risco conhecidos. Há, ainda, um número de importantes questões não resolvidas sobre o tratamento da hepatite C aguda. Por exemplo, ainda restam dúvidas de quando e quais pacientes devem ser tratados. Tanto o ponto de vista clínico como as perspectivas de investigação são importantes para o reconhecimento da hepatite C aguda e para o entendimento da sua dinâmica, a fim de possibilitar o desenvolvimento de um tratamento mais eficaz e estratégias preventivas (Cox *et al.* 2005; Guobuzaitė *et al.* 2008).

No Brasil, o Ministério da Saúde instituiu, desde 1993, a triagem sorológica (Ministério da Saúde 1993) e, a partir de 2002, com o surgimento dos testes moleculares para detecção do RNA do HCV, determinou sua utilização por meio da portaria 1407 (Ministério da Saúde 2002).

Os testes moleculares são uma ferramenta essencial para reduzir o período de janela imunológica, pois os anticorpos anti-HCV frequentemente só são detectados a partir da 12ª semana de exposição (Calvaruso & Craxi 2012; Erensoy 2001). Além disso, são extremamente úteis para o diagnóstico preciso e monitoramento da resposta à terapia antiviral. A utilização de técnicas moleculares de alta sensibilidade torna-se fundamental em indivíduos imunossuprimidos ou imunodeficientes e hemodialisados, onde a produção de anticorpos anti-HCV nem

sempre é evidente, a fim de reduzir a transmissão viral, assim como em pacientes em tratamento e pós-tratamento antiviral (Laperche *et al.* 2011; Pawlotsky 2010).

O objetivo do presente trabalho vai de encontro à realidade encontrada, tornando-o ainda mais relevante quando situado em um contexto propício, ou seja, o interesse na pesquisa que permita sugerir um diagnóstico molecular eficiente, que diminuam os riscos de uma avaliação clínica equivocada, que pode ocorrer por conta de metodologias pouco sensíveis e longo período para retorno à visita clínica, associados à baixa viremia no paciente. Hoje, no Brasil, é consenso que seja considerada a alta clínica para pacientes que apresentem duas técnicas moleculares com resultados não detectáveis (Ministério da Saúde 2011). Contudo, verificou-se que alguns pacientes podem sofrer recidivas da infecção, devido aos baixos níveis de replicação viral, na maioria das vezes indetectáveis (Conte 2000). Assim, torna-se necessário que busquemos por metodologias mais eficazes, a fim de conseguir resultados mais precisos.

6.2 ESTUDOS SOROLÓGICOS

Um dos focos do nosso estudo foi a verificação da importância da dinâmica dos anticorpos anti-HCV, medidos em densidade óptica/*cut-off* (do/co), na evolução da infecção aguda pelo HCV. Em estudos sorológicos de nosso grupo de pesquisa, publicados em 2010 e 2011, discordamos de Loomba e colaboradores, quando afirmam que não há características confiáveis, mesmo em testes seriados, que possam prever a recuperação do paciente com infecção pelo HCV (Loomba *et al.* 2011). Pelas análises, realizadas em amostras seriadas, foi verificada a existência de relação entre os valores de do/co dos anticorpos e a evolução clínica da infecção aguda pelo HCV, servindo como ferramenta auxiliar no prognóstico da doença (Strasak *et al.* 2011). Neste estudo, a realização dos testes sorológicos para detecção de anti-HCV, por metodologia de enzima-imunoensaio por micropartículas (MEIA), foi feita com uso dos reagentes AxSYM HCV 3.0v, automatizado no equipamento AxSYM System da marca Abbott Laboratories (EUA), que serviu como um dos principais parâmetros de análise.

O primeiro estudo realizado objetivou analisar a taxa de cura espontânea e identificar os fatores virais e do hospedeiro, como tipo de exposição, carga viral, genótipo, sexo, etnia, idade, sintomas, que pudessem prever a evolução para

infecção autolimitada ou crônica pelo HCV (Lewis-Ximenez *et al.* 2010). A casuística era composta por um número menor de participantes ($n=65$) do que no estudo para avaliação das metodologias de detecção do RNA do HCV, considerando que a coorte abrangia o intervalo entre os anos de 2001 e 2008. Por se tratar da mesma coorte do estudo atual, não observamos diferenças significativas em relação a cura espontânea para dados epidemiológicos como idade, sexo, raça, genótipo, fatores de risco e tempo de acompanhamento, como também não verificamos relação entre picos de ALT e cura espontânea. Contudo, a maioria dos participantes era sintomática (54/65), apresentando icterícia, e com carga viral baixa na primeira visita clínica. O possível viés que essas características da coorte poderiam provocar no estudo foi minimizado com a inclusão de pacientes assintomáticos. Nesse caso, foi constatada associação destas características com a evolução autolimitada da infecção aguda pelo HCV. Um estudo italiano verificou relação entre o fator idade e presença de icterícia como preditores de cura espontânea na coorte estudada (Santantonio *et al.* 2003). Em outro estudo, foi constatado que o valor da carga viral basal era frequentemente baixo em pacientes que evoluíram para cura espontânea (Hofer *et al.* 2003). Todavia, na nossa análise verificamos que os baixos valores dos anticorpos anti-HCV ($p=0.015$), a ocorrência de sintomas ($p<0.001$) e o valor de carga viral baixo na primeira visita clínica ($p<0,01$), nos seis primeiros meses de acompanhamento seriado, eram preditores para a cura espontânea. Após a análise por regressão multivariada, tomando como variáveis todas as características dos pacientes, somente os valores de do/co dos anticorpos anti-HCV, utilizando a mediana de todos os valores obtidos (93,5), mostraram-se significativamente relacionados com a evolução para a cura espontânea do paciente (2,62; 95% CI = 1,11-6,19; $p=0.028$). Para verificação da sensibilidade da análise, foram estimadas diferentes datas de exposição ao vírus que produziram dados semelhantes sugerindo que, mesmo que houvesse erro na informação, o impacto provocado sobre os achados foi insignificante. Alguns pesquisadores já haviam relatado a relação da taxa de anticorpos com a resolução espontânea da infecção pelo HCV (Huang *et al.* 2005; Lu *et al.* 2004). Também outros afirmaram que a resposta imune humoral, mesmo insuficiente, pode ser moduladora da doença crônica, sugerindo poder haver diminuição, ou até mesmo perda, dos anticorpos anti-HCV com a recuperação dos pacientes, diferentemente do que ocorre com os pacientes crônicos, nos quais os níveis de anticorpos podem se manter ou aumentar (Chen *et al.* 1999; Logvinoff *et al.* 2004; Netski *et al.* 2005; Nikolaeva *et al.* 2002; Takaki *et al.*

2000). Nosso estudo, em contrapartida, refere-se aos valores mensurados que, embora com limitações importantes como, por exemplo, o tamanho amostral insuficiente para obtenção de estimativas mais precisas e a falta de assintomáticos no grupo de pacientes com infecção autolimitada, necessitando confirmação em outras populações, sugeriu que o tempo para resolução espontânea deve ser considerado, principalmente em pacientes sintomáticos onde se observem baixos níveis de anticorpos anti-HCV na fase aguda da doença.

Em continuidade ao primeiro estudo, o segundo estudo levou em conta a mesma casuística com 65 pacientes, porém, estendendo o período de acompanhamento para 12 meses, a fim de verificar com mais propriedade a dinâmica dos anticorpos anti-HCV observada no estudo anterior (Strasak *et al.* 2011). Seu objetivo principal foi associar a resposta humoral, por meio da determinação dos níveis de anticorpos anti-HCV, à evolução clínica da infecção pelo HCV na sua fase inicial. As análises também foram feitas pela metodologia MEIA, em amostras seriadas, coletadas nas visitas clínicas agendadas, conforme já foi descrito. Estudos realizados anteriormente comprovaram que um grande número de pacientes com resolução viral espontânea apresentaram sororeversão (desaparecimento de anticorpos anti-HCV), mesmo quando analisados em uma coorte de pacientes hemofílicos (Messick *et al.* 2001; Takaki *et al.* 2000). A queda do nível de anticorpos ou sua perda total parece estar relacionada à falta do estímulo antigênico do HCV em pacientes imunocompetentes com recuperação espontânea (Lefrere *et al.* 1997). Foram realizados estudos em chimpanzés que comprovaram que inóculos com doses baixas do HCV produzem resposta imunológica, mas dificilmente viremia detectável ou soroconversão (Shata *et al.* 2003). Outros estudos demonstraram que níveis de anticorpos anti-HCV indeterminados ou fraco-positivos são preditores de ausência de viremia (Bossi & Galli 2004). Mais uma vez, em nosso estudo consideramos os valores em do/co, medidos por técnicas sorológicas para anticorpos anti-HCV e algumas limitações devem ser consideradas: a) a predominância dos pacientes participantes era sintomática e do sexo feminino, duas características favoráveis à recuperação espontânea; b) a data de exposição de alguns pacientes não estava bem definida e teve de ser estimada, porém, o estudo anterior (Lewis-Ximenez *et al.* 2010) já tinha avaliado que o impacto dessa estimativa era desprezível para a sensibilidade da análise; e, c) a coleta amostral não foi uniforme em relação ao tempo, o que impediu uma avaliação consistente em relação à resposta humoral em um período de tempo uniforme.

Os dados epidemiológicos foram semelhantes aos do estudo molecular, por se tratar da mesma casuística e as diferenças não foram significativas, considerando o menor período de tempo e, conseqüentemente, o menor tamanho amostral.

Em relação aos valores sorológicos para anti-HCV, o grupo que alcançou a resolução viral espontânea apresentava um valor basal menor do que os valores basais encontrados no grupo que cronicou. Nos pacientes com resolução espontânea ($n=34$), os valores declinaram ainda mais após a recuperação. O mesmo não foi observado nos pacientes crônicos ($n=31$), que mantiveram os níveis elevados do marcador anti-HCV ($p<0.0001$).

Os dados apresentados anteriormente na figura 14 indicam um declínio rápido, de curto prazo, nos valores de anticorpos anti-HCV em pacientes com resolução espontânea da infecção aguda pelo HCV. As medições seriadas dos anticorpos anti-HCV podem também auxiliar na distinção dos dois desfechos e poderia ser útil para o prognóstico em locais onde a realização do RNA do HCV é inexistente ou restringida por limitações de recursos.

6.3 ESTUDO MOLECULAR

Nossa coorte de estudo foi composta de 50 pacientes com diagnóstico bem documentado de infecção aguda pelo HCV, acompanhados prospectivamente no AHV/IOC/Fiocruz, de 2001 a 2011, desde a fase inicial da infecção e que, pelo nosso conhecimento, representam a maior coorte de pacientes diagnosticados e acompanhados desde a fase aguda da infecção na América Latina (Lewis-Ximenez *et al.* 2010).

Em relação aos dados epidemiológicos, a faixa etária dos pacientes em nosso estudo manteve-se acima dos 40 anos, de forma similar aos resultados já observados na literatura (Wong & Lee 2006; Yen *et al.* 2003). Observamos em nossos dados uma frequência maior de indivíduos do sexo feminino. No entanto, a prevalência de hepatite C aguda em ambos os sexos é controversa. Enquanto alguns estudos mostraram maior prevalência entre os homens (Alter 2007; Wasley & Alter 2000), outros apresentaram taxas ligeiramente superiores em mulheres (Bakr *et al.* 2006; Spada *et al.* 2001). Porém, pacientes do sexo feminino estão mais associados a resultados favoráveis de cura da infecção aguda pelo HCV (Micallef *et al.* 2006). A transmissão nosocomial foi a mais relatada entre os pacientes e está de

acordo com os dados obtidos por vários outros autores (Fabrizi *et al.* 2008; Martinez-Bauer *et al.* 2008; Santantonio *et al.* 2006), tendo o compartilhamento de instrumentos, a falta de medidas de precaução, o tempo de intervenção e a esterilização do instrumental como as principais causas. Importante notar que o segundo fator de risco mais relatado pelos pacientes foi a transmissão sexual, por sexo desprotegido. Nosso percentual (30%) se mostrou ligeiramente acima dos 17% a 20% encontrados em coortes dos EUA, descritos por outros pesquisadores (Alter 2007; Wasley & Alter 2000). A grande maioria dos pacientes apresentou infecção pelo genótipo 1, o que pode ser explicado por ser este genótipo o mais prevalente no Brasil (Ministério da Saúde 2010). Dos pacientes selecionados para o estudo molecular, 52% evoluíram para doença crônica e uma parcela considerável (48%) apresentou resolução viral espontânea. Estimativa semelhante à nossa foi relatada por outros pesquisadores em coortes de pacientes sintomáticos (Santantonio *et al.* 2003; Sharaf Eldin *et al.* 2008). De outra forma, em pesquisas feitas em populações de pacientes assintomáticos realizadas nos EUA, esta estimativa foi menor, em torno de 18% a 20% (Page *et al.* 2009; Wang *et al.* 2007). Por fim, o mesmo número de pacientes com evolução para infecção crônica, tratados mesmo antes da cronificação, correspondeu aos que não receberam tratamento antiviral, tornando a população homogênea neste aspecto.

Sobre nosso estudo com os testes moleculares, tomou-se por padrão o teste TMA, por apresentar um limite de detecção de 9,6 UI/mL à época das análises, e permitir a detecção de amostras com viremia ou carga viral muito baixa (Morishima *et al.* 2008). Por isso, a TMA tem sido amplamente utilizada para detectar níveis de viremia que outras técnicas qualitativas de RT-PCR não conseguem mensurar (Bastos *et al.* 2012; Lauer & Walker 2001), além de se mostrar útil para determinar a eficácia ao final do tratamento antiviral, onde é comum a ocorrência de viremia residual não detectada em testes moleculares com limite mínimo de detecção mais alto (Comanor *et al.* 2001; Gerotto *et al.* 2006; Sarrazin *et al.* 2000; Thadani *et al.* 2012). Também foi padronizada a unidade de medida em UI/mL, a fim de permitir a comparação dos dados com maior precisão. Na visão geral, englobando todos os testes qualitativos e quantitativos, encontramos discordância em um número percentual elevado de amostras (39,8%).

Devemos considerar como fator de erro em nosso estudo molecular, o fato de que, além dos testes moleculares terem sido realizados por várias metodologias e técnicas diferentes, sua execução variou ao longo do tempo. A condição ideal seria

a realização das análises no mesmo período de tempo, o que não foi possível tratando-se de um estudo prospectivo com análise retrospectiva das amostras biológicas que dependeu da disponibilidade dos testes.

As duas metodologias moleculares qualitativas realizadas durante o acompanhamento dos pacientes, tanto a técnica RT-*nested*-PCR “in house” como a RT-PCR ELISA, possuem o mesmo limite inferior de detecção (50 UI/mL) (de Almeida *et al.* 2007; Lee *et al.* 2000). Entretanto, a técnica de RT-*nested*-PCR “in house” foi a que apresentou o maior número de resultados não detectáveis, discordantes quando comparada com TMA e pela qual foi testado o maior número de amostras do nosso estudo (147 amostras). Mesmo quando analisamos os resultados encontrados, considerando os períodos antes e após o ano de 2006, quando ocorreu uma mudança nos iniciadores selecionados para uso no protocolo, visando à melhoria do desempenho do teste, não obtivemos diferença relevante. Entretanto, foi a metodologia mais utilizada no início do estudo em 2001 e durante alguns anos posteriores no LAHEP. Objetivamos, no nosso estudo molecular, avaliar apenas o desempenho das técnicas empregadas por meio da acurácia de diferentes metodologias de detecção do RNA do HCV em amostras com viremia intermitente, durante o período de estudo, frente ao teste qualitativo de método mais sensível (TMA). A acurácia da técnica RT-*nested*-PCR “in house” pode ter sido afetada por diversos fatores que necessitam de avaliação posterior, inclusive por se tratar de um teste “in house”, que utiliza a detecção em bandas reveladas por eletroforese em gel de agarose, comparado a um teste comercial semi-automatizado, que utiliza detecção colorimétrica dos produtos amplificados e hibridizados à sonda, o que a torna mais sensível. A técnica RT-PCR ELISA COBAS AMPLICOR® (Roche) apresentou um percentual elevado de resultados não detectados, mas a melhor taxa de concordância (72%) para detecção do RNA do HCV quando comparada à técnica TMA. Mesmo assim, os resultados discordantes encontrados, aproximadamente 36% dos não detectados, refletem a dificuldade da RT-PCR ELISA em detectar todos os casos com baixos níveis de viremia, talvez decorrente do seu limite de detecção de 50 UI/mL, como já haviam demonstrado outros autores (Comanor *et al.* 2001; Desombere *et al.* 2005; Kraiden *et al.* 2002; Sarrazin *et al.* 2000).

Os testes para detecção quantitativa do RNA do HCV têm importância fundamental no desfecho da resposta ao tratamento antiviral. O monitoramento da carga viral ao longo e ao término do tratamento antiviral é fator preponderante para o controle da infecção pelo HCV e avaliação da resposta virológica, em que o paciente

deve apresentar uma diminuição de 2 logs (100 vezes) no valor da carga viral já na 12^a semana da terapia (Chevaliez & Pawlotsky 2006). Além disso, as flutuações de carga viral ocorridas, principalmente durante a fase inicial da infecção com baixos níveis de RNA do HCV, podem refletir um controle imunológico transitório ou declínio viral anterior à eliminação espontânea, dependendo de quanto e quando o paciente é avaliado durante o curso da doença. Os estudos mostram que os títulos de RNA do HCV tenderão a permanecer estáveis ou aumentar quando os indivíduos entram na fase crônica (Fanning *et al.* 2000; McGovern *et al.* 2009), apesar de termos captado algumas amostras com resultados intermitentes de pacientes também nesta fase da evolução da doença. Em algumas metodologias, a incapacidade de detectar baixos níveis de RNA do HCV pode levar a relatos de resultados não detectáveis, durante o curso da doença e ao término da terapia antiviral, e pode justificar o uso de ensaios complementares dotados de maior sensibilidade. O ensaio ideal para detecção do RNA do HCV seria aquele com limite inferior de detecção de até 25 UI/mL e uma faixa linear de detecção de 6 a 7 log (Caliendo *et al.* 2006). Em pacientes com carga viral elevada, pode ocorrer grande variabilidade na determinação da carga viral e, se a faixa linear de detecção dos testes quantitativos não for suficientemente abrangente, pode haver o comprometimento na avaliação da resposta ao tratamento, devido à indefinição da queda de 2 logs, obrigando a repetição da testagem com diluição naquela amostra. Esta prática, além de aumentar a possibilidade de erro, eleva o custo do teste (Sherman *et al.* 2002).

Assim, precisamos estar atentos ao método do ensaio utilizado para a quantificação do RNA do HCV, já que a manutenção da mesma metodologia poderá otimizar a avaliação dos resultados em cada paciente. A padronização entre os ensaios de quantificação foi solucionada, em parte, pela adoção da Unidade Internacional (UI) na expressão dos resultados (Saldanha *et al.* 2005). Contudo, os resultados continuam apresentando diferenças significativas entre os testes, apesar da padronização em UI/mL (Caliendo *et al.* 2006). Por esta perspectiva, baseia-se também a afirmativa de Zeuzem e colaboradores (2009): “a relevância clínica do nível viral de HCV, com medições seriadas em um paciente, é dependente do uso contínuo do ensaio quantitativo específico empregado na determinação inicial. Isto pode implicar repetidos testes em alguns casos, mas esses custos adicionais podem ser justificados se eles afetam as decisões sobre o manejo do tratamento”.

A diferenciação entre resultados não detectáveis e resultados detectáveis, mas não quantificáveis, continua a ser um ponto delicado e, em grande parte,

depende do contexto clínico. Quando há suspeita de infecção precoce, especialmente quando anticorpos anti-HCV ainda não estão detectáveis ou mesmo em um nível muito baixo, esta distinção é importante, a fim de iniciar a terapia antiviral precoce. A eliminação do HCV é o objetivo principal do tratamento antiviral. Assim, é importante para os clínicos terem resultados confiáveis que reflitam a realidade do estado de eliminação viral. Esta questão deve ser resolvida com a disponibilidade de métodos mais sensíveis de PCR (Harrington *et al.* 2012).

Ao longo do tempo que englobou as amostras do nosso estudo, foram realizados cinco testes diferentes para detecção quantitativa do RNA do HCV. A utilização de cada uma, em determinado período (gráfico 1), dependeu da disponibilidade dos testes nos diversos laboratórios colaboradores.

Com relação à técnica RT-PCR em tempo real (Abbott), cujo limite de detecção inferior é de 12 UI/mL, não podemos avaliar seu desempenho, tendo em vista que foi realizado apenas em uma amostra mais recente selecionada para nosso estudo, com resultado detectável, concordante com a técnica TMA. Por conseguinte, qualquer avaliação que fizermos sobre o resultado encontrado será inadequada, considerando a falta de um número maior de testes que permita uma análise consistente. Entretanto, alguns autores têm relatado seu excelente desempenho na detecção de carga viral em viremias baixas, em indivíduos com ou sem tratamento, devido ao seu limite de detecção mais sensível e com uma diferença insignificante em relação ao teste TMA (Bortoletto *et al.* 2011; Caliendo *et al.* 2006; Matsuura *et al.* 2009).

A RT-PCR em tempo real do COBAS TaqMan[®] HCV (Roche) possui limite inferior de 25 UI/mL. Por esta metodologia foram testadas 26 amostras que apresentaram 69,2% de resultados não detectáveis. Apesar da boa sensibilidade desta técnica, quando foram testadas as amostras pelo método TMA, verificamos uma alta taxa de discordância, haja vista que aproximadamente 39% dos resultados não detectáveis resultaram em detectáveis pela metodologia mais sensível. Entretanto, o número de amostras testadas e alguma interferência técnica ou condição de análise pode ter superestimado nossos resultados, inclusive pela observação de que uma amostra com resultado detectado pela RT-PCR em tempo real não foi detectada pela TMA, não podendo ser repetida para confirmação por apresentar volume insuficiente. Trabalhos de vários autores discordam das nossas observações e consideram o teste bastante sensível para a detecção do RNA do HCV. Entretanto, Caliendo e colaboradores, em 2006, observaram a dificuldade da

RT-PCR em tempo real (Roche) em quantificar corretamente os genótipos 3 e 4. Já o estudo de Elkady e colaboradores, em 2010, observou essa dificuldade também em relação ao subtipo 1b (Caliendo *et al.* 2006; Elkady *et al.* 2010; Germer *et al.* 2005; Halfon *et al.* 2006).

Outra técnica utilizada, a RT-PCR em tempo real “in house” (bioMérieux), teve seu limite inferior padronizado em 300 UI/mL para fins de comparação (Komurian-Pradel *et al.* 2001). Esta técnica foi a mais utilizada entre todas as técnicas quantitativas nas amostras selecionadas ($n=85$). Apesar de apresentar um alto índice de detecção e de concordância dos resultados em relação ao teste TMA, o limite de detecção da técnica parece ser a principal causa para os resultados falso-negativos encontrados. Entretanto, devemos também considerar que as metodologias “in house” apresentam uma probabilidade maior de erro por conta do manuseio operacional, desenho dos iniciadores e ajustes de protocolo. Um estudo publicado por Komurian-Pradel e colaboradores, em 2004, demonstrou a excelência do método para avaliar a cinética de replicação do RNA do HCV em sítio hepático e extra-hepático (Komurian-Pradel *et al.* 2004).

Em algumas amostras foram realizadas as técnicas quantitativas de RT-PCR ELISA AMPLICOR[®] MONITOR HCV (Roche) e bDNA VERSANT[®] (Siemens), apresentando limites mínimos de detecção mais elevados e aproximadamente iguais, de 600 UI/mL e 615 UI/mL, respectivamente. Coincidentemente, também a maioria desses testes foi realizada durante o mesmo período, mas em amostras diferentes. Na metodologia quantitativa bDNA, com limite superior de detecção mais elevado, encontramos discordância em 50% das amostras com resultados não detectáveis quando testadas pela técnica TMA. Esse resultado já era esperado, considerando o limite inferior mais alto do teste bDNA, o que sugere aumento na probabilidade de encontrar resultados falso-negativos. Com o teste quantitativo RT-PCR ELISA foram realizadas poucas análises e nenhuma apresentou resultado não detectável, o que não nos permitiu fazer uma avaliação de seu desempenho em relação à técnica mais sensível TMA. Contudo, a expectativa em relação ao teste RT-PCR ELISA é de que apresentasse desempenho parecido, mas não igual ao da metodologia bDNA, devido à proximidade dos limites inferiores de detecção. Além disso, embora o teste bDNA possua limite inferior ligeiramente mais alto que a RT-PCR ELISA, os seus resultados não podem ser intercambiáveis, considerando as diferenças de princípios e de procedimentos (Brandao *et al.* 2001). Neste aspecto, alguns autores confirmam a concordância existente entre as metodologias RT-PCR

ELISA e bDNA, mas salientam que o segundo apresenta ligeira piora na detecção dos níveis virais em consequência do seu limite inferior de detecção mais elevado. Alguns pesquisadores demonstraram que resultados não detectáveis em qualquer das duas técnicas não devem servir de parâmetro exclusivo para interromper o curso terapêutico (Desombere *et al.* 2005; Shiffman *et al.* 2003).

7. CONCLUSÕES

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HCV demonstraram ser um excelente preditor de evolução clínica da infecção pelo HCV em fase inicial, desde que sejam realizados e observados com maior periodicidade e pela mesma metodologia. Pacientes que apresentaram queda dos valores dos anticorpos evoluíram para resolução espontânea. Ao contrário, resultados sorológicos que se mantêm ou aumentam podem ajudar na decisão de iniciar precocemente a terapia antiviral. Além disso, sua utilização pode ser bastante útil em áreas onde se constata a ausência dos testes moleculares.

A maioria dos testes moleculares qualitativos e quantitativos, realizados em nosso estudo, com amostras seriadas dos pacientes diagnosticados na fase inicial da infecção pelo HCV e que apresentavam resultados negativos intermitentes durante o acompanhamento, não foram capazes de detectar níveis mais baixos de viremia, em muitos episódios que apresentavam resultados intermitentes. O percentual de resultados falso-negativos encontrados no estudo foi elevado quando testados por metodologia mais sensível (TMA). Quanto mais baixo o valor do limite mínimo de detecção dos testes moleculares, menor a ocorrência de resultados falso-negativos intermitentes.

Considerando o protocolo atual de tratamento dos pacientes portadores de hepatite C, devemos observar os limites de detecção apresentados pelas técnicas moleculares e, em caso de dúvida, sugerir a realização por metodologia mais sensível. Isso poderá evitar que o paciente, mantido equivocadamente sem tratamento antiviral, retorne com quadro grave de doença hepática.

A coleta de amostras seriadas com maior periodicidade, principalmente na fase inicial da infecção pelo HCV, pode aumentar as chances de um diagnóstico precoce mais consistente, além de dar ao médico mais subsídios na decisão quanto ao momento mais oportuno para começar o esquema terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afdhal NH 2004. The natural history of hepatitis C. **Semin Liver Dis.** 24 Suppl 2: 3-8.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P 2008. Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.

Alter HJ 1992. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. **Hepatology.** 15(2): 350-353.

Alter MJ 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol.** 13(17): 2436-2441.

Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M & Seya T 2012. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. **Microbiol Immunol.** 56(1): 1-9.

Appel N, Schaller T, Penin F & Bartenschlager R 2006. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. **J Biol Chem.** 281(15): 9833-9836.

Araujo AC, Astrakhantseva IV, Fields HA & Kamili S 2011. Distinguishing acute from chronic hepatitis C virus (HCV) infection based on antibody reactivities to specific HCV structural and nonstructural proteins. **J Clin Microbiol.** 49(1): 54-57.

Arnold LJ, Jr., Hammond PW, Wiese WA & Nelson NC 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. **Clin Chem.** 35(8): 1588-1594.

Bakr I, Rekecewicz C, El Hosseiny M, Ismail S, El Daly M, El-Kafrawy S, Esmat G, Hamid MA, Mohamed MK & Fontanet A 2006. Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. **Gut.** 55(8): 1183-1187.

Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J & Lee SR 1995. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. **Vox Sang.** 68(1): 15-18.

Bartenschlager R, Frese M & Pietschmann T 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. **Adv Virus Res.** 63: 71-180.

Bartosch B & Cosset FL 2006. Cell entry of hepatitis C virus. **Virology.** 348(1): 1-12.

- Bastos DO, Perez RM, Silva IS, Lemos LB, Simonetti JP, Medina-Pestana JO, Silva AE & Ferraz ML 2012. Transcription-mediated amplification (TMA) for the assessment of viremia in hemodialysis patients with hepatitis C. **J Med Virol.** 84(4): 596-600.
- Bataille S, Kaplanski G, Boucraut J, Halfon P, Camus C, Daniel L, Burtey S, Berland Y & Dussol B 2012. Membranoproliferative glomerulonephritis and mixed cryoglobulinemia after hepatitis C virus infection secondary to glomerular NS3 viral antigen deposits. **Am J Nephrol.** 35(2): 134-140.
- Benner SA & Sismour AM 2005. Synthetic biology. **Nat Rev Genet.** 6(7): 533-543.
- Blackard JT, Shata MT, Shire NJ & Sherman KE 2008. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. **Hepatology.** 47(1): 321-331.
- Bortoletto G, Campagnolo D, Mirandola S, Comastri G, Severini L, Pulvirenti FR & Alberti A 2011. Comparable performance of TMA and Real-Time PCR in detecting minimal residual hepatitis C viraemia at the end of antiviral therapy. **J Clin Virol.** 50(3): 217-220.
- Bossi V & Galli C 2004. Quantitative signal of anti-HCV by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection. **J Clin Virol.** 30(1): 45-49.
- Brandao AB, Fuchs SC, Silva MA & Emer LF 2001. Diagnosis of hepatitis C in clinical practice: review of the literature. **Rev Panam Salud Publica.** 9(3): 161-168.
- Buhler S & Bartenschlager R 2011. Molecular mechanisms of hepatitis C virus (HCV) replication - implications for the development of antiviral drugs. **Z Gastroenterol.** 49(7): 836-844.
- Buhler S & Bartenschlager R 2012. New targets for antiviral therapy of chronic hepatitis C. **Liver Int.** 32 Suppl 1: 9-16.
- Burke KP & Cox AL 2010. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunol Res.** 47(1-3): 216-227.
- Butt AA & Kanwal F 2012. Boceprevir and telaprevir in the management of hepatitis C virus-infected patients. **Clin Infect Dis.** 54(1): 96-104.
- Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC & Opolon P 1999. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. **Arthritis Rheum.** 42(10): 2204-2212.

Caldwell S & Park SH 2009. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology. **J Gastroenterol.** 44 Suppl 19: 96-101.

Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, Ferreira-Gonzalez A, Tsongalis GJ, Pyles R, Bremer JW & Lurain NS 2006. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. **J Clin Microbiol.** 44(5): 1726-1732.

Calvaruso V & Craxi A 2012. 2011 European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. **Liver Int.** 32 Suppl 1: 2-8.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM & Bernardini AP 2005. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** 38(1): 41-49.

Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, Machado TM, Lemaire DC, Mendes CM, Pinho JR, Malta F, Lyra LG & Lyra AC 2012. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. **Liver Int.** 32(3): 476-486.

CDC 2011. Center for Disease Control and Prevention. Travelers Health. Chapter 3. Hepatitis C. Acessado em: 21/02/2012. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-c.htm>

Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D & Milich DR 1999. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. **Gastroenterology.** 116(1): 135-143.

Chen SL & Morgan TR 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci.** 3(2): 47-52.

Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R & Pawlotsky JM 2007. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. **Hepatology.** 46(1): 22-31.

Chevaliez S & Pawlotsky JM 2006. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. **Int J Med Sci.** 3(2): 35-40.

Chevaliez S & Pawlotsky JM 2007. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World J Gastroenterol.** 13(17): 2461-2466.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW & Houghton M 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. 244(4902): 359-362.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ & et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci USA**. 88(6): 2451-2455.

Cikos S & Koppel J 2009. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. **Anal Biochem**. 384(1): 1-10.

Cocquerel L, Voisset C & Dubuisson J 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. **J Gen Virol**. 87(Pt 5): 1075-1084.

Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F & Trepo C 2001. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. **J Viral Hepat**. 8(2): 87-95.

Colucci G, Ferguson J, Harkleroad C, Lee S, Romo D, Soviero S, Thompson J, Velez M, Wang A, Miyahara Y, Young S & Sarrazin C 2007. Improved COBAS TaqMan hepatitis C virus test (Version 2.0) for use with the High Pure system: enhanced genotype inclusivity and performance characteristics in a multisite study. **J Clin Microbiol**. 45(11): 3595-3600.

Comanor L, Anderson F, Ghany M, Perrillo R, Heathcote EJ, Sherlock C, Zitron I, Hendricks D & Gordon SC 2001. Transcription-mediated amplification is more sensitive than conventional PCR-based assays for detecting residual serum HCV RNA at end of treatment. **Am J Gastroenterol**. 96(10): 2968-2972.

Conte VP 2000. [Chronic viral hepatitis C. Part 1. General considerations]. **Arq Gastroenterol**. 37(3): 187-194.

Cox AL, Netski DM, Mosbrugger T, Sherman SG, Strathdee S, Ompad D, Vlahov D, Chien D, Shyamala V, Ray SC & Thomas DL 2005. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. **Clin Infect Dis**. 40(7): 951-958.

Cox AL, Page K, Bruneau J, Shoukry NH, Lauer GM, Kim AY, Rosen HR, Radziewicz H, Grakoui A, Fierer DS, Branch AD, Kaplan DE & Chang KM 2009. Rare birds in North America: acute hepatitis C cohorts. **Gastroenterology**. 136(1): 26-31.

Davis GL 2002. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. **Hepatology**. 36(5 Suppl 1): S145-151.

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhaes M, Brandao-Mello CE, de Oliveira RV, do Espirito-Santo MP, Yoshida CF & Lampe E 2009. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. **Hepatogastroenterology**. 56(90): 429-436.

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhaes M, Brandao-Mello CE, de Oliveira RV, Yoshida CF & Lampe E 2007. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. **Hepatogastroenterology**. 54(75): 964-968.

De Cock L & Vranckx R 2003. Serotyping and genotyping of hepatitis C virus in Belgium. **Infection**. 31(2): 92-97.

de Oliveira GM, Camargo FT, Goncalves EC, Duarte CV & Guimaraes CA 2010. Systematic review of diagnostic tests accuracy: a narrative review. **Rev Col Bras Cir**. 37(2): 153-156.

Desombere I, Van Vlierberghe H, Couvent S, Clinckspoor F & Leroux-Roels G 2005. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. **J Clin Microbiol**. 43(6): 2590-2597.

Drexler JF, Kupfer B, Petersen N, Grotto RM, Rodrigues SM, Grywna K, Panning M, Annan A, Silva GF, Douglas J, Koay ES, Smuts H, Netto EM, Simmonds P, Pardini MI, Roth WK & Drosten C 2009. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. **PLoS Med**. 6(2): e31.

Drummer HE & McKeating JA 2011. Hepatitis C Virus Glycoprotein-dependent Entry. In: Hepatitis C - Antiviral Drug Discovery and Development. S-L Tan and H Yupeng. Norfolk, UK, Caister Academic Press: 321-344.

Dubuisson J, Helle F & Cocquerel L 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cell Microbiol**. 10(4): 821-827.

EASL 2011. European Association for the Study of the Liver. Management of hepatitis C virus infection. **J Hepatol**. 55: 245-264.

Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Sugiyama M, Khan A, Ali EM, Mouhamed L, Abou el-fetouh S, AbdEl-Hameed AR & Mizokami M 2010. Performance of two Real-Time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA: evaluation on HCV genotypes 1-4. **J Med Virol**. 82(11): 1878-1888.

Erensoy S 2001. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. **J Clin Virol**. 21(3): 271-281.

Espírito-Santo MP, Carneiro MA, Reis NR, Kozłowski AG, Teles SA, Lampe E, Yoshida CF & Martins RM 2007. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. **Braz J Med Biol Res.** 40(4): 545-550.

Fabrizi F, Messa P & Martin P 2008. Transmission of hepatitis C virus infection in hemodialysis: current concepts. **Int J Artif Organs.** 31(12): 1004-1016.

Fagundes GD, Bonazza V, Ceretta LB, Back AJ & Bettiol J 2008. Detection of the Hepatitis C virus in a population of adults. **Rev Lat Am Enfermagem.** 16(3): 396-400.

Fanning L, Kenny-Walsh E, Levis J, Choudhury KR, Cannon B, Sheehan M, Whelton M & Shanahan F 2000. Natural fluctuations of hepatitis C viral load in a homogeneous patient population: a prospective study. **Hepatology.** 31(1): 225-229.

Farquhar MJ, Hu K, Harris HJ, Davis C, Brimacombe CL, Fletcher SJ, Baumert TF, Rappoport JZ, Balfe P & McKeating JA 2012. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. **J Virol.** 86(8): 4305-4316.

Ferreira A de S, Perez R de M, Ferraz ML, Lewis-Ximenez LL, Pereira JL, de Almeida PR & de Mattos AA 2011. Acute hepatitis C in Brazil: results of a national survey. **J Med Virol.** 83(10): 1738-1743.

Flint M, Quinn ER & Levy S 2001. In search of hepatitis C virus receptor(s). **Clin Liver Dis.** 5(4): 873-893.

Forns X & Costa J 2006. HCV virological assessment. **J Hepatol.** 44(1 Suppl): S35-39.

Friebe P & Bartenschlager R 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. **J Virol.** 76(11): 5326-5338.

Gal-Tanamy M, Keck ZY, Yi M, McKeating JA, Patel AH, Fong SK & Lemon SM 2008. In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. **Proc Natl Acad Sci USA.** 105(49): 19450-19455.

Garson JA, Ring C, Tuke P & Tedder RS 1990. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet.** 336(8719): 878-879.

GBD 2004. Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C Working Group. **J Clin Pharmacol.** 44(1): 20-29.

Gerken G, Rothaar T, Rumi MG, Soffredini R, Trippler M, Blunk MJ, Butcher A, Soviero S & Colucci G 2000. Performance of the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test, version 2.0, an automated reverse transcription-PCR quantitative system for hepatitis C virus load determination. **J Clin Microbiol.** 38(6): 2210-2214.

Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechtler M, Backmund M & Pape GR 2003. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. **Gastroenterology.** 125(1): 80-88.

Germer JJ, Harmsen WS, Mandrekar JN, Mitchell PS & Yao JD 2005. Evaluation of the COBAS TaqMan HCV test with automated sample processing using the MagNA pure LC instrument. **J Clin Microbiol.** 43(1): 293-298.

Germer JJ & Zein NN 2001. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. **Mayo Clin Proc.** 76(9): 911-920.

Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, Ferrari A, Pistis R, Sebastiani G, Faggioli S, Realdon S & Alberti A 2006. Hepatitis C minimal residual viremia (MRV) detected by TMA at the end of Peg-IFN plus ribavirin therapy predicts post-treatment relapse. **J Hepatol.** 44(1): 83-87.

Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL & Seeff LB 2011. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology.** 54(4): 1433-1444.

Giannini C & Brechot C 2003. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ.** 10 Suppl 1: S27-38.

Gonzalez ME & Carrasco L 2003. Viroproins. **FEBS Lett.** 552(1): 28-34.

Grebely J, Matthews GV & Dore GJ 2011. Treatment of acute HCV infection. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** 8(5): 265-274.

Gretch D, Lee W & Corey L 1992. Use of aminotransferase, hepatitis C antibody, and hepatitis C polymerase chain reaction RNA assays to establish the diagnosis of hepatitis C virus infection in a diagnostic virology laboratory. **J Clin Microbiol.** 30(8): 2145-2149.

Gretch DR 1997. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology.** 26(3 Suppl 1): 43S-47S.

Gretton SN, Taylor AI & McLauchlan J 2005. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. **J Gen Virol.** 86(Pt 5): 1415-1421.

Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP & Rowlands DJ 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett.** 535(1-3): 34-38.

Guobuzaitė A, Chokshi S, Balciuniene L, Voinic A, Stikleryte A, Zagminas K, Ambrozaitis A & Naoumov N 2008. Viral clearance or persistence after acute hepatitis C infection: interim results from a prospective study. **Medicina (Kaunas).** 44(7): 510-520.

Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, Khiri H & Ouzan D 2006. Real-time PCR assays for hepatitis C virus (HCV) RNA quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. **J Clin Microbiol.** 44(7): 2507-2511.

Harrington PR, Zeng W & Naeger LK 2012. Clinical relevance of detectable but not quantifiable hepatitis C virus RNA during boceprevir or telaprevir treatment. **Hepatology.** 55(4): 1048-1057.

Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, Hu K, Yuan F, Deng H, Hubscher SG, Han JH, Balfe P & McKeating JA 2008. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. **J Virol.** 82(10): 5007-5020.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM 1996. Real time quantitative PCR. **Genome Res.** 6(10): 986-994.

Helle F & Dubuisson J 2008. Hepatitis C virus entry into host cells. **Cell Mol Life Sci.** 65(1): 100-112.

Hennig H, Schlenke P, Kirchner H, Bauer I, Schulte-Kellinghaus B & Bludau H 2000. Evaluation of newly developed microparticle enzyme immunoassays for the detection of HCV antibodies. **J Virol Methods.** 84(2): 181-190.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS & Griffith R 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y).** 10(4): 413-417.

Hofer H, Watkins-Riedel T, Janata O, Penner E, Holzmann H, Steindl-Munda P, Gangl A & Ferenci P 2003. Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. **Hepatology.** 37(1): 60-64.

Holland PM, Abramson RD, Watson R & Gelfand DH 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci USA**. 88(16): 7276-7280.

Houghton M 2009. Discovery of the hepatitis C virus. **Liver Int**. 29 Suppl 1: 82-88.

Huang WS, Lu SN, Wang JH, Lee CM, Tung HD, Chen TM & ChangChien CS 2005. Prediction of viremia for cases of hepatitis C virus (HCV) infection using a third-generation anti-HCV enzyme immunoassay test. **Hepatogastroenterology**. 52(63): 893-896.

Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS & Zeuzem S 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**. 364(25): 2405-2416.

Jardim AC, Yamasaki LH, de Queiroz AT, Bittar C, Pinho JR, Carareto CM, Rahal P & Mello IM 2009. Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with peginterferon and ribavirin. **Infect Genet Evol**. 9(4): 689-698.

Jensen TB, Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, Eugen-Olsen J & Bukh J 2008. Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. **J Infect Dis**. 198(12): 1756-1765.

Jo J, Lohmann V, Bartenschlager R & Thimme R 2011. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. **J Gen Virol**. 92(Pt 3): 477-493.

Johansson MK 2006. Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. **Methods Mol Biol**. 335: 17-29.

Kacian DL & Fultz TJ 1995. Nucleic acid sequence amplification methods. European Patent EP 0 408 295. USA.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S & Kohara M 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol**. 75 (Pt 7): 1755-1760.

Kamal SM 2008. Acute hepatitis C: a systematic review. **Am J Gastroenterol**. 103(5): 1283-1297; quiz 1298.

Kato N 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta Med Okayama**. 55(3): 133-159.

Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M & Wakita T 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. **Gastroenterology**. 125(6): 1808-1817.

Kobayashi Y, Watanabe S, Konishi M, Yokoi M, Kakehashi R, Kaito M, Kondo M, Hayashi Y, Jomori T & Suzuki S 1993. Quantitation and typing of serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-beta. **Hepatology**. 18(6): 1319-1325.

Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Sodoyer M, Chevallier P, Mandrand B, Lotteau V & Andre P 2001. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. **J Virol Methods**. 95(1-2): 111-119.

Komurian-Pradel F, Perret M, Deiman B, Sodoyer M, Lotteau V, Paranhos-Baccala G & Andre P 2004. Strand specific quantitative real-time PCR to study replication of hepatitis C virus genome. **J Virol Methods**. 116(1): 103-106.

Krajden M, Ziermann R, Khan A, Mak A, Leung K, Hendricks D & Comanor L 2002. Qualitative detection of hepatitis C virus RNA: comparison of analytical sensitivity, clinical performance, and workflow of the Cobas Amplicor HCV Test version 2.0 and the HCV RNA transcription-mediated amplification qualitative assay. **J Clin Microbiol**. 40(8): 2903-2907.

Kuiken C & Simmonds P 2009. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. In: *Hepatitis C: Methods and Protocols*. H Tang. Los Alamos - USA, Methods Mol Biol. 510: 33-53.

Lambert N 2007. Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis. **Dev Biol (Basel)**. 127: 113-121.

Lampe E, De Almeida AJ, Oliveira RV, Mello CEB, Magalhães MC & Yoshida CF 2002. Phylogenetic characterization of genotype 4 hepatitis c virus isolate from Brazil. **Virus Rev Res**. 108.

Lange C & Sarrazin C 2010. Diagnostic tests in acute and chronic hepatitis C. In: *Hepatology 2010 - A clinical text book*. S Mauss, T Berg, J Rockstroh, C Sarrazin and H Wedemeyer, Flying Publisher: 515.

Laperche S, Bouchardeau F, Andre-Garnier E, Thibault V, Roque-Afonso AM, Trimoulet P, Colimon R, Duverlie G, Leguillou-Guillemette H, Lunel F, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM, Henquell C, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Chaix ML, Branger M, Gaudy-Graffin C, Rosenberg AR, Pozzetto B, Vallet S, Baazia Y, Izopet J & Lefrere JJ 2011. Interpretation of real-time PCR results for hepatitis C virus RNA when viral load is below quantification limits. **J Clin Microbiol**. 49(3): 1113-1115.

Lauer GM & Walker BD 2001. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.** 345(1): 41-52.

Lauring AS & Andino R 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. **PLoS Pathog.** 6(7): e1001005.

Lavanchy D 2009. The global burden of hepatitis C. **Liver Int.** 29 Suppl 1: 74-81.

Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM & Burton DR 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. **Nat Med.** 14(1): 25-27.

Lee SC, Antony A, Lee N, Leibow J, Yang JQ, Soviero S, Gutekunst K & Rosenstraus M 2000. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. **J Clin Microbiol.** 38(11): 4171-4179.

Lee SH 1993. The 3'-5' exonuclease of human DNA polymerase delta (pol delta) is regulated by pol delta accessory factors and deoxyribonucleoside triphosphates. **Nucleic Acids Res.** 21(8): 1935-1939.

Lefrere JJ, Guiramand S, Lefrere F, Mariotti M, Aumont P, Lerable J, Petit JC, Girot R & Morand-Joubert L 1997. Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. **J Infect Dis.** 175(2): 316-322.

Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, De Bortholi Santos E, Mitre HP, De Mendonca JS, De Paula Cavaleiro N, Barone AA & Wendel S 2002. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. **J Clin Microbiol.** 40(7): 2645-2647.

Lewis-Ximenez LL, Lauer GM, Schulze Zur Wiesch J, de Sousa PS, Ginuino CF, Paranhos-Baccala G, Ulmer H, Pfeiffer KP, Goebel G, Pereira JL, Mendes de Oliveira J, Yoshida CF, Lampe E, Velloso CE, Alves Pinto M, Coelho HS, Almeida AJ, Fernandes CA, Kim AY & Strasak AM 2010. Prospective follow-up of patients with acute hepatitis C virus infection in Brazil. **Clin Infect Dis.** 50(9): 1222-1230.

Liapakis A & Jacobson I 2011. Telaprevir user's guide. **Clin Liver Dis.** 15(3): 555-571.

Limaye AR, Draganov PV & Cabrera R 2011. Boceprevir for chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med.** 365(2): 176; author reply 177-178.

Lindenbach BD & Rice CM 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**. 436(7053): 933-938.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W & Deetz K 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl**. 4(6): 357-362.

Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS & Ffrench RA 2007. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunol Cell Biol**. 85(1): 24-32.

Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM & McKeating JA 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. **Proc Natl Acad Sci USA**. 101(27): 10149-10154.

Loomba R, Rivera MM, McBurney R, Park Y, Haynes-Williams V, Rehermann B, Alter HJ, Herrine SK, Liang TJ, Hoofnagle JH & Heller T 2011. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. **Aliment Pharmacol Ther**. 33(5): 559-565.

Lopes CL, Teles SA, Espirito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro AR, Marinho TA, Reis NR, Silva AM & Martins RM 2009. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Rev Saude Publica**. 43 Suppl 1: 43-50.

Lu SN, Tung HD, Chen TM, Lee CM, Wang JH, Hung CH, Chen CH & Changchien CS 2004. Is it possible to diagnose acute hepatitis C virus (HCV) infection by a rising anti-HCV titre rather than by seroconversion? **J Viral Hepat**. 11(6): 563-570.

Maertens C & Stuyver L 1997. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: *The molecular medicine of viral hepatitis*. TJ Harrison and AJ Zuckerman. Chichester, England., John Wiley & Sons, Ltd.: 182-233.

Maertens G, Dekeyser F, Van Geel A, Sablon E, Bosman F, Zrein M & Pollet D 1999. Confirmation of HCV Antibodies by the Line Immunoassay INNO-LIA HCV Ab III. **Methods Mol Med**. 19: 11-25.

Maheshwari A, Ray S & Thuluvath PJ 2008. Acute hepatitis C. **Lancet**. 372(9635): 321-332.

Martinez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Sola R, Vergara M, Fabregas S, Vega R, Salmeron J, Diago M, Sanchez-Tapias JM & Bruguera M 2008. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. **J Hepatol**. 48(1): 20-27.

Martins PP 2010. Avaliação de metodologias moleculares para detecção e quantificação do vírus da hepatite C. [Dissertação de Mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro/BR. Medicina Tropical/IOC/Fiocruz: 1-73.

Matsuura K, Tanaka Y, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Kurbanov F, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T & Mizokami M 2009. Abbott RealTime hepatitis C virus (HCV) and Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV assays for prediction of sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C patients. **J Clin Microbiol.** 47(2): 385-389.

McGovern BH, Birch CE, Bowen MJ, Reyor LL, Nagami EH, Chung RT & Kim AY 2009. Improving the diagnosis of acute hepatitis C virus infection with expanded viral load criteria. **Clin Infect Dis.** 49(7): 1051-1060.

McGovern BH, Wurcel A, Kim AY, Schulze zur Wiesch J, Bica I, Zaman MT, Timm J, Walker BD & Lauer GM 2006. Acute hepatitis C virus infection in incarcerated injection drug users. **Clin Infect Dis.** 42(12): 1663-1670.

Messick K, Sanders JC, Goedert JJ & Eyster ME 2001. Hepatitis C viral clearance and antibody reactivity patterns in persons with haemophilia and other congenital bleeding disorders. **Haemophilia.** 7(6): 568-574.

Micallef JM, Kaldor JM & Dore GJ 2006. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. **J Viral Hepat.** 13(1): 34-41.

Ministério da Saúde 1993. Brasil. Portaria nº 1.376 de 19 de Novembro de 1993. Acessado em: 17/02/2012. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1376-93.pdf>

Ministério da Saúde 2002. Brasil. Portaria nº 1407/GM de 01/08/2002. Acessado em: 23/02/2012. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1407_02.htm

Ministério da Saúde 2010. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Brasília: 295.

Ministério da Saúde 2011. Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Acessado em: 22/02/2012. Disponível em: http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo_clinico_e_diretrizes_terapeuticas_para_hepatite_viral_c_e_coinfeccoes

Moller JM & Krarup HB 2003. Diagnosis of acute hepatitis C: anti-HCV or HCV-RNA? **Scand J Gastroenterol.** 38(5): 556-558.

- Mondelli MU, Cerino A, Bono F, Cividini A, Maccabruni A, Arico M, Malfitano A, Barbarini G, Piazza V, Minoli L & et al. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotypes in chronic HCV infection. **J Clin Microbiol.** 32(10): 2523-2527.
- Moradpour D, Penin F & Rice CM 2007. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol.** 5(6): 453-463.
- Morishima C, Morgan TR, Everhart JE, Wright EC, Apodaca MC, Gretch DR, Shiffman ML, Everson GT, Lindsay KL, Lee WM, Lok AS, Dienstag JL, Ghany MG & Curto TM 2008. Interpretation of positive transcription-mediated amplification test results from polymerase chain reaction-negative samples obtained after treatment of chronic hepatitis C. **Hepatology.** 48(5): 1412-1419.
- Murphy D, Chamberland J, Dandavino R & Sablon E 2007. A new genotype of hepatitis C virus originating from Central Africa. **Hepatology.** 46(4 Suppl 1): 623^A.
- Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, Gao FX, Xia G, McQuillan G & Margolis HS 2006. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. **Gastroenterology.** 131(2): 478-484.
- Nakao F, Enomoto H, Takada M, Takada A & Date T 1991. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. **J Gen Virol.**(72): 2105-2112.
- Nelson NC, Cheikh AB, Matsuda E & Becker MM 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. **Biochemistry.** 35(25): 8429-8438.
- Netski DM, Mosbrugger T, Depla E, Maertens G, Ray SC, Hamilton RG, Roundtree S, Thomas DL, McKeating J & Cox A 2005. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. **Clin Infect Dis.** 41(5): 667-675.
- NIH 2002. National Institutes of Health. Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. **NIH Consens State Sci Statements.** 19(3): 1-46.
- Nikolaeva LI, Blokhina NP, Tsurikova NN, Voronkova NV, Miminoshvili MI, Braginsky DM, Yastrebova ON, Boynitskaya OB, Isaeva OV, Michailov MI & Archakov AI 2002. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. **J Viral Hepat.** 9(6): 429-437.
- Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y & et al. 1992. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. **J Gen Virol.** 73 (Pt 3): 673-679.

Page K, Hahn JA, Evans J, Shiboski S, Lum P, Delwart E, Tobler L, Andrews W, Avanesyan L, Cooper S & Busch MP 2009. Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. **J Infect Dis.** 200(8): 1216-1226.

Paltanin LF & Reiche EM 2002. Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. **Rev Saude Publica.** 36(4): 393-399.

Pawlotsky JM 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology.** 36(5 Suppl 1): S65-73.

Pawlotsky JM 2009. EASL Clinical Practice Guidelines. **J Hepatol.** 50(2): 243.

Pawlotsky JM 2010. More sensitive hepatitis C virus RNA detection: what for? **J Hepatol.** 52(6): 783-785.

Pawlotsky JM 2011. The results of Phase III clinical trials with telaprevir and boceprevir presented at the Liver Meeting 2010: a new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. **Gastroenterology.** 140(3): 746-754.

Pawlotsky JM, Chevaliez S & McHutchison JG 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology.** 132(5): 1979-1998.

Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R & Moradpour D 2004a. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem.** 279(39): 40835-40843.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D & Pawlotsky JM 2004b. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology.** 39(1): 5-19.

Perz JF, Farrington LA, Pecoraro C, Hutin YJF & Armstrong GL 2004. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. In: 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. Boston, US, Infectious Diseases Society of America. Abstract.

Pineda JA, Caruz A, Rivero A, Neukam K, Salas I, Camacho A, Palomares JC, Mira JA, Martinez A, Roldan C, de la Torre J & Macias J 2010. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. **Clin Infect Dis.** 51(7): 788-795.

Ploss A, Khetani SR, Jones CT, Syder AJ, Trehan K, Gaysinskaya VA, Mu K, Ritola K, Rice CM & Bhatia SN 2010. Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. **Proc Natl Acad Sci USA.** 107(7): 3141-3145.

Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, Calle V, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR & Calmus Y 2010. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. **Gastroenterology**. 139(4): 1355-1364.

Poordad F & Khungar V 2011. Emerging therapeutic options in hepatitis C virus infection. **Am J Manag Care**. 17 Suppl 4: S123-130.

Rakela J, Radkowski M, Tomasz L, Wilkinson J, Adair D, Nowicki M & Kovacs A 2003. Perinatal transmission of HCV from HCV/HIV coinfecting mothers to infants: likely role of extrahepatic replication and delayed/absent seroconversion in children. **Hepatology**. 38 suppl 1: 351A.

Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM & Cameron CE 2010. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. **J Biol Chem**. 285(30): 22725-22731.

Ranjith-Kumar CT & Kao CC 2006. Biochemical activities of the HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. In: Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology. SL Tan. Norfolk (UK).

Rehermann B 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. **J Clin Invest**. 119(7): 1745-1754.

Renda MC, Ruggeri RF, Piazza A, Fecarotta E, Renda D, Pantalone GR, Madonia S, Cottone M & Maggio A 2011. Marked impact of IL28B genotype in the natural clearance of hepatitis C virus in patients with haemoglobinopathies. **Br J Haematol**. 154(5): 659-661.

Ribeiro LS, Coelho AM, Padua AFM, Dias LL, Azevedo DC, Moura FM, Mendes GS, Miranda HCT & Proietti FA 2007. Fibromialgia e infecção crônica pelo vírus da hepatite C: ausência de associação em duas amostras **Rev. Bras. Reumatol**. 47(2).

Richter SS 2002. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. **J Clin Microbiol**. 40(12): 4407-4412.

ROCHE 2012. COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0 for use with the High Pure System
Acessado em: 08/03/2012. Disponível em:
<http://molecular.roche.com/ASSAYS/Pages/COBASTaqManHCVTestv20HPS.aspx>

Rong L & Perelson AS 2010. Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling. **Crit Rev Immunol**. 30(2): 131-148.

Sabahi A 2009. Hepatitis C virus entry: the early steps in the viral replication cycle. **J Virol.** 6: 117.

Sabato MF, Shiffman ML, Langley MR, Wilkinson DS & Ferreira-Gonzalez A 2007. Comparison of performance characteristics of three real-time reverse transcription-PCR test systems for detection and quantification of hepatitis C virus. **J Clin Microbiol.** 45(8): 2529-2536.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH & Bukh J 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci USA.** 100(20): 11646-11651.

Saldanha J, Heath A, Aberham C, Albrecht J, Gentili G, Gessner M & Pisani G 2005. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. **Vox Sang.** 88(3): 202-204.

Santantonio T, Medda E, Ferrari C, Fabris P, Cariti G, Massari M, Babudieri S, Toti M, Francavilla R, Ancarani F, Antonucci G, Scotto G, Di Marco V, Pastore G & Stroffolini T 2006. Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy. **Clin Infect Dis.** 43(9): 1154-1159.

Santantonio T, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, Gentile A, Leandro G & Pastore G 2003. Natural course of acute hepatitis C: a long-term prospective study. **Dig Liver Dis.** 35(2): 104-113.

Santantonio T, Wiegand J & Gerlach JT 2008. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. **J Hepatol.** 49(4): 625-633.

Santos CF, Sakai VT, Machado MA, Schippers DN & Greene AS 2004. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **J Appl Oral Sci.** 12(1): 1-11.

Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, Babel R, Mihm U, Hofmann WP, von Wagner M & Zeuzem S 2006. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. **J Clin Microbiol.** 44(3): 729-737.

Sarrazin C, Hezode C, Zeuzem S & Pawlotsky JM 2012. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. **J Hepatol.** 56 Suppl: S88-S100.

Sarrazin C, Teuber G, Kokka R, Rabenau H & Zeuzem S 2000. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. **Hepatology.** 32(4 Pt 1): 818-823.

Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J & Bukh J 2008. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. **Proc Natl Acad Sci USA**. 105(3): 997-1002.

Schiff ER 2011. Diagnosing and treating hepatitis C virus infection. **Am J Manag Care**. 17 Suppl 4: S108-115.

Scott JD & Gretch DR 2007. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. **JAMA**. 297(7): 724-732.

Seeger C 2005. Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. **Trends Microbiol**. 13(11): 528-534.

Sharaf Eldin N, Ismail S, Mansour H, Rekacewicz C, El-Houssinie M, El-Kafrawy S, El Aidi S, Abdel-Hamid M, Esmat G, Pol S, Fontanet A & Mohamed MK 2008. Symptomatic acute hepatitis C in Egypt: diagnosis, spontaneous viral clearance, and delayed treatment with 12 weeks of pegylated interferon alfa-2a. **PLoS ONE**. 3(12): e4085.

Shata MT, Tricoche N, Perkus M, Tom D, Brotman B, McCormack P, Pfahler W, Lee DH, Tobler LH, Busch M & Prince AM 2003. Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees. **Virology**. 314(2): 601-616.

Shepard CW, Finelli L & Alter MJ 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**. 5(9): 558-567.

Sherman KE, Rouster SD & Horn PS 2002. Comparison of methodologies for quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**. 35(4): 482-487.

Shiffman ML, Ferreira-Gonzalez A, Reddy KR, Sterling RK, Luketic VA, Stravitz RT, Sanyal AJ, Garrett CT, De Medina M & Schiff ER 2003. Comparison of three commercially available assays for HCV RNA using the international unit standard: implications for management of patients with chronic hepatitis C virus infection in clinical practice. **Am J Gastroenterol**. 98(5): 1159-1166.

SIEMENS 2012. Transcription Mediated Amplification (TMA) Component System - Features & Benefits. Acessado em. Disponível em:
http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q_cataloId~e_-111~a_catTree~e_100001,1023070,1015865~a_langId~e_-111~a_productId~e_172984~a_storeId~e_10001~a_view~e_128.htm

Silva CM, Costi C, Krug LP, Ramos AB, Grandi T & Gandolfi VL 2007. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 102(7): 867-870.

Simmonds P 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus -- 15 years on. **J Gen Virol.** 85(Pt 11): 3173-3188.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ & Widell A 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology.** 42(4): 962-973.

Sklan EH, Charuworn P, Pang PS & Glenn JS 2009. Mechanisms of HCV survival in the host. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** 6(4): 217-227.

Smith DB, Davidson F, Yap P, Brown H, Kolberg J, Detmer J, Urdea M, Simmonds P & International HCVC 1996. Levels of hepatitis C virus in blood donors infected with different viral genotypes. International HCV Collaborative Study Group. **J Infect Dis.** 173(3): 727-730.

Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL & Simmonds P 1995. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. **J Gen Virol.** 76 (Pt 7): 1749-1761.

Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL & Simmonds P 1997. The origin of hepatitis C virus genotypes. **J Gen Virol.** 78 (Pt 2): 321-328.

Spada E, Mele A, Ciccozzi M, Tosti ME, Bianco E, Szklo A, Ragni P, Gallo G, Balocchini E, Sangalli M, Lopalco PL, Moiraghi A & Stroffolini T 2001. Changing epidemiology of parenterally transmitted viral hepatitis: results from the hepatitis surveillance system in Italy. **Dig Liver Dis.** 33(9): 778-784.

Strasak AM, Kim AY, Lauer GM, de Sousa PS, Ginuino CF, Fernandes CA, Velloso CE, de Almeida AJ, de Oliveira JM, Yoshida CF, Schulze zur Wiesch J, Paranhos-Baccala G, Lang S, Brant LJ, Ulmer H, Strohmaier S, Kaltenbach L, Lampe E & Lewis-Ximenez LL 2011. Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. **BMC Infect Dis.** 11: 15.

Strauss E 2001. Hepatitis C. **Rev Soc Bras Med Trop.** 34(1): 69-82.

Sy T & Jamal MM 2006. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci.** 3(2): 41-46.

- Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP & Rehermann B 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. **Nat Med.** 6(5): 578-582.
- Thadani A, Harley J, Rubin J & Lebovics E 2012. Clinical significance of discordant positive hepatitis C virus transcription-mediated amplification following end of treatment response. **Dig Dis Sci.** 57(1): 239-242.
- Thomas DL & Seeff LB 2005. Natural history of hepatitis C. **Clin Liver Dis.** 9(3): 383-398, vi.
- Timm J & Roggendorf M 2007. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. **World J Gastroenterol.** 13(36): 4808-4817.
- Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P & McKeating JA 2008. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. **Hepatology.** 47(1): 17-24.
- Tobler L, Lee SR & Busch MP 1993. Performance of hepatitis C virus (HCV) second-generation enzyme immunoassay (EIA) on blood samples that reacted in the first-generation HCV EIA. **Transfusion.** 33(3): 271-272.
- Tuke PW, Grant PR, Waite J, Kitchen AD, Eglin RP & Tedder RS 2008. Hepatitis C virus window-phase infections: closing the window on hepatitis C virus. **Transfusion.** 48(4): 594-600.
- Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H & Vermylen C 1994. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. **Vox Sang.** 66(2): 122-129.
- Valente VB, Covas DT & Passos AD 2005. Hepatitis B and C serologic markers in blood donors of the Ribeirao Preto Blood Center. **Rev Soc Bras Med Trop.** 38(6): 488-492.
- Vermehren J, Kau A, Gartner BC, Gobel R, Zeuzem S & Sarrazin C 2008. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. **J Clin Microbiol.** 46(12): 3880-3891.
- Vieyres G, Dubuisson J & Patel AH 2011. Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein. **J Gen Virol.** 92(Pt 3): 494-506.

Wakita T & Kato T 2006. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. SL Tan. Norfolk (UK).

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R & Liang TJ 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med.** 11(7): 791-796.

Wang CC, Krantz E, Klarquist J, Krows M, McBride L, Scott EP, Shaw-Stiffel T, Weston SJ, Thiede H, Wald A & Rosen HR 2007. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. **J Infect Dis.** 196(10): 1474-1482.

Wasley A & Alter MJ 2000. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis.** 20(1): 1-16.

Watzinger F, Ebner K & Lion T 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Mol Aspects Med.** 27(2-3): 254-298.

WHO 2012. World Health Organization. Hepatitis C - Global alert and response (GAR). Immune prophylaxis. Acessado em: 17/02/2012. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index4.html#immune>

Widell A, Shev S, Mansson S, Zhang YY, Foberg U, Norkrans G, Fryden A, Weiland O, Kurkus J & Nordenfelt E 1994. Genotyping of hepatitis C virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological applications. **J Med Virol.** 44(3): 272-279.

Williams M 2004. A return to the fundamentals of drug discovery? **Curr Opin Investig Drugs.** 5(1): 29-33.

Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM & Patel AH 2009. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. **J Gen Virol.** 90(Pt 1): 48-58.

Woerz I, Lohmann V & Bartenschlager R 2009. Hepatitis C virus replicons: dinosaurs still in business? **J Viral Hepat.** 16: 1-9.

Wolfe L, Tamatsukuri S, Sayada C & Ryff J 1994. Detection of HCV RNA in serum using a single-tube enzyme PCR in combination with a colorimetric microwell assay. In: Hepatitis C virus: new diagnostic tools. GEMHEP. França, John Libbey Eurotext 83-94.

Wong T & Lee SS 2006. Hepatitis C: a review for primary care physicians. **CMAJ**. 174(5): 649-659.

Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL & Hao LJ 2000. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. **World J Gastroenterol**. 6(6): 805-811.

Yen T, Keeffe EB & Ahmed A 2003. The epidemiology of hepatitis C virus infection. **J Clin Gastroenterol**. 36(1): 47-53.

Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G & Lelie PN 1993. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet**. 341(8847): 722-724.

Zein NN 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin Microbiol Rev**. 13(2): 223-235.

Zeremski M, Shu MA, Brown Q, Wu Y, Des Jarlais DC, Busch MP, Talal AH & Edlin BR 2009. Hepatitis C virus-specific T-cell immune responses in seronegative injection drug users. **J Viral Hepat**. 16(1): 10-20.

Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Huppe D, Zehnter E & Manns MP 2009. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**. 16(2): 75-90.

Zeuzem S, Ruster B & Roth WK 1994. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay (Amplicor HCV) for detection of hepatitis C virus. **Z Gastroenterol**. 32(6): 342-347.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa da Fiocruz

Rio de Janeiro, 18 de maio de 2010.

PARECER

Título do Projeto: "Fase Aguda de Infecção pelo Vírus da Hepatite C Avaliação da Resposta Imunológica Celular e Humoral"

Protocolo CEP: 142/01

Registro CONEP: 2830

Pesquisadora Responsável: Lia Laura Lewis Ximenez de Sousa Rodrigues

Instituição: IOC/VIROLOGIA

Foi submetida à apreciação do CEP/FIOCRUZ, relatório parcial ao projeto supra-mencionado.

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

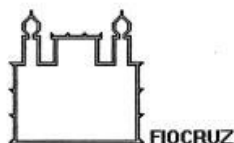
Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

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



Patrícia Torres Bozza
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Departamento de Virologia
Laboratório de Hepatites Virais
Centro de Referência Nacional para Hepatites Virais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Centro de Referência Nacional para Hepatites Virais/Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz
Projeto de Pesquisa: Fase aguda de infecção pelo vírus da hepatite C e avaliação da sua resposta imunológica celular e humoral.
Pesquisadores: Dra Lia Laura Lewis Ximenez e Dr. Marcelo Alves Pinto.

Eu _____

fui convidado(a) a participar de um estudo que irá investigar os processos imunológicos envolvidos na infecção pelo do vírus da hepatite C, ou seja, de que maneira o meu sistema de defesa age durante esta infecção. Para isso eu preciso consentir em doar cerca de 60 ml (12 colheres de chá) do meu sangue e será separado e levado para o laboratório de hepatites virais do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ para pesquisar a presença do vírus da hepatite C e estudar os meus mecanismos de defesa contra este vírus. O meu sangue será coletado por punção venosa por um técnico especializado. Estou sendo informado(a) que posso não ter benefício imediato dos resultados desta pesquisa, mas este trabalho pode esclarecer problemas relacionados a forma crônica da hepatite C. Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou rouidão no local. É possível que novas amostras sejam necessárias. Fui informado(a) também que posso ser solicitado(a) a retornar em intervalos de 2 a 4 semanas para fornecer

amostras adicionais. Caso seja necessário, serei contatado por um dos integrantes do estudo que irá me perguntar se estou disposto a doar nova amostra de sangue. Estou livre para recusar esta solicitação. A minha participação é voluntária e posso sair do estudo a qualquer momento. Fui informado que caso me torne um portador crônico do vírus da hepatite C serei encaminhado a um ambulatório especializado em hepatologia da rede pública para acompanhamento se eu estiver participando ou não do projeto. Para participar deste estudo, fornecerei também aos pesquisadores algumas informações sobre minhas condições sócio-econômicas e fatores de risco associados a transmissão do vírus da hepatite C.

Sei também que amostras do meu sangue serão enviadas, além do laboratório de FIOCRUZ, para as seguintes instituições de pesquisa no exterior:

- Unidade de Doenças Infecciosas da Universidade de Medicina de Harvard (Estados Unidos)
- Laboratório de Biologia Molecular e Celular para Hepatites Virais de Biomerieux (França).

Declaro ter recebido informações a respeito deste estudo e autorizo o Coordenador do projeto a utilizar as amostras do meu sangue para realização de exames para estudar o vírus da hepatite C e a minha resposta imunológica. Resultados laboratoriais referentes ao meu quadro clínico serão fornecidas a mim de maneira confidencial. As informações obtidas dos diferentes

laboratórios desta pesquisa serão para publicação científica com sigilo da minha identidade.

Caso tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato com os pesquisadores relacionados acima: **Pavilhão 108 – Grupo de Atendimento para Hepatites Virais, fone 2598-4438, 2598-4224.**

Assinatura

RG _____

Assinatura do pesquisador responsável

Dra. Lia Laura Lewis-Ximenez

Data: ___/___/___

ANEXO C – Publicações Científicas

Os resultados obtidos nos estudos sorológicos são apresentados na forma de manuscritos, aceitos para publicação em revistas científicas indexadas nas bases de dados PubMed, MEDLINE e ISI Web of Knowledge [v.4.2], e listados a seguir na ordem em que foram citados:

- a) Lewis-Ximenez LL, Lauer GM, Schulze Zur Wiesch J, de Sousa PS, Ginuino CF, Paranhos-Baccala G, Ulmer H, Pfeiffer KP, Goebel G, Pereira JL, Mendes de Oliveira J, Yoshida CF, Lampe E, Velloso CE, Alves Pinto M, Coelho HS, Almeida AJ, Fernandes CA, Kim AY & Strasak AM 2010. Prospective follow-up of patients with acute hepatitis C virus infection in Brazil. **Clin Infect Dis.** 50(9): 1222-1230.

- b) Strasak AM, Kim AY, Lauer GM, de Sousa PS, Ginuino CF, Fernandes CA, Velloso CE, de Almeida AJ, de Oliveira JM, Yoshida CF, Schulze zur Wiesch J, Paranhos-Baccala G, Lang S, Brant LJ, Ulmer H, Strohmaier S, Kaltenbach L, Lampe E & Lewis-Ximenez LL 2011. Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. **BMC Infect Dis.** 11: 15.

Prospective Follow-Up of Patients with Acute Hepatitis C Virus Infection in Brazil

Lia L. Lewis-Ximenez,¹ Georg M. Lauer,⁷ Julian Schulze zur Wiesch,⁹ Paulo Sergio Fonseca de Sousa,¹ Cleber F. Ginuino,¹ Gláucia Paranhos-Baccalá,¹⁰ Hanno Ulmer,¹¹ Karl P. Pfeiffer,¹¹ Georg Goebel,¹¹ João Luiz Pereira,³ Jaqueline Mendes de Oliveira,² Clara Fumiko Tachibana Yoshida,¹ Elisabeth Lampe,¹ Carlos Eduardo Velloso,¹ Marcelo Alves Pinto,² Henrique Sergio Coelho,⁴ Adilson José Almeida,^{1,5} Carlos Augusto Fernandes,⁶ Arthur Y. Kim,⁸ and Alexander M. Strassak¹¹

¹Viral Hepatitis Laboratory and ²Viral Technology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, ³Bonsucesso General Hospital, Hepatology Clinic, ⁴Liver Disease Clinic, Clementino Fraga Filho University Hospital, and ⁵Hematology Unit, Gaffre e and Guinle University Hospital, Federal University of the State of Rio de Janeiro, and ⁶Hepatitis Division, Central Public Health Laboratory Noel Nutels, Rio de Janeiro, Brazil; ⁷Gastrointestinal Unit and ⁸Infectious Disease Division, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston; ⁹Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Germany; ¹⁰Merieux Foundation, Laboratory of Emerging Pathogens and Christoph Merieux Laboratory, Lyon, France; and ¹¹Department of Medical Statistics, Informatics and Health Economics, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria.

Background. The natural outcome of infection with hepatitis C virus (HCV) varies substantially among individuals. However, little is known about host and viral factors associated with a self-limiting or chronic evolution of HCV infection.

Methods. From 1 January 2001 through 31 December 2008, a consecutive series of 65 patients from Rio de Janeiro, Brazil, with a well-documented diagnosis of acute HCV infection, acquired via various routes, were enrolled in this study. Patients were prospectively followed up for a median of 40 months after the estimated date of HCV infection with serial measurements of serum alanine aminotransferase, HCV RNA, and anti-HCV antibodies. Spontaneous viral clearance (SVC) was defined as undetectable levels of HCV RNA in serum, in the absence of treatment, for 3 consecutive HCV polymerase chain reaction tests within the first 6 months of follow-up. Cox proportional hazards regression was used to identify host and viral predictors of SVC.

Results. The cumulative rate of SVC was 44.6% (95% confidence interval, 32.3%–57.5%). Compared with chronic HCV evolution, patients with self-limiting disease had significantly lower peak levels of anti-HCV antibodies (median, 109.0 vs 86.7 optical density–to–cutoff ratio [od/co]; $P < .02$), experienced disease symptoms more frequently (69.4% vs 100%; $P < .001$), and had lower viral load at first clinical presentation (median, 4.3 vs 0.0 log copies; $P < .01$). In multivariate analyses, low peak anti-HCV level (93.5 od/co) was the only independent predictor for SVC; the hazard ratio compared with high anti-HCV levels (≥ 93.5 od/co) was 2.62 (95% confidence interval, 1.11–6.19; $P < .03$).

Conclusion. Our data suggest that low levels of anti-HCV antibodies during the acute phase of HCV infection are independently related to spontaneous viral clearance.

Although hepatitis C virus (HCV) accounts for only a small proportion of cases of clinical acute hepatitis, it is a major cause of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in both developed and developing countries [1–3]. The global prevalence of HCV was

estimated at 3%, with a total of 170 million persons infected worldwide; in the United States, nearly 2% of the population is infected [4–6].

HCV infection may be self-limiting and can spontaneously resolve before proceeding beyond the acute phase or may persist, leading to chronic infection [1–3]. Reported rates of spontaneous HCV resolution from longitudinal studies substantially vary, with estimates ranging from 10% to 60% [4, 7–13]. Approximately 80% of patients with self-limiting hepatitis experience HCV RNA clearance within 3 months of disease onset [14–16]. Persistent viremia beyond 6 months of infection is usually associated with chronic evolution [1, 7, 9, 17]. The mechanisms responsible for the relatively

Received 11 November 2009; accepted 19 January 2010; electronically published 17 March 2010.

Reprints or correspondence: Dr Lia L. Lewis-Ximenez, Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Pavilhão Helió e Peggy Pereira, terreno, sala B09, Av Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil (llalewis.fiocruz@gmail.com).

Clinical Infectious Diseases 2010;50(9):1222–1230

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. 1058-4838/2010/5009-0004\$15.00
DOI: 10.1086/651599

Table 1. Individual Patient Characteristics

This table is available in its entirety in the online version of *Clinical Infectious Diseases*

high rate of chronicity in HCV infection are still poorly understood, although it has been speculated that disease outcome is determined by a complex virus-host interplay in the early phase of infection [18, 19].

Several host and viral factors, including type of exposure, HCV viral load, HCV genotype, sex, ethnicity, age, occurrence of disease symptoms, polymorphisms in the *IL28B* gene, and specific HLA alleles, have been associated with spontaneous viral clearance (SVC) [1–3, 11, 20–23]. However, given (1) widely heterogeneous study populations in previous investigations, (2) small sample sizes due to common difficulties in diagnosis of acute HCV infection, and (3) unstandardized definition of both acute HCV infection and SVC [24], conclusive epidemiologic data on predictors for SVC in acute HCV infection remain sparse.

We present epidemiologic data and clinical characteristics of a cohort of 65 consecutive individuals with a well-defined diagnosis of acute HCV, acquired via various routes, prospectively followed up from the initial phase of disease in Rio de Janeiro, Brazil, from 1 January 2001 through 31 December 2008. We aimed to investigate the rate of SVC and to identify host and viral factors to predict a self-limiting or chronic evolution of HCV infection.

METHODS

Patients and definitions. In January 2001, the Viral Hepatitis Clinic at the Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, together with the Central Public Health Laboratory Noel Nutels, Rio de Janeiro, Brazil, initiated a screening program for the early diagnosis of acute viral hepatitis. Patients referred to the clinic were either symptomatic (ie, jaundice and/or dark urine) with elevated alanine aminotransferase (ALT) levels or were asymptomatic with recent anti-HCV seroconversion. The latter consisted of regular blood donors or individuals with recent unintentional exposure to HCV-infected biological material. Among those who were symptomatic, initial visits included medical evaluation and testing for serologic markers for viral hepatitis A, B, and C and leptospirosis along with ALT. Individuals with elevated ALT levels but no positive serologic test results were tested for hepatitis A virus RNA, hepatitis B virus DNA, and HCV RNA and underwent follow-up tests for all serologic markers to exclude the possibility that they presented during the window period between onset of viremia and seroconversion. Further testing for antibodies (IgM and IgG) against other hepatotropic viruses (cytomegalovirus, herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus, dengue, and hepatitis E virus) was performed. Ab-

dominal ultrasonography was conducted in all patients as a complementary diagnostic tool for possible advanced cases of chronic liver diseases, such as cirrhosis and portal hypertension.

Diagnosis of acute or early HCV infection was based on the following established criteria [23–25]: (1) a positive anti-HCV antibody test result or HCV RNA polymerase chain reaction (PCR) assay result in a participant with a documented negative anti-HCV test result within the past year or (2) a positive anti-HCV assay result in a participant with clinical hepatitis, detectable serum HCV RNA, a serum ALT level 10 times the upper limit of normal (32 U/L), and negative results of tests for hepatitis B surface antigen and hepatitis A IgM antibody or, in the absence of detectable HCV RNA, a history of high-risk exposure between 1 and 3 months before clinical manifestation in HCV-seropositive patients. High-risk exposure was defined as medical (surgical interventions, any endoscopic procedures, being in health units with intravenous access) or dental procedures, paraphernalia sharing among drug users, tattooing, and piercing.

The date of HCV infection was estimated as the day of high-risk exposure if available or, in the absence of this information, as either 6 weeks before the onset of symptoms in symptomatic patients [16, 23] or 6 weeks before seroconversion in asymptomatic patients [23, 26]. Seroconversion was defined as a positive anti-HCV antibody test result or HCV RNA PCR assay result in a participant with a documented negative result of an anti-HCV test within the past year. The date of seroconversion was defined as the midpoint between the last anti-HCV negative test result and the first anti-HCV positive test result.

Diagnoses were made by trained experienced physicians after evaluation of the patient's clinical presentation and laboratory data. Patients were followed up prospectively with scheduled visits for clinical and laboratory evaluation weekly for the first month of prospective follow-up, every 2 weeks for the second and third months, monthly until 12 months, 4 times a year for the second and third year, 3 times a year for the fourth year, and at least once a year thereafter. Serial measurements of serum ALT, HCV RNA, and anti-HCV antibodies were performed. Epidemiologic data concerning risk factors were obtained during medical evaluation, and HCV testing was extended to household members or sexual partners. Serial blood samples were drawn at each visit for biochemical and virologic evaluation and to evaluate cellular and humoral immune responses. Patients who did not clear HCV RNA before the fourth month of follow-up were assigned to the public hospital for eventual antiviral therapy. Treatment protocols varied according to medication availability and clinician's judgment. None of the study participants started antiviral treatment within the first 6 months after the estimated date of HCV infection.

SVC was defined as undetectable HCV RNA level within the first 6 months of follow-up after the estimated date of infection

Table 2. Characteristics of the Study Population

Characteristics	Patients (n p 65)
Total no. of HCV cohort, 2001–2008	73
Eligible patients for analysis ^a	65
Follow-up, mean \pm SD (median, range), months	47.6 \pm 28.6 (40.4, 7–108)
Age, mean \pm SD (range), years	45.7 \pm 12.4 (20–77)
Female	40 (61.5)
Race/ethnicity	
White	23 (35.4)
Mixed	34 (52.3)
Black	6 (9.2)
Other	2 (3.1)
Risk factor or mode of infection	
Medical procedure ^b	32 (49.2)
Unprotected sex	6 (9.2)
HCV-positive partner	14 (21.5)
Hemodialysis	8 (12.3)
Other ^c	5 (7.7)
HCV genotype	
Type 1	50 (76.9)
Type 2	4 (6.2)
Type 3	9 (13.8)
Type 4	1 (1.5)
Disease symptoms ^d	54 (83.1)
Time to disease symptoms, ^e mean \pm SD (range), days	50.8 \pm 19.7 (19–129)
Seroconversion ^f	26 (40.0)
Peak ALT level during acute phase, ^g mean \pm SD (median, range), U/L	1308 \pm 874 (1110, 65–3985)
Peak level of anti-HCV antibodies during acute phase, ^h mean \pm SD (median, range), od/co	97.8 \pm 35.2 (93.5, 0.5–172.2)
Viral load at first visit (median, range), copies/mL	8897 (0–400, 448–700)
Antiviral treatment during acute phase (\leq 6 months from infection)	0 (0.0)
Antiviral treatment during late follow-up (16 months from infection)	17 (25.0)
Start treatment after infection, mean \pm SD (median), months	17.5 \pm 9.8 (13.1)

NOTE. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. ALT, alanine aminotransferase; HCV, hepatitis C virus; od/co, optical density-to-cutoff ratio; SD, standard deviation.

^a Patients with human immunodeficiency virus coinfection (*n* p 4), hepatitis B virus coinfection (*n* p 1), heavy drinking (*n* p 1) pregnancy (*n* p 1), and/or hepatotoxic medication use (*n* p 1) were excluded.

^b Includes minor or major surgery, hospitalization, and/or blood transfusion.

^c Includes sharing of sharp personal items (*n* p 3) and blood exposure (*n* p 2).

^d Including jaundice and/or dark urine.

^e Calculated from the estimated date of infection.

^f Defined as a positive HCV antibody test or HCV RNA polymerase chain reaction assay result in a participant with a documented negative result on an anti-HCV test within the past year.

^g Within the first 6 months after the estimated date of infection.

^h Within the first 6 months after the estimated date of infection. Note that for hemodialysis patients (*n* p 8), because of a delayed immune response, the first 8 months of follow-up were considered for the peak anti-HCV measure.

with qualitative Cobas Amplicor molecular assays (lower detection limit, 50 IU/mL) performed in serum in the absence of treatment. To sustain SVC classification, at least 2 additional consecutive test results indicating undetectable HCV RNA levels were required because intermittent viremia has frequently been observed in the early phase of HCV infection [12, 27]. The date of SVC was defined as the midpoint between the date of the first of 3 consecutive samples with undetectable HCV RNA

levels and the date of the last sample with detectable HCV RNA levels. In the event that the first sample collected had undetectable HCV RNA levels, the date of SVC was estimated as the midpoint between the date of infection and the date of the first sample with undetectable HCV RNA levels [23, 25]. This study was approved by all participating institutional review boards, and signed informed consent was obtained from all participants.

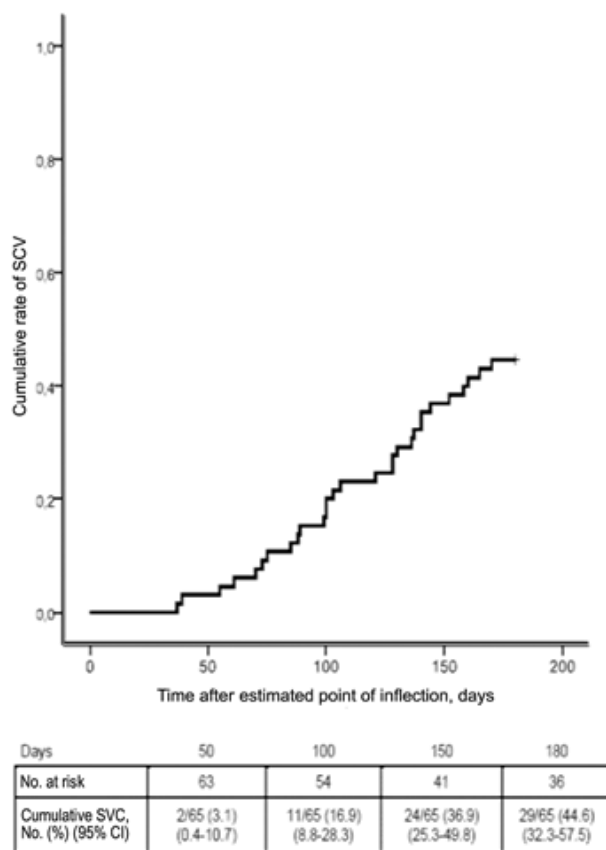


Figure 1. Kaplan-Meier failure estimates of time to spontaneous viral clearance (SVC) in 65 patients with acute hepatitis C virus, Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2008. CI, confidence interval.

Serum HCV RNA detection, quantification, genotyping, and serotyping. Serum samples were obtained from whole blood collected in tubes without anticoagulants and separated within 4 h of venipuncture, aliquoted, and stored at -80°C , except for 1 vial that was used for determining ALT levels. Serum samples were tested for anti-HCV by the AxSYM HCV 3.0 microparticle enzyme immunoassay (Abbott Diagnostics). The qualitative determination of HCV RNA was performed by the Cobas Amplicor HCV test (detection limit, 50 IU/mL) and the quantitative determination through real-time PCR assay [28] (detection limit, 1000 copies/mL). Genotype was determined by using the INNO-Lipa HCV II assay (Bayer Diagnostics) or by HCV serotyping in patients with low or undetectable viral loads. HCV serotypes were determined using the Murex HCV Serotyping 1–6 assay (Abbott) [29]. To investigate possible transmission routes, we submitted suspected source and case serum samples to direct nucleotide sequencing of the NS5B region and analyzed them on an automatic sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyser; Applied Biosystems).

Statistical analysis. Kaplan-Meier curves were used to estimate cumulative rates of SVC at 6 months after the estimated date of HCV acquisition. Univariate comparisons between patients with self-limiting and chronic HCV infection were performed using the 2-tailed independent-samples t test for continuous variables and the χ^2 test and the Fisher exact test for categorical variables. To test for normal distribution of continuous parameters, we used the Kolmogorov-Smirnov test. For skewed variables, logarithmic transformation was applied.

Cox proportional hazards regression was used to estimate multivariate hazard ratios and their 95% confidence intervals (CIs) for the association of SVC with host and viral factors. Follow-up started at the estimated date of HCV infection and ended at the estimated date of SVC or at censoring (at day 180 after the estimated date of infection). Sensitivity analyses were performed by estimating alternate HCV acquisition dates using (1) 60 days before symptom onset for symptomatic patients and (2) 6 weeks before the first positive antibody test result or 1 week before the first positive HCV RNA test result for asymp-

Table 3. Comparison of Baseline Demographic, Clinical, and Virologic Characteristics of Patients with Self-Limiting and Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Courses, Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2008

Characteristic	Patients with self-limiting infection (n p 29)		Patients with chronic infection (n p 36)		P
	Age, mean	SD (range), years	Age, mean	SD (range), years	
Age, mean	44.1	11.4 (25–73)	47.0	13.2 (20–77)	.24
Female	19 (65.5)		21 (58.3)		.61
Disease symptoms ^a	29 (100.0)		25 (69.4)		! .001
Time to symptoms, mean	48.3	15.5 (19–89)	53.7	23.8 (24–129)	.75
Race/ethnicity					
White	10 (34.5)		13 (36.1)		.51
Mixed	17 (58.6)		17 (47.2)		
Black	2 (6.9)		4 (11.1)		
Other	0 (0.0)		2 (5.6)		
Risk factor or mode of infection					
Parenteral ^b	18 (62.1)		27 (75.0)		.29
Sexual ^c	11 (37.9)		9 (25.0)		
HCV genotype					
Type 1	22 (75.9)		28 (77.8)		.18
Type 2	0 (0.0)		4 (11.1)		
Type 3	5 (17.2)		4 (11.1)		
Type 4	1 (3.4)		0 (0.0)		
Seroconversion ^d	8 (27.6)		18 (50.0)		.08
Peak ALT level during acute phase, ^e mean	1397	800 (1224)	1236	937 (1008)	.47
Peak level of anti-HCV antibodies during acute phase, ^f mean	85.7	33.3 (86.7)	107.6	34.1 (109.0)	.015
Log viral load at first visit, mean	2.05	2.57 (0.0)	4.01	2.6 (4.3)	! .01

NOTE. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. Self-limiting infection was defined as a series of at least 3 negative HCV RNA test results within 6 months after the estimated point of infection. Patients with detectable HCV RNA beyond 6 months after the estimated point of HCV infection were classified as having chronic disease. ALT, alanine aminotransferase; od/co, optical density-to-cutoff ratio; SD, standard deviation.

a Including jaundice and/or dark urine.

b Includes minor or major surgery, hospitalization, blood transfusion, blood exposure, and/or hemodialysis.

c Includes unprotected sex and/or HCV-positive partner.

d Defined as a positive HCV antibody test or HCV RNA polymerase chain reaction result in a participant with a documented negative result on an anti-HCV test within the past year.

e Within the first 6 months after the estimated point of infection.

f Within the first 6 months after the estimated point of infection. Note that for hemodialysis patients (n p 8), because of a delayed immune response, the first 8 months of follow-up were considered for the peak anti-HCV measure.

Downloaded from <http://cid.oxfordjournals.org/> by guest on January 14, 2012

tomatic patients [23]. The proportional hazards assumption was checked using Schoenfeld residuals and visual inspection of the hazard plots. For metric data (including ALT, HCV RNA, and anti-HCV antibodies), we first computed adjusted hazard ratios with 95% CIs using the median value of the distribution as the cutoff point; in sensitivity analyses, we recalculated all results, retaining all metric data in continuous form. Two-sided $P < .05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were conducted using SPSS statistical software, version 15.0 (SPSS) statistical software.

RESULTS

Patient characteristics. Individual patient characteristics detailing the course of 65 consecutive patients with acute HCV infections in Rio de Janeiro, Brazil, diagnosed from 2001 through

2008 are listed in Table 1. An additional 8 patients were excluded from the present analysis because they had been identified with human immunodeficiency virus coinfection (n p 4), hepatitis B virus coinfection (n p 1), heavy drinking (n p 1), pregnancy (n p 1), and/or hepatotoxic medication use (n p 1).

Median follow-up after the estimated point of HCV acquisition to the last available HCV RNA measurement was 40.4 months (Table 2). Forty women (61.5%) and 25 men (38.5%) comprised the study cohort. The mean age at HCV infection was 45.7 years (range, 20–77 years). The major risk factor or source of HCV infection was undergoing medical procedures (including hospitalization, minor or major surgery, and/or blood transfusion) (49.2%), providing a precise putative date of infection. Other sources of HCV infection were having an HCV-positive partner (21.5%) or undergoing hemodialysis

Table 4. Demographic, Clinical, and Virologic Factors Associated with Spontaneous Viral Clearance (SVC) in 65 Patients with Acute Hepatitis C Virus (HCV), Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2008

Characteristic ^a	Proportion (%) of patients who experienced SVC ^b	Multivariate hazard ratio for SVC (95% CI) ^c	P
Age			
≤ 44 years	11/32 (34.4)	1.00	
>44 years	18/33 (54.5)	1.52 (0.61–3.77)	.37
Sex			
Male	10/25 (40.0)	1.00	
Female	19/40 (47.5)	1.35 (0.57–3.21)	.50
Mode of infection			
Parenteral	18/45 (40.0)	1.00	
Sexual	11/20 (55.0)	1.05 (0.43–2.56)	.92
Seroconversion^d			
Yes	8/26 (30.8)	1.00	
No	21/39 (53.8)	1.96 (0.65–5.92)	.23
Peak ALT level^e			
≤1110.5 U/L	14/32 (43.8)	1.00	
> 1110.5 U/L	15/31 (48.4)	1.03 (0.43–2.50)	.95
Peak level of anti-HCV antibodies^f			
≤ 93.5 od/co	9/30 (30.0)	1.00	
>93.5 od/co	18/30 (60.0)	2.62 (1.11–6.19)	.028
Log viral load first visit			
≤ 3.95 copies/mL	10/32 (31.3)	1.00	
>3.95 copies/mL	19/33 (57.6)	1.33 (0.56–3.18)	.52

NOTE. ALT, alanine aminotransferase; CI, confidence interval; od/co, optical density–to–cutoff ratio.

^a For continuous covariables, the median value of the distribution was used as the cutoff.

^b SVC was defined as a series of at least 3 negative HCV RNA results within 6 months after the estimated point of infection. Patients with detectable HCV RNA beyond 6 months after the estimated point of HCV infection were classified as having chronic disease.

^c Estimated from Cox proportional hazards regression analyses adjusted for all patients characteristics.

^d Defined as a positive HCV antibody test or HCV RNA polymerase chain reaction assay result in a participant with a documented negative result on an anti-HCV test within the past year.

^e Within the first 6 months after the estimated date of infection.

^f Within the first 6 months after the estimated date of infection. Note that for hemodialysis patients ($n = 8$), because of a delayed immune response, the first 8 months of follow-up were considered for the peak anti-HCV measure.

(12.3%). During the first 6 months of follow-up, 54 (83.1%) of the 65 patients experienced disease symptoms (including jaundice and/or dark urine); the mean time from the estimated date of HCV infection to onset of disease symptoms was 50.8 days (range, 19–129 days). Genotype 1 was predominant among the group (76.9%), followed by genotype 3 (13.8%) and genotype 2 (6.2%). Median viral load at first clinical presentation was 8897 copies/mL (range \log_{10} , 0–8.60 copies/mL). Peak ALT and peak anti-HCV antibody levels during the first 6 months of follow-up ranged from 65 to 3985 U/L and from 0.5 to 172 optical density–to–cutoff ratio [od/co], respectively (Table 2).

Spontaneous HCV clearance. The cumulative rate of SVC within the first 6 months of follow-up was 44.6% (95% CI, 32.3%–57.5%; Figure 1). The median time to SVC was 106 days (range, 37–170 days). An additional 7 patients (10.8%) with persistent or intermittent viremia during the first 6 months

of follow-up cleared the virus during later follow-up, of whom 5 cleared from 6 to 12 months and 2 from 2 to 3 years (Table 1). However, those patients were not classified as spontaneous HCV clearers but censored at day 180 in our statistical models.

Predictors of spontaneous HCV clearance. Patients with a self-limiting course of HCV infection experienced disease symptoms more frequently (100% vs 69.4%; $P < .001$), had lower peak levels of anti-HCV antibodies during the first 6 months of follow-up (median, 86.7 vs 109.0 od/co; $P = .015$), and had lower viral loads at first clinical presentation (median, 0.0 vs 4.3 \log_{10} copies; $P = .01$). No statistically significant differences were found in other host and/or viral factors, including age ($P = .24$), sex ($P = .61$), risk factors ($P = .29$), seroconversion ($P = .08$), peak ALT level ($P = .47$), and HCV virus genotype ($P = .18$) between the groups (Table 3).

In multivariate regression analysis, including all the patient

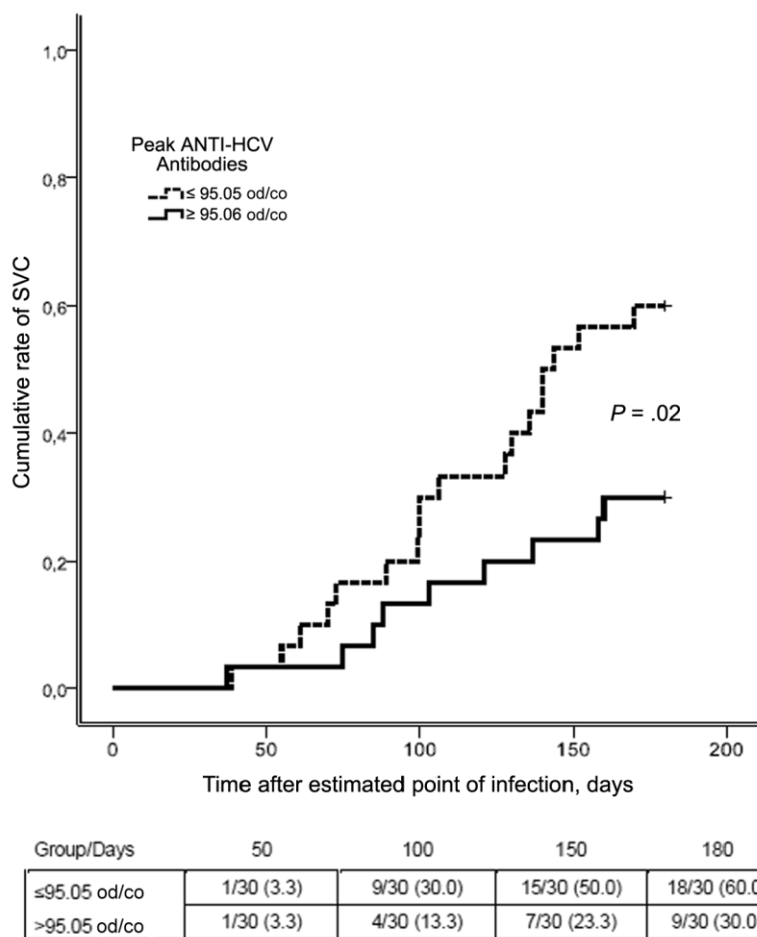


Figure 2. Kaplan-Meier failure estimates of spontaneous viral clearance (SVC) according to peak anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies within the first 6 months of follow-up in 65 patients, Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2008. Note that the median value of the distribution (95.05 optical density–to–cutoff ratio [od/co]) was used as the cutoff.

characteristics as covariates, only peak anti-HCV level during the first 6 months of follow-up was independently related to SVC; the hazard ratio for low level of anti-HCV antibodies (≤ 93.5 od/co) compared with high level of anti-HCV antibodies (≥ 93.5 od/co) was 2.62 (95% CI, 1.11–6.19; $P = .028$; Table 4 and Figure 2). Exclusion of patients undergoing hemodialysis did not change our findings in any notable way (Table 5).

When using alternate HCV acquisition dates in sensitivity analysis, simultaneously modeling log viral load, peak ALT level, and peak anti-HCV antibody level as continuous variables in our regression runs, peak level of anti-HCV antibodies during the first 6 month of follow-up remained an independent predictor for SVC; the hazard ratio per anti-HCV antibody unit increase was 0.98 (95% CI, 0.97–0.99; $P = .03$; Table 6).

DISCUSSION

Our study presents epidemiologic data from a series of 65 individuals with a well-documented diagnosis of acute HCV in-

fection who were prospectively followed up from the initial phase of disease in Rio de Janeiro, Brazil. To our knowledge, this is the largest such set of patients described from South America.

Our data confirm spontaneous viral resolution to occur in a considerable percentage of patients. Similar to our estimate of 44.6%, Sharaf Eldin and coworkers [25], from a symptomatic cohort of patients with acute HCV in Egypt, recently reported a rate of SVC at 6 months equaling 41.5%. Notably, the clearance rate of 44.6% reported in the present study may be an underestimate because spontaneous HCV resolution may extend beyond the 6-month period, as previously shown [11] and also observed in our population. Santantonio and colleagues [18] from an Italian cohort of 40 patients with community-acquired acute HCV infection reported a rate of SVC of 30%. In contrast, Wang and coworkers [23] and Page and coworkers [30], from 2 distinct US cohorts, reported rates of SVC of 18% and 20%, respectively. However, in those cohorts most partic

Table 5. Demographic, Clinical, and Virologic Factors Associated with Spontaneous Viral Clearance (SVC), after Excluding Hemodialysis Patients, Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2008

This table is available in its entirety in the online version of *Clinical Infectious Diseases*

ipants were asymptomatic and/or injection drug users, possibly explaining the lower rates of SVC compared with the findings of the present study of predominantly symptomatic females. Both female sex and disease symptoms have been shown to be associated with favorable outcome in acute HCV infection [11].

There are some specifics of our cohort that are noteworthy. First, because patients were referred to our clinic on the account of a suspicion of possible acute hepatitis, they might not represent the overall spectrum of disease that is mostly asymptomatic; however, the inclusion of both symptomatic and asymptomatic patients minimizes the likelihood of possible referral bias. Second, more than 20% of patients had sexual partners who were identified as having HCV infection during the study period. HCV RNA was detected in 13 of 14 sexual partners, all of whom shared the same HCV genotype. The only sexual partner who had undetectable HCV RNA was also in the acute phase of HCV infection and had cleared the virus spontaneously.

In univariate analysis, we observed that symptomatic infection and low viral load at first clinical presentation were both associated with higher rates of SVC, whereas we found no association for age, sex, race, peak ALT level, mode of HCV transmission, and/or HCV genotype. Similarly, in the Italian cohort [18], older age and jaundice were predictive of resolution, whereas there was no correlation with other host or viral factors. In a series of 12 patients with acute HCV infection, Hofer and colleagues [16] previously observed lower baseline viral loads in those in whom the virus spontaneously cleared compared with chronically infected persons (171,451 ± 66,421 IU/mL vs 396,759 ± 227,311 IU/mL); however, likely because of poor statistical power, this difference did not reach statistical significance. The authors further report that serial ALT measurements failed to discriminate patients with SVC from those developing chronic infection [16].

In our multivariate regression runs, low peak level of anti-HCV antibodies during the first 6 months of follow-up was the only significant predictor for SVC, persisting after exclusion of hemodialysis patients and under different modeling strategies. To date, there is little information on the timing, magnitude, specificity, and clinical relevance of the antibody response to acute HCV infection [26]. Unlike other viral infections in which the humoral response has a major role in viral clearance, antibodies are relatively delayed in HCV and ineffective because of rapid mutation in targeted antibody epitopes [31]. Even though the humoral immune response seems insufficient for viral

clearance or protection against additional infection, it might play a role in containing viral replication and modulates chronic disease [32]. Descriptive trends for humoral immunity have been observed previously, suggesting decreases or even loss of antibodies over time in recovered chimpanzees and human subjects, different from what is observed in long-term carriers, who seem to maintain or even increase their levels of circulating HCV antibodies [26, 33–35]. Consistently, Huang and colleagues [36] in a cross-sectional study reported an inverse correlation between the signal-cutoff antibody ratio with HCV viremia, and Lu et al [37] described persistently low signal-cutoff ratios in 18 patients with spontaneous viral resolution, suggesting that signal-cutoff ratios might not increase significantly in those who spontaneously recover. The absence or loss of HCV antibody in patients who have cleared the virus is most likely due to the lack of antigenic stimulation to induce detectable antibody production after resolution of infection. Studies in chimpanzees have already shown that low-dose inoculums may be ineffective in inducing detectable HCV antibodies and once challenged with higher doses will seroconvert, but antibodies are short-lived in the absence of viremia [38].

This study has some potential limitations. First, the sample size, although relatively large compared with other investigations, was insufficient to obtain precise estimates under some of our analytic strategies, including the examination of possible interaction among the single predictors. Second, because of the absence of asymptomatic patients in the group with self-limiting HCV infection, we were unable to estimate multivariate risk ratios for the effect of disease symptoms on SVC. Finally, in some patients the date of HCV infection had to be estimated on the basis of established criteria because the exact date of high-risk exposure was not available. However, sensitivity analysis using alternate infection dates yielded similar estimates, suggesting that the impact of this limitation is negligible.

In summary, data from the present longitudinal study confirm that spontaneous viral resolution occurs in a relatively large proportion of patients with symptomatic acute HCV infection. Different from previous studies that have already qualitatively described profiles of humoral immune response during the acute phase of infection, we here identified low antibody values as a statistically significant predictor for early viral clearance. Although our findings need to be confirmed in other populations, they underline that time for SVC should be con-

Table 6. Factors Associated with Spontaneous Viral Clearance (SVC) in 65 Patients with Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection, Using Alternate HCV Acquisition Dates, Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2008

This table is available in its entirety in the online version of *Clinical Infectious Diseases*

sidered before antiviral treatment is initiated, particularly in symptomatic patients with low anti-HCV antibody levels in the early phase of disease.

Acknowledgments

Financial support. Our research was supported by National Institute of Health grant A1066345-05 and Coordenaco Geral de Laboratrios de Saúde Pública/Ministry of Health in Brasília, Brazil.

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

1. Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol* **2008**; 103:1283–1297.
2. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet* **2008**; 372:321–332.
3. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* **2008**; 47:321–331.
4. The Global Burden of Hepatitis C Working Group. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol* **2004**; 44:20–29.
5. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* **2006**; 144:705–714.
6. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **2005**; 5:558–567.
7. Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* **2005**; 9:383–398.
8. Chung RT. Acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **2005**; 41(suppl 1):S14–S17.
9. Seeff LB, Hoofnagle JH. The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002. *Clin Liver Dis* **2003**; 7:261–287.
10. Mazzeo C, Azzaroli F, Giovanelli S, et al. Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut* **2003**; 52:1030–1034.
11. Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* **2006**; 13:34–41.
12. Cox AL, Netski DM, Mosbruger T, et al. Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **2005**; 40:951–958.
13. Corey KE, Ross AS, Wurcel A, et al. Outcomes and treatment of acute hepatitis C virus infection in a United States population. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2006**; 4:1278–1282.
14. Mondelli MU, Cerino A, Cividini A. Acute hepatitis C: diagnosis and management. *J Hepatol* **2005**; 42(suppl 1):S108–S114.
15. Santantonio T, Medda E, Ferrari C, et al. Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy. *Clin Infect Dis* **2006**; 43:1154–1159.
16. Hofer H, Watkins-Riedel T, Janata O, et al. Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. *Hepatology* **2003**; 37:60–64.
17. Minola E, Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus infection. *Eur J Epidemiol* **2006**; 21: 293–297.
18. Santantonio T, Sinesi E, Guastadisegni A, et al. Natural course of acute hepatitis C: a long-term prospective study. *Dig Liver Dis* **2003**; 35: 104–113.
19. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology* **2001**; 33:321–327.
20. Jee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun* **2004**; 5:237–245.
21. Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* **2007**; 13:1770–1787.
22. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* **2003**; 125:80–88.
23. Wang C, Krantz E, Klarquist J, et al. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *J Infect Dis* **2007**; 196:1474–1482.
24. Amin J, Law MG, Micallef J, et al. Potential biases in estimates of hepatitis C RNA clearance in newly acquired hepatitis C infection among a cohort of injecting drug users. *Epidemiol Infect* **2007**; 135: 144–150.
25. Sharaf Eldin N, Ismail S, Mansour H, et al. Symptomatic acute hepatitis C in Egypt: diagnosis, spontaneous viral clearance, and delayed treatment with 12 weeks of pegylated interferon alfa-2a. *PLoS One* **2008**; 3(12):e4085.
26. Netski DM, Mosbruger T, Depla E, et al. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **2005**; 41:667–675.
27. McGovern BH, Birch CE, Bowen MJ, et al. Improving the diagnosis of acute hepatitis C virus infection with expanded viral load criteria. *Clin Infect Dis* **2009**; 49:1051–1060.
28. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccalá G, Sodoyer M, et al. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J Virol Methods* **2001**; 95:111–119.
29. Schulze Zur Wiesch J, Lauer GM, Timm J, et al. Immunologic evidence for lack of heterologous protection following resolution of HCV in patients with non-genotype 1 infection. *Blood* **2007**; 110:1559–1569.
30. Page K, Hahn JA, Evans J, et al. Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. *J Infect Dis* **2009**; 200:1216–1226.
31. Heller T, Rehermann B. Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* **2005**; 25:7–17.
32. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**; 101:10149–10154.
33. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, et al. Limited humoral response immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **1999**; 116:135–143.
34. Nikolaeva LI, Blokhina NP, Tsurikova NN, et al. Virus-specific antibody titers in different phases of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **2002**; 9:429–437.
35. Takaki A, Wiese M, Maertens G, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* **2000**; 6:578–582.
36. Huang WS, Lu SN, Wang JH, et al. Prediction of viremia for cases of hepatitis C virus (HCV) infection using a third-generation anti-HCV enzyme immunoassay test. *Hepatology* **2005**; 42:893–896.
37. Lu SN, Tung HD, Chen TM, et al. Is it possible to diagnose acute hepatitis C virus (HCV) infection by a rising anti-HCV titre rather than by seroconversion? *J Viral Hepat* **2004**; 11:563–570.
38. Shata MT, Tricoche N, Perkus M, et al. Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees. *Virology* **2003**; 314: 601–616.

Supplement Table 5. Demographic, clinical and virological factors associated with spontaneous viral clearance (SVC), after excluding haemodialysis patients, Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2008.

Characteristic ^a	Category	SVC - no.(%) ^b	Hazard Ratio for SVC (95%CI) ^c	p-value
Age (years)	≥44	11/25 (44.0)	1.00	0.59
	<44	18/33 (54.5)	1.28 (0.53-3.08)	
Sex	Male	10/21 (47.6)	1.00	0.53
	Female	19/37 (51.4)	1.33 (0.55-3.20)	
Mode of Infection	Parenteral	18/38 (47.4)	1.00	0.79
	Sexual	11/20 (55.0)	1.13 (0.46-2.79)	
Seroconversion ^d	Yes	8/19 (42.1)	1.00	0.55
	No	21/39 (53.8)	1.38 (0.48-3.96)	
Peak ALT (U/L) ^e	<1110.5	14/26 (53.8)	1.00	0.96
	≥1110.5	15/30 (50.0)	1.02 (0.43-2.42)	
Peak Anti-HCV antibodies (do/co) ^f	≥93.5	9/26 (34.6)	1.00	0.023
	<93.5	18/27 (66.7)	2.81 (1.16-6.83)	
Log-Viral load first visit (copies/mL)	≥3.95	10/28 (35.7)	1.00	0.56
	<3.95	19/30 (63.3)	1.31 (0.53-3.26)	

^a For continuous co-variables the median value of the distribution was used as cut-off.

^b SVC was defined as a series of at least 3 negative HCV RNA results within 6 months after the estimated point of infection. Patients with detectable HCV RNA beyond 6 months after the estimated point of HCV infection were classified chronic.

^c Estimated from Cox proportional hazards regression analyses adjusted for the above patients characteristics.

^d Defined as a positive HCV antibody or HCV RNA PCR assay in a participant with a documented negative result of an anti-HCV test within the past year.

^e Measured within the first 6 months after the estimated date of HCV infection.

Supplement Table 6. Factors associated with spontaneous viral clearance (SVC) in 65 patients with acute HCV infection, using alternate HCV acquisition dates, Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2008.^a

Characteristic	Hazard Ratio for SVC ^b	95%CI	p-value
Age, year increase	0.99	0.95-1.03	0.54
Female Sex	1.51	0.59-3.82	0.39
Sexual Transmission	1.02	0.43-2.42	0.97
Seroconversion ^c	0.66	0.22-2.02	0.47
Peak ALT (U/L), unit increase ^d	1.00	1.00-1.01	0.62
Peak Anti-HCV antibodies (do/co), unit increase ^d	0.98	0.97-0.99	0.03
Log-Viral load first visit (copies/mL), unit increase	0.88	0.74-1.05	0.17

^a Alternate HCV acquisition dates were estimated using (a) 60 days before symptom onset for symptomatic patients and (b) 6 weeks before the first positive antibody test result or 1 week before the first positive HCV RNA test result for asymptomatic patients. Peak ALT, peak anti-HCV antibodies and viral load at first visit were analyzed as continuous parameters. SVC was defined as a series of at least 3 negative HCV RNA results within 6 months after the estimated point of infection. Patients with detectable HCV RNA beyond 6 months after the estimated point of HCV infection were classified chronic.

^b Estimated from Cox proportional hazards regression analyses adjusted for the above patients characteristics.

^c Defined as a positive HCV antibody or HCV RNA PCR assay in a participant with a documented negative result of an anti-HCV test within the past year.

^d Measured within the first 6 month after the estimated date of infection. Note that for haemodialysis patients (n=8), due to a delayed immune response, the first 8 month of follow-up were considered for the peak anti-HCV measure.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil

Alexander M Strasak^{1†}, Arthur Y Kim^{2†}, Georg M Lauer³, Paulo S de Sousa⁴, Cleber F Ginguino⁴, Carlos A Fernandes⁵, Carlos E Velloso⁴, Adilson J de Almeida^{4,6}, Jaqueline M de Oliveira⁷, Clara F Yoshida⁴, Julian Schulze zur Wiesch⁸, Gláucia Paranhos-Baccalá⁹, Stefan Lang¹⁰, Larry J Brant¹¹, Hanno Ulmer¹, Susanne Strohmaier¹, Lalit Kaltenbach¹, Elisabeth Lampe⁴, Lia L Lewis-Ximenez^{4*}

Abstract

Background: The anti-HCV antibody response has not been well characterized during the early phase of HCV infection and little is known about its relationship to the clinical course during this period.

Methods: We analyzed serial anti-HCV antibodies longitudinally obtained from a prospective cohort of 65 patients with acute HCV infection by using a microparticle enzyme immunoassay AxSYM HCV 3.0 (Abbott Diagnostics) during the first 12 months from HCV acquisition in Rio de Janeiro, Brazil. Spontaneous viral clearance (SVC) was defined as undetectable HCV RNA in serum, in the absence of treatment, for three consecutive HCV PCR tests within 12-months of follow-up.

Results: Baseline antibody values were similar among patient groups with self-limiting HCV evolution ($n = 34$) and persistent viremia ($n = 31$) [median (interquartile range) signal/cut-off ratio (s/co) 78.7 (60.7-93.8) vs. 93.9 (67.8-111.9), $p = 0.26$]. During 12-months follow-up, patients with acute spontaneous resolving HCV infection showed significantly lower serial antibody response in comparison to individuals progressing to chronic infection [median (interquartile range) s/co 62.7 (35.2-85.0) vs. 98.4 (70.4-127.4), $p < 0.0001$]. In addition, patients with self-limiting HCV evolution exhibited an expeditious, sharp decline of serial antibody values after SVC in comparison to those measured before SVC [median (interquartile range) s/co 56.0 (25.4-79.3) vs. 79.4 (66.3-103.0), $p < 0.0001$].

Conclusion: Our findings indicate a rapid short-term decline of antibody values in patients with acute spontaneous resolving HCV infection.

Background

Acute hepatitis C virus (HCV) infection accounts for approximately 20% of cases of acute hepatitis today, with an estimated 30,000 to 40,000 new cases occurring every year in the United States alone. Worldwide at least 170 million individuals are chronically infected with HCV [1-4]. The natural history of HCV infection is heterogeneous and incorporates a range of prognostic determinants [1-6]. Untreated, acute HCV infection

progresses to chronic infection in 50-80% of patients [7-9]. Rates of spontaneous HCV resolution (SVC) reported from prospective studies substantially vary, with estimates ranging from 10 to 60% [2-6,10,11].

As acute HCV infection is clinically inapparent in most cases, longitudinal data on the natural course of early disease remain sparse [12] with the immunologic correlates of spontaneous recovery being poorly understood [13]. While antibodies detected by commercially available tests, have been widely used for diagnosing HCV infection, there is little information on the timing, magnitude, specificity and clinical relevance of the antibody dynamics during acute HCV infection, and its relation to short-term disease outcome widely remains

* Correspondence: lialewis.fiocruz@gmail.com

† Contributed equally

⁴ Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

unclear [1,2,14-19]. We here present detailed 12-month follow-up data on serial antibody values in a Brazilian cohort of 65 patients with acute HCV infection, followed prospectively from the initial phase, between 2001 and 2009. We compared longitudinal patterns of anti-body ratios between individuals with self-limiting acute HCV evolution and patients progressing to chronic infection.

Methods

We have recently published the results of an acute HCV cohort in Rio de Janeiro, Brazil [20], which showed an independent relationship of peak anti-HCV antibody levels and disease outcome. However, in this study we extended the study prospectively to 12 months and used serial anti-HCV antibody ratios obtained from a commercial microparticle enzyme immunoassay (MEIA) AxSYM HCV 3.0 (Abbott Laboratories) and serial qualitative HCV RNA detected by the Cobas Amplicor Monitor HCV test (Roche Diagnostics) for analysis. Patients who did not clear HCV RNA during early follow-up were referred for antiviral therapy. Six of the patients in the present study underwent antiviral treatment within the first 12 months from infection and their anti-HCV antibody ratios were not considered for analysis during and after the treatment period. A more detailed description of the program methodology and study cohort has been reported previously [20].

This study was approved by the Research on Human Subjects Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation as well as the Brazilian National Research Ethics Commission. Signed informed consent was obtained from all participants.

Laboratory Methods

Following diagnosis of acute HCV infection, samples were obtained from study participants at approximately every two weeks for the first, second and third month and then monthly from the fourth month to one year between 2001 to 2009. Overall 85% of scheduled blood draws were obtained. Serum samples obtained serially were aliquoted for serological and molecular testing and stored at -80°C. Samples were thawed only once for laboratory testing. Repeat tests were performed for anti-HCV antibody testing or HCV RNA detection on separate samples obtained at the same time point. Anti-HCV antibody testing results were obtained from ratios between sample absorbance and the calculated cut-off for each sample (s/co) with the auto-mated MEIA AXSYM HCV 3.0. The qualitative determination of HCV RNA was carried out by the Cobas Amplicor Monitor HCV test (Roche Diagnostics) which has a detection limit of 50 IU/ml. First time samples that were HCV RNA undetectable by the Cobas Amplicor Monitor were retrospectively reevaluated by the VERSANT HCV RNA

Qualitative Assay (TMA) (Siemens Healthcare Diagnostics) with a lower detection limit of 9.6 IU/ml.

Definitions

Diagnosis of acute HCV infection was based upon previously established criteria [10,11,21]: (1) a positive anti-HCV antibody or HCV RNA result in a patient with a negative anti-HCV test result within the past year, or (2) a positive anti-HCV and HCV RNA result in a patient with clinical hepatitis, ALT levels 10 times the upper limit of normal (32 U/L); or, (3) in absence of detectable HCV RNA, history of high-risk exposure between 1 and 3 months prior to clinical manifestation in anti-HCV seropositive patients. Further details on the diagnosis of acute HCV infection is described elsewhere [20]. To estimate the date of HCV infection the day of high-risk exposure was used, or, when unavailable, as either 6 weeks before the onset of symptoms in symptomatic patients [7,10], or 6 weeks before seroconversion in asymptomatic patients [10,15].

Spontaneous viral clearance (SVC) was defined as undetectable HCV RNA in serum within the first 12 months of follow-up after the estimated date of infection, in the absence of treatment. Since oscillations in HCV RNA detection are frequently observed in the early phase of HCV infection, two additional consecutive negative HCV RNA test results were required to sustain SVC classification [22,23]. The midpoint between the date of the first of three consecutive RNA-negative samples and the date of the last positive HCV RNA was used as the estimated date of SVC. For six patients with undetectable HCV RNA in the first sample collected, the date of SVC was estimated as the midpoint between the date of infection and the date of the first undetectable HCV RNA sample [10,11].

Statistical Analysis

Inter-individual differences in baseline antibody values (i.e. measurements at first visit) and median antibody values during prospective 12-months follow-up between patients with self-limiting and chronic HCV evolution were assessed using independent samples t-test. Serial patterns of longitudinal antibody values between patient groups were analyzed by means of linear mixed-effects regression models, utilizing intra-individual differences and multiple measurements per patient over time. Two-sided p-values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using STATA 10.0 and SAS 9.1 statistical software.

Results

Patient characteristics

40 women (61.5%) and 25 men (38.5%) comprised the cohort eligible for analysis. Mean age at HCV infection

was 45.7 years (range, 20-77 years). 54/65 patients (83.1%) experienced disease symptoms (including jaundice and/or dark urine) during follow-up. During the 12-month follow-up 439 serial antibody measurements were obtained (median per patient 6.0, range 1-16). Antibody values were approximately normally distributed, with a sample absorbance/cut-off ratio (s/co) ranging from 0.4 to 185.6. After 12 months of follow-up, 34/65 patients (52.3%) had spontaneously recovered from acute HCV, including 5 with clearance after six months of follow-up. A detailed comparison of sociodemographic and clinical characteristics between individuals with acute spontaneous resolving HCV infection and patients' progression to chronic infection has been previously reported by our group [20].

Longitudinal Antibody Response and Spontaneous HCV Clearance

Baseline antibody ratios were similar among patient groups with self-limiting HCV evolution (n = 34) and persistent viremia (n = 31) [median (interquartile range - IQR) s/co ratio 78.7 (60.7-93.8) vs. 93.9 (67.8-111.9), p = 0.26, Table 1]. Compared to patients with persistent viremia, patients with self-limiting HCV evolution had significantly lower median and serial antibody ratios [105.5 s/co (IQR 75.4-123.6) vs. 66.2 s/co (IQR 47.8-79.5), p < 0.0001, and 98.4 s/co (IQR 70.4-127.4) vs. 62.7 s/co (IQR 35.2-85.0), p < 0.0001, Table 1]. In addition, patients with self-limiting HCV infection showed a significant and sharp decline of serial antibody ratios after SVC [79.4 s/co (IQR 66.3-103.0) before SVC vs. 56.0 s/co (IQR 25.4-79.3) after SVC, p < 0.0001, Table 1].

Discussion

We present the antibody dynamics during the initial phase of disease in 65 individuals with acute HCV infection, prospectively followed in Rio de Janeiro, Brazil. Although different profiles of long-term humoral immune response between spontaneous clearers and chronic carriers have previously been described in HCV

infection [13,17-19,24,25], the dynamics of humoral responses during the acute phase of infection are less well documented due to the fact that acute HCV cohorts and prospective data from the early phase of disease are rare [12]. Our previous study had demonstrated that low levels of anti-HCV are predictive of spontaneous viral clearance in the acute phase of infection in patients followed during a 6-month period. This study, however, in extending the study to a 12-month time period, identified an additional 5 cases of SVC and shows that longitudinal antibody response may be used as a predictor of spontaneous viral during early phase of HCV infection when rapid declines in anti-HCV antibodies occur. From a clinical standpoint, two or more serial values may be more feasible than examining peak antibody values [20] as a discriminator of outcome.

Takaki and colleagues [13] analyzed the HCV-specific humoral immune responses in patients infected with HCV over an 18-20 year course of infection after documented exposure and found that a large number of patients with viral clearance tested negative for anti-HCV antibodies. Messick and colleagues [24] studied a cohort of haemophiliacs exposed to HCV infection and observed significant decrease in anti-HCV antibody ratios in patients with viral clearance when compared to those with persistent viremia over a period of 15 years. Lu and co-workers [25], described persistently low antibody s/co ratios in subjects with spontaneous viral resolution, suggesting that antibody ratios might not rise significantly in those who spontaneously recover.

It has been speculated that the partial or total loss of anti-HCV antibodies in immunocompetent patients that have spontaneously recovered from HCV may be attributed to the lack of HCV antigen that would sustain antibody levels [24,26]. Studies in chimpanzees have already shown that low doses of HCV inoculum may promote cellular immune responses in chimpanzees but rarely produce detectable viremia or seroconversion [27]. Cross-sectional studies have additionally demonstrated that indeterminate and weak antibody reactivity are each

Table 1 Anti-HCV antibodies (s/co) during first 12 months of follow-up in 65 patients with acute HCV infection, stratified according to viral clearing status, Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2009^a

Anti-HCV Antibodies (s/co)	SVC ^b (n = 34)			Non-SVC (n = 31)	p-value SVC vs. Non-SVC	p-value before SVC vs. after SVC
	Total	Before SVC	After SVC			
At Baseline/First Visit	78.7 (60.7-93.8)	n.a. ^c	n.a.	93.9 (67.8-111.9)	0.26	n.a.
Median during follow-up	66.2 (47.8-79.5)	71.0 (55.8-80.0)	55.1 (17.9-71.8)	105.5 (75.4-123.6)	<0.0001	0.04
Serial during follow-up ^d	62.7 (35.2-85.0)	79.4 (66.3-103.0)	56.0 (25.4-79.3)	98.4 (70.4-127.4)	<0.0001	<0.0001

^a Data given as median (interquartile range).

^b Spontaneous Viral Clearance (SVC) was defined as a series of at least 3 negative HCV RNA results within 12 months after the estimated point of infection. ^c n.a. denotes not applicable.

^d All anti-HCV antibody measures per patient during the first 12 months from the estimated date of infection were considered and weighted equally. P-value for group comparison calculated from linear-mixed effects regression.

important predictors of absence of HCV viremia [28]. Our data provide additional information regarding the timing of emergence of this antibody pattern, showing that the HCV-specific humoral immune response declines early after clearance, once antigenic stimulus is removed.

Our study does have potential limitations that should be considered. First, patients in our cohort were predominantly symptomatic and of female sex, with both characteristics previously being shown to be associated with favourable outcome in acute HCV infection [6]. Second, exact date of exposure was not available for all patients and had to be estimated on the basis of established criteria. However, sensitivity analyses previously conducted by our group [20] indicated that the impact of this limitation is negligible. Finally, sample size eligible for the pre-sent analyses was relatively small and time periods between prospective follow-up visits and numbers of serial antibody measures varied among study participants, preventing us from evaluating antibody responses at uniform time points for all patients during follow-up.

Conclusions

Our data indicate a rapid short-term decline of antibody values in patients with acute spontaneous resolving HCV infection, with the dynamics of this decline being significantly faster than previously appreciated. These findings suggest that HCV antibody testing performed years after infection might be less reliable than currently thought as a marker for HCV exposure, with underestimation of the rate of HCV infection and spontaneous clearance. Serial anti-HCV antibody ratio measurements may also distinguish outcome and could be useful for prognosis in settings where HCV RNA testing is unavailable or constrained by resource limitations.

Acknowledgements

Our research was supported by National Institute of Health (NIH) grant AI066345-05, and CGLAB/Ministry of Health, Brazil.

List of abbreviations

HCV: hepatitis C virus; SVC: spontaneous viral clearance; ALT: alanine aminotransferase; s/co: sample absorbance to cut-off ratio

Conflicts of interest

All authors: no conflicts

Individual Authors' contributions

AMS, AYK, GML, JSzW, GPB, EL, LLL: Conception and design of study
PSF, CFG, CAF, CEV, AJA, JMO, CFTY, LK, EL, LLL: Acquisition of data and data management
AMS, SL, LJB, HU SS, LK, LLL: Statistical analysis and interpretation of data
AMS, AYK, GML, JSzW, SS, LLL: Drafting of manuscript
AMS, AYK, GML AJA, JSzW, HU, SS, LLL: Critical revising of manuscript for important intellectual content
All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Department of Medical Statistics, Informatics and Health Economics, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria. ²Division of Infectious Diseases, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA. ³Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA. ⁴Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Hepatitis Division, Central Public Health Laboratory Noel Nutels, Rio de Janeiro, Brazil. ⁶Hematology Unit, Gaffrée & Guinle University Hospital, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ⁷Viral Technology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. ⁸Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁹Emerging Pathogens Laboratory, Fondation Merieux, Lyon, France. ¹⁰Institute of Statistics, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria. ¹¹Gerontology Research Center, National Institute on Aging, Baltimore, USA.

Received: 22 July 2010 Accepted: 12 January 2011

Published: 12 January 2011

References

- 1 Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechter M, Backmund M, Pape GR: Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003, 125:80-88.
- 2 Corey KE, Ross AS, Wurcel A, Schulze Zur Wiesch J, Kim AY, Lauer GM, Chung RT: Outcomes and treatment of acute hepatitis C virus infection in a United States population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006, 4:1278-1282.
- 3 The Global Burden of Hepatitis C Working Group: Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol* 2004, 44:20-29.
- 4 Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ: Acute hepatitis C. *Lancet* 2008, 372:321-332.
- 5 Thomas DL, Seeff LB: Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005, 9:383-398.
- 6 Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ: Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: A systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006, 13:34-41.
- 7 Hofer H, Watkins-Riedel T, Janata O, Penner E, Holzmann H, Steindl-Munda P, Gangl A, Ferenci P: Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. *Hepatology* 2003, 37:60-64.
- 8 Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, Santantonio T, Mayer J, Zankel M, Pastore G, Dietrich M, Trautwein C, Manns MP, German Acute Hepatitis C Therapy Group: Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 2001, 345:1452-1457.
- 9 Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE: Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* 2008, 47:321-331.
- 10 Wang CC, Krantz E, Klarquist J, Krows M, McBride L, Scott EP, Shaw-Stiffel T, Weston SJ, Thiede H, Wald A, Rosen HR: Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: Modes of acquisition and factors influencing viral clearance. *J Infect Dis* 2007, 196:1474-1482.
- 11 Sharaf Eldin N, Ismail S, Mansour H, Rekecawicz C, El-Houssinie M, El-Kafrawy S, El Aidi S, Abdel-Hamid M, Esmat G, Pol S, Fontanet A, Mohamed MK: Symptomatic acute hepatitis C in Egypt: diagnosis, spontaneous viral clearance, and delayed treatment with 12 weeks of pegylated interferon alfa-2a. *PLoS One* 2008, 3(12):e4085.
- 12 Cox AL, Page K, Bruneau J, Shoukry NH, Lauer GM, Kim AY, Rosen HR, Radziewicz H, Grakoui A, Fierer DS, Branch AD, Kaplan DE, Chang KM: Rare birds in North America: acute hepatitis C cohorts. *Gastroenterology* 2009, 136:26-31.
- 13 Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B: Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000, 6:578-582.
- 14 Orland JR, Wright TL, Cooper S: Acute hepatitis C. *Hepatology* 2001, 33:321-327.
- 15 Netski DM, Mosbrugger T, Depla E, Maertens G, Ray SC, Hamilton RG, Roundtree S, Thomas DL, McKeating J, Cox A: Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005, 41:667-675.

- 16 Chen M, Sällberg M, Sönnernborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D, Milich DR: Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1999, 116:135-143.
- 17 Heller T, Rehmann B: Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* 2005, 25:7-17.
- 18 Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA: Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:10149-10154.
- 19 Nikolaeva LI, Blokhina NP, Tsurikova NN, Voronkova NV, Miminoshvili MI, Braginsky DM, Yastrebova ON, Booyinskaya OB, Isaeva OV, Michailov MI, Archakov AI: Virus-specific antibody titers in different phases of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2002, 9:429-437.
- 20 Lewis-Ximenez LL, Lauer GM, Schulze Zur Wiesch J, de Sousa PS, Ginuino CF, Paranhos-Baccalá G, Ulmer H, Pfeiffer KP, Goebel G, Pereira JL, Mendes de Oliveira J, Yoshida CF, Lampe E, Velloso CE, Alves Pinto M, Coelho HS, Almeida AJ, Fernandes CA, Kim AY, Strasak AM: Prospective Follow-Up of Patients with Acute Hepatitis C Virus Infection in Brazil. *Clin Infect Dis* 2010, 50:1222-1230.
- 21 Amin J, Law MG, Micallef J, Jauncey M, Van Beek I, Kaldor JM, Dore GJ: Potential biases in estimates of hepatitis C RNA clearance in newly acquired hepatitis C infection among a cohort of injecting drug users. *Epidemiol Infect* 2007, 135:144-150.
- 22 Cox AL, Netski DM, Mosbrugger T, Sherman SG, Strathdee S, Ompad D, Vlahov D, Chien D, Shyamala V, Ray SC, Thomas DL: Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005, 40:951-958.
- 23 McGovern BH, Birch CE, Bowen MJ, Reyor LL, Nagami EH, Chung RT, Kim AY: Improving the diagnosis of acute hepatitis C virus infection with expanded viral load criteria. *Clin Infect Dis* 2009, 49:1051-1060.
- 24 Messick K, Sanders JC, Goedert JJ, Eyster ME: Hepatitis C viral clearance and antibody reactivity patterns in persons with haemophilia and other congenital bleeding disorders. *Haemophilia* 2001, 7:568-574.
- 25 Lu SN, Tung HD, Chen TM, Lee CM, Wang JH, Hung CH, Chen CH, Changchien CS: Is it possible to diagnose acute hepatitis C virus (HCV) infection by a rising anti-HCV titre rather than by seroconversion? *J Viral Hepat* 2004, 11:563-570.
- 26 Lefrère JJ, Guiramand S, Lefrère F, Mariotti M, Aumont P, Lerable J, Petit JC, Girot R, Morand-Joubert L: Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1997, 175:316-322.
- 27 Shata MT, Tricoche N, Perkus M, Tom D, Brotman B, McCormack P, Pfahler W, Lee DH, Tobler LH, Busch M, Prince AM: Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees. *Virology* 2003, 314:601-616.
- 28 Bossi V, Galli C: Quantitative signal of anti-HCV by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2004, 30:45-49.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed

here: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/15/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-11-15

Cite this article as: Strasak et al.: Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2011 11:15.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

