

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Medicina Tropical  
Mestrado acadêmico

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO TESTE DE AVIDEZ ANTI-HCV IgG  
PARA CONFIRMAR EXPOSIÇÃO RECENTE AO VÍRUS DA HEPATITE C**

LAIS DURÇO COIMBRA

Rio de Janeiro  
Maio, 2016

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de pós-graduação em Medicina Tropical**

LAIS DURÇO COIMBRA

**Padronização e aplicação do teste de avidéz anti-HCV IgG para  
confirmar exposição recente ao vírus da hepatite C**

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

**Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lia Laura Lewis Ximenez de Souza Rodrigues  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Soriano Figueiredo Nunes**

Rio de Janeiro  
Maio, 2016

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

C679 Coimbra, Lais Durço

Padronização e aplicação do teste de avidéz anti-HCV IgG para  
confirmar exposição recente ao vírus da hepatite C / Lais Durço Coimbra.  
– Rio de Janeiro, 2016.  
xi, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Medicina Tropical, 2016.  
Bibliografia: f. 55-65

1. Hepatite C aguda. 2. Diagnóstico. 3. Índice de avidéz. 4. IgG anti-  
HCV. 5. Hepatite C crônica. I. Título.

CDD 616.3623

## DEDICATÓRIA

*Ao meu filho, Henrique, que trouxe um sentido maior para tudo o que faço na vida. Iniciei o mestrado por mim, mas hoje termino por ele.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me guiar nessa trajetória e me dar forças para nunca desistir.

À minha orientadora, Dra Lia, por permitir que eu fizesse parte da sua equipe e confiar que eu fosse capaz de realizar este trabalho.

À minha coorientadora, Dra Andreza Figueiredo, por ser a base estrutural de todo esse trabalho. Por me segurar pela mão e mostrar como seguir. Agradeço por acreditar em mim quando eu mesma não conseguia.

Ao pesquisador e amigo Dr Ricardo Wagner, pela generosidade em ter me ajudado num momento de extrema incerteza da minha vida, me apoiando e sempre me dizendo “você vai conseguir!”. Obrigada.

Ao meu professor, Dr Ivanildo de Souza, profissional no qual me inspiro, o primeiro e principal incentivador para que eu seguisse a carreira acadêmica. Obrigada por ter acreditado desde o início.

À amiga Tayany de Deus, por me trazer sempre a calma quando tudo parecia turbulento. Obrigada pela amizade, parceria, ajuda sincera e verdadeira.

Ao amigo Paulo Sérgio, pelo carinho, presteza, e boa vontade de sempre, sendo figura essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

À amiga e parceira de jornada, Joyce Magalhães, por ser meu braço direito e esquerdo. Agradeço por todos os dias de dedicação e trabalho. Esse trabalho também é seu. Obrigada.

A todos os amigos do AHV e LAHEP que estiveram presentes nessa trajetória. Obrigada pela companhia, pelo apoio e amizade. Obrigada por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho.

À minha turma de mestrado, pelo companheirismo, pela presença constante nos momentos de adversidade, pela troca de experiências e amizade.

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas e não mediram esforços para que tudo fosse possível.

Ao meu irmão, meu verdadeiro amigo, por se manter ao meu lado, me ajudando com palavras de apoio e interesse no que faço.

*“A persistência é o caminho do êxito.”*  
*Charlin Chaplin*

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Padronização e aplicação do teste de avidéz anti-HCV IgG para confirmar exposição recente ao vírus da hepatite C

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Lais Durço Coimbra

A identificação da fase aguda da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é realizada pela avaliação clínico laboratorial e confirmada pela soroconversão de anti-HCV associada a HCV-RNA positivo. Entretanto, os indivíduos infectados são predominantemente assintomáticos e a informação sorológica prévia dos pacientes é normalmente escassa. O diagnóstico da fase aguda da hepatite C com base na detecção de IgM não é utilizado devido a este anticorpo estar presente durante todo o curso da doença. Diversos estudos voltados para análise da força de ligação (avidéz) anticorpo-antígeno tem sido descritos como forma de identificação da fase aguda da hepatite C. No entanto, apesar da existência destas pesquisas, testes de avidéz como diagnóstico de rotina para a detecção de casos agudos da infecção ainda não estão disponíveis no Brasil. Desta forma, o presente estudo visa padronizar, avaliar e aplicar a técnica em questão a partir da adaptação do kit ELISA comercial Anti-HCV Murex (4.0 version). Para esta finalidade, foram empregadas 570 amostras de 147 pacientes em diferentes fases da infecção pelo HCV, acompanhados pelo Ambulatório de Hepatites Virais – AHV (Laboratório de Hepatites Virais/IOC/Fiocruz). O teste de avidéz consistiu na adição de uma etapa de incubação com guanidina 1,5M ao protocolo do kit comercial. A partir da utilização de amostras de pacientes com soroconversão comprovada e data de infecção conhecida foi possível diferenciar as fases da doença em agudo recente (até 4 meses), agudo tardio (5-6 meses), crônica (acima de 6 meses). Empregando-se o valor de corte de  $\leq 64\%$  para fase aguda, zona cinza entre 65-77% e  $\geq 78\%$  para fase crônica, foram obtidos: sensibilidade de 90% e especificidade de 95% até 4 meses após infecção, e sensibilidade de 73% e especificidade de 75% entre 5-6 meses após infecção. Do terceiro ao sexto mês após infecção o índice de avidéz elevou de 37% para 65%. O acompanhamento longitudinal de pacientes desde a fase aguda até 30 meses demonstrou elevação do índice de avidéz até o oitavo mês de infecção, mantendo-se elevado e com baixa variação subsequente em pacientes que evoluíram para a fase crônica da doença, no entanto, ocorreu a queda do índice de avidéz a partir de 10 meses de infecção em indivíduos que evoluíram para resolução espontânea. Não houve diferença significativa do índice de avidéz na fase aguda entre pacientes que evoluíram para cronicidade e que evoluíram para resolução espontânea. De junho de 2014 a janeiro de 2016, o teste de avidéz identificou 20% dos pacientes com hepatite C aguda dentre os casos suspeitos na rotina de diagnóstico ambulatorial. O primeiro teste de avidéz desenvolvido no país apresentou elevadas sensibilidade e especificidade, e demonstrou ser útil para a identificação das fases da infecção pelo HCV.

**Palavras chave:** hepatite C aguda, diagnóstico, índice de avidéz, IgG anti-HCV, hepatite C crônica

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Standardization and application of an avidity test for anti-HCV IgG to confirm recent exposure to the hepatitis C virus**

**ABSTRACT**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Lais Durço Coimbra**

The identification of the acute phase of infection by the hepatitis C virus (HCV) is achieved via laboratorial evaluation and confirmed through anti-HCV seroconversion associated with positive HCV RNA. However, the individuals infected are predominantly asymptomatic and the patients' previous serological data is normally absent. The diagnosis of the acute phase of hepatitis C based in the detection of IgM is not utilised due to this antibody being present during the entire course of the disease. Many studies geared towards the analysis of binding strength (avidity) have described this as a form of identifying the acute phase of the hepatitis C infection. However, despite the existence of these studies, avidity tests for routine diagnosis of acute cases of infection are still not available in Brazil. Therefore, this study aims to standardize this technique through the adaptation of a commercial ELISA kit (Murex Biotech anti-HCV, Version 4.0). To this end, 570 samples of 147 patients in different stages of HCV infection were employed, overseen by the Ambulatório de Hepatites Virais – AHV (Laboratório de Hepatites Virais/IOC/Fiocruz). The avidity test consisted in the addition of an incubation step with 1.5M guanidine hydrochloride according to the commercial kit protocol. From the utilisation of patient samples with proven seroconversion and date of infection it was possible to differentiate the stages of the disease as recent acute (until 4 months), late acute (5-6 months) and chronic (above 6 months). Employing the cut value of  $\leq 64\%$  for the acute phase, grey zone between 65-77% and  $\geq 78\%$  for the chronic phase, the following were obtained: 90% sensibility and 95% specificity until 4 months after the infection, and 73% sensibility and 75% specificity between 5-6 months after the infection. From the third to the sixth month after the infection the avidity rating increased from 37% to 65%. The longitudinal overseeing of the patients since the acute phase until 30 months showed elevation in the avidity rating until the eight month of infection, keeping itself raised and with low subsequent variation in patients that evolved to a chronic stage of the disease. However, a drop in the avidity rating took place from the tenth month of infection in individuals who evolved to a spontaneous resolution. There was no meaningful difference in the avidity rating in the second acute phase among patients who evolved to a spontaneous resolution. From June 2014 to January 2016, the avidity test identified 20% of the patients with acute hepatitis C amongst suspicious cases in the ambulatorial diagnostic routine. The first avidity test developed in the country presented high sensibility and specificity rates, showing its usefulness in the identification of the HCV infection phases.

**Keywords:** Acute hepatitis C; diagnostic; avidity index; , IgG anti-HCV; Chronic hepatitis C

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 - Classificação taxonômica e estrutura genômica do HCV .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 - Epidemiologia .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 - Transmissão .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 - Replicação do HCV .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 - Patogênese .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 - Tratamento .....</b>	<b>8</b>
<b>1.7 - Evolução clínica da hepatite C .....</b>	<b>9</b>
<i>1.7.1– Fase aguda .....</i>	<i>9</i>
<i>1.7.2– Evolução crônica.....</i>	<i>10</i>
<i>1.7.3– Resolução espontânea .....</i>	<i>11</i>
<b>1.8 - Diagnóstico .....</b>	<b>11</b>
<i>1.8.1– Teste rápido.....</i>	<i>11</i>
<i>1.8.2– Ensaio imunoenzimático.....</i>	<i>12</i>
<i>1.8.3– Testes moleculares .....</i>	<i>13</i>
<i>1.8.4– Genotipagem .....</i>	<i>14</i>
<i>1.8.5– Exames complementares .....</i>	<i>14</i>
<b>1.9 – Resposta imune humoral .....</b>	<b>16</b>
<i>1.9.1– Estrutura dos anticorpos .....</i>	<i>16</i>
<i>1.9.2– Expansão clonal e mudança de isótipos.....</i>	<i>20</i>
<i>1.9.3– Resposta humoral na hepatite C .....</i>	<i>23</i>
<i>1.9.4– Teste de avidéz.....</i>	<i>23</i>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 – Objetivo geral .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 – Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 – População de estudo .....</b>	<b>28</b>
<i>4.1.1– População de estudo para padronização do teste .....</i>	<i>28</i>
<i>4.1.2– População de estudo para avaliação do índice de avidéz ao longo da infecção .....</i>	<i>28</i>
<i>4.1.3– População de estudo acompanhada na rotina do Ambulatório de Hepatites Virais para aplicação do teste de avidéz .....</i>	<i>29</i>

4.1.4–	<i>Considerações éticas</i>	29
<b>4.2 –</b>	<b>Levantamento de dados secundários</b>	<b>29</b>
4.2.1–	<i>Dados demográficos, clínicos e laboratoriais</i>	29
<b>4.3 –</b>	<b>Padronização e validação do teste de avidéz adaptado</b>	<b>30</b>
4.3.1–	<i>Teste de parâmetros</i>	30
4.3.2–	<i>Análise de repetibilidade pelo coeficiente de variação</i>	30
4.3.3–	<i>Acompanhamento de controles internos</i>	31
4.3.4–	<i>Avaliação dos controles positivo e negativo do kit Murex Anti-HCV version 4.0 (DiaSorin)</i>	31
<b>4.4 –</b>	<b>Análise de desempenho do teste de avidéz adaptado</b>	<b>32</b>
4.4.1–	<i>Determinação da sensibilidade, especificidade, valor de corte e zona cinza</i>	32
4.4.2–	<i>Comparação do teste de avidéz adaptado neste estudo com o teste de avidéz comercial DS-EIA-Anti-HCV Avidity (Diagnostic System Italy, DSI, Itália)</i>	32
4.4.3 –	<i>Análise de concordância entre o teste de avidéz adaptado e a classificação dos pacientes de acordo com critérios clínico-laboratoriais</i>	32
<b>4.5 –</b>	<b>Aplicação do teste de avidéz adaptado</b>	<b>33</b>
4.5.1–	<i>Identificação de pacientes na fase aguda da infecção.</i>	33
4.5.2–	<i>Avaliação do perfil do índice de avidéz ao longo da infecção.</i>	33
4.5.3–	<i>Análise do índice de avidéz em pacientes atendidos na rotina do Ambulatório de Hepatites.</i>	33
<b>4.6 –</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>34</b>
<b>5. RESULTADOS</b>		<b>35</b>
<b>5.1 –</b>	<b>Levantamento de dados secundários</b>	<b>35</b>
<b>5.2 –</b>	<b>Padronização e validação do teste de avidéz adaptado</b>	<b>37</b>
5.2.1–	<i>Teste de parâmetros do teste de avidéz adaptado com guanidina a 1M e 1,5M por 15 minutos a 37°C.</i>	37
5.2.2–	<i>Análise de repetibilidade do teste de avidéz adaptado pelo coeficiente de variação</i>	39
5.2.3–	<i>Acompanhamento de controles internos</i>	39
5.2.4–	<i>Avaliação dos controles positivo e negativo do kit Murex Anti-HCV version 4.0 (DiaSorin)</i>	41

<b>5.3 – Análise de desempenho do teste de avidéz adaptado .....</b>	<b>42</b>
5.3.1– <i>Determinação da sensibilidade, especificidade, valor de corte e zona cinza</i> .....	42
5.3.2– <i>Comparação do teste de avidéz adaptado neste estudo com o teste de</i> <i>avidéz comercial DS-EIA-Anti-HCV Avidity (Diagnostic System Italy, DSI, Itália</i> .....	43
5.3.3 - <i>Análise de concordância entre o teste de avidéz adaptado e a classificação</i> <i>dos pacientes de acordo com critérios clínico-laboratoriais .....</i>	44
<b>5.4 – Aplicação do teste de avidéz adaptado .....</b>	<b>44</b>
5.4.1– <i>Identificação de pacientes na fase aguda da infecção. ....</i>	44
5.4.2– <i>Avaliação do perfil do índice de avidéz ao longo da infecção .....</i>	46
5.4.3– <i>Análise do índice de avidéz em pacientes atendidos na rotina do</i> <i>Ambulatório de Hepatites.....</i>	48
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>54</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo II .....</b>	<b>68</b>

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

### **FIGURAS:**

<b>FIGURA 1:</b> Modelo esquemático do genoma do HCV.....	2
<b>FIGURA 2:</b> Prevalência estimada da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica.....	3
<b>FIGURA 3:</b> Distribuição mundial dos genótipos do HCV.....	4
<b>FIGURA 4:</b> Replicação do HCV na célula hospedeira.....	7
<b>FIGURA 5:</b> Representação da estrutura básica dos anticorpos.....	17
<b>FIGURA 6:</b> Modelo esquemático dos domínios Ig dos diferentes isótipos de anticorpos.....	18
<b>FIGURA 7:</b> Tipos de interações entre antígeno e anticorpo.....	19
<b>FIGURA 8:</b> Representação do complexo BCR dos linfócitos B.....	21
<b>FIGURA 9:</b> Modelo esquemático da expansão clonal dos linfócitos B.....	22
<b>FIGURA 10:</b> Representação clássica da resposta de IgM e IgG, e maturação da avidéz.....	24

### **TABELAS:**

<b>TABELA 1:</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população estudada.....	36
--	----

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

### ABREVIACOES E SIGLAS

AHV	Ambulatório de Hepatites Virais
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HCV	Anticorpo contra o antígeno do HCV
AST	Aspartato aminotransferase
BCR	Complexo receptor de antígenos nas células B
CD81	Grupo de diferenciação 81
CDRs	Regiões determinantes de complementaridade
CHs	Domínios Igs dos anticorpos
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLDN-1	Receptores claudin-1
CV	Coefficiente de variação
DO	Densidade tica
ELISA	Imunoensaio enzimático
E1	Glicoprotena do envelope 1
E2	Glicoprotena do envelope 2
GAG	Glicosaminoglicanos
GGT	Gama-glutamilttransferase
HAV	Vrus da hepatite A
HBV	Vrus da hepatite B
HCV	Vrus da hepatite C
HIV	Vrus da imunodeficincia humana
	Hepatite no-A, no-B
HNANB	
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IRES	Stio de entrada interno ribossomal
ITAMS	Motivos ricos em tirosina
LAHEP	Laboratório de Hepatites Virais
LDLR	Receptores de lipoproteína de baixa densidade
LRNHV	Laboratório de Referencia Nacional para Hepatites Virais
MI	Membrana de isolamento
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
OCLN	Ocludina
ORF	Fase de leitura aberta
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Reação em cadeia da polimerase
RER	Retículo endoplasmático rugoso
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RpRd	RNA polimerase/RNA dependente
RT-PCR	PCR em tempo real
SR-B1	Receptores do tipo classe B
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
3'UTR OU 3'NC	Região 3' não codificante ou não traduzida
5'UTR OU 5'NC	Região 5' não codificante ou não traduzida
VL	Região variável da cadeia leve do anticorpo
VH	Região variável da cadeia leve do anticorpo

## SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\pm$	Mais ou menos
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
%	Percentual

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) foi inicialmente descrito em 1989 por Choo et al., através da identificação molecular, por clonagem e sequenciamento genético, em chimpanzés experimentalmente infectados com o patógeno causador da Hepatite não A não B (HNANB) de indivíduos com hepatite pós transfusional. Deste modo, o agente causal HNANB, passou a ser denominado como HCV (Choo *et al.* 1989). Em seguida, surgiram os primeiros estudos para detecção de anticorpos anti-HCV, comprovando que pelo menos 80% dos casos de hepatite pós transfusional foram ocasionados por infecção pelo HCV (Donahue *et al.* 1992; Chen et al., 2006).

Desde então, a infecção pelo HCV tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública mundial, com especial relevância entre as causas de hepatite crônica e indicação de transplante hepático (Lavanchy, 2009; Ministério da Saúde, 2015; WHO, 2015).

### 1.1 Classificação taxonômica e estrutura genômica do HCV

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*. A partícula viral é formada por um envelope lipídico que envolve o nucleocapsídeo viral de assimetria icosaédrica formado por proteínas do core, que envolvem o material genético (Chevaliez *et al.*, 2006).

O genoma do HCV é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, de polaridade positiva composta por, aproximadamente, 9.600 nucleotídeos de comprimento. Nas extremidades 5' e 3' do filamento genético, encontram-se regiões não codificantes (UTRs) (Moradpour et al., 2013; Piñeiro *et al.*, 2012). A região 5'UTR está envolvida no processo de tradução do genoma viral em poliproteína, uma vez que o sítio de entrada ribossomal ou “*Internal Ribosome Entry Site (IRES)*” encontra-se inserido nesta região. A região 3'UTR encontra-se envolvida no processo de replicação viral (Li et al., 2015). Entre elas, encontra-se uma única região aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína precursora composta por 3.000 aminoácidos que origina proteínas estruturais (Core, E1 e E2) e não-estruturais (p7, NS2, NS3, NS4B, NS5A e NS5B) (Moradpour et al., 2013; Piñeiro *et al.*, 2012) (Figura 1).

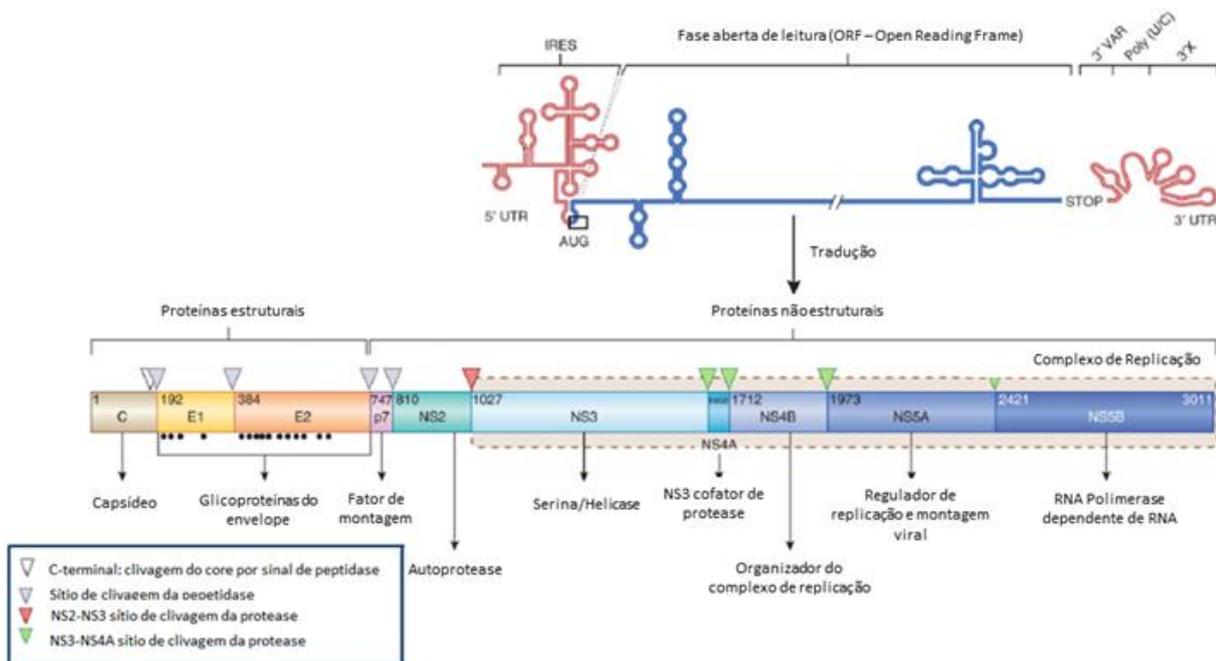


Figura 1: O genoma do HCV e o processamento da poliproteína. Parte Superior - Molécula de RNA do HCV composta por: uma região aberta de leitura (ORF) na parte central do filamento (azul) com extremidades não codificantes 5' e 3' UTRs (vermelho). Na região 5' UTR, ocorre a iniciação da tradução com a formação do sítio de entrada interno ribossomal (IRES).

Parte Inferior - Tradução IRES-mediada por ligações da ORF para formação de uma poliproteína (parte inferior) precursora de 10 proteínas estruturais e não estruturais.

\*Os números inseridos na poliproteína indicam os locais dos aminoácidos nos sítios de clivagem.

\*\*Pontos pretos indicam a glicosilação das proteínas do envelope. Fonte adaptada: Scheel, 2013.

O HCV apresenta uma alta variabilidade genética, acarretada por uma elevada taxa de replicação ( $10^4$  a  $10^8$  partículas virais/dia) associada à falta de mecanismos de reparo de mutações pela RNA polimerase (Zeuzem *et al.*, 1996). Desta forma, há a formação de *quasispecies*, que são variantes virais que possuem entre 90 - 99% de similaridade genética no mesmo hospedeiro (Tyczyno *et al.*, 2014), e que podem estar relacionadas com a permanência viral através do processo de evasão da resposta imunológica (Larrubia *et al.*, 2014).

De acordo com Smith *et al.* (2014), foram descritos 7 genótipos (1 a 7) e 67 subtipos para HCV com ampla distribuição geográfica, entretanto alguns genótipos encontram-se localizados em regiões específicas (Idress *et al.* 2008). Para os genótipos,

são descritas variações genéticas de 30 a 50%. Já os subtipos podem apresentar divergência de 15% a 30% (Simmonds et al. 2005, Hoofnagle, 2002).

## 1.2 – Epidemiologia

Dados recentes estimam que, por ano, de 3 a 4 milhões de pessoas se infectam com vírus da hepatite C e, em média, 350 mil indivíduos evoluem a óbito em decorrência da infecção (WHO, 2015). Cerca de 185 milhões encontram-se cronicamente infectadas, sendo a principal causa de transplantes hepáticos em países desenvolvidos (Mohd Hanafiah *et al.*, 2013).

No Brasil, a prevalência é de 1,4 a 1,7 milhões de casos de hepatite C crônica, com notificação de 10 mil novos casos por ano (Lavanchy, 2009; Ministério da saúde, 2015) (Figura 2).

Entre 70-80% dos indivíduos infectados pelo HCV são assintomáticos na fase aguda, sendo a maioria dos casos diagnosticada na fase crônica da infecção (Sagnelli *et al.*, 2014). Dos indivíduos infectados, presume-se que 70% passarão a desenvolver o quadro crônico da doença e até 30% evoluirão para resolução espontânea da infecção. Casos de cirrose hepática acontecerão entre 20-30% e 1-5% evoluirão para carcinoma hepatocelular (WHO, 2014).

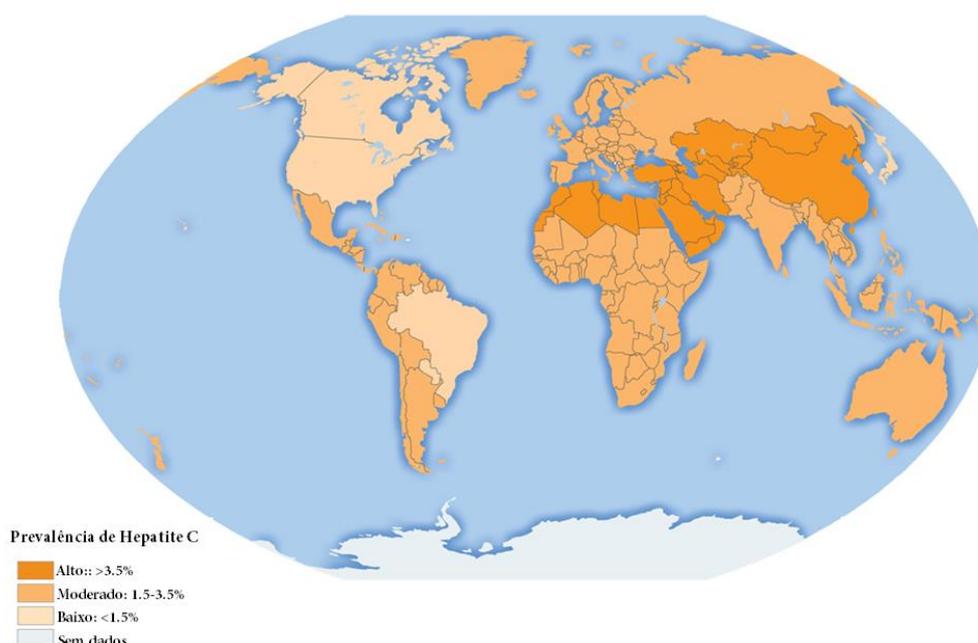


Figura 2: Distribuição mundial da Hepatite C.  
Fonte adaptada: CDC 2016; Mood Hanafiah, 2013.

Os genótipos 1, 2 e 3 são os mais prevalentes no mundo (Tresó *et al.*, 2013). O genótipo 4 encontra-se, principalmente, nas regiões norte e central da África. O genótipo 5 encontra-se, principalmente, na África do Sul e o genótipo 6 no sudeste Asiático (Messina *et al.*, 2014). O genótipo 7 foi isolado em um indivíduo do Congo, África (Smith *et al.*, 2014).

A partir de uma estimativa mundial, tem-se o genótipo 1 responsável por 83,4 milhões de casos de hepatite C, o genótipo 3 com 54,3 milhões de indivíduos infectados, seguido pelos genótipos 2, 4 e 6 que causam, respectivamente, 16,5 milhões, 15 milhões e 9,8 milhões de infecções por HCV (Messina *et al.*, 2014) (Figura 3).

No Brasil, o genótipo 1 aparece amplamente distribuído em todas as regiões geográficas, o genótipo 2 é mais encontrado na região Centro-Oeste, a frequência do genótipo 3 é maior na região Sul e o genótipo 4 foi encontrado apenas em casos isolados na região Sudeste (Lampe *et al.*, 2013; Campiotto *et al.*, 2005).

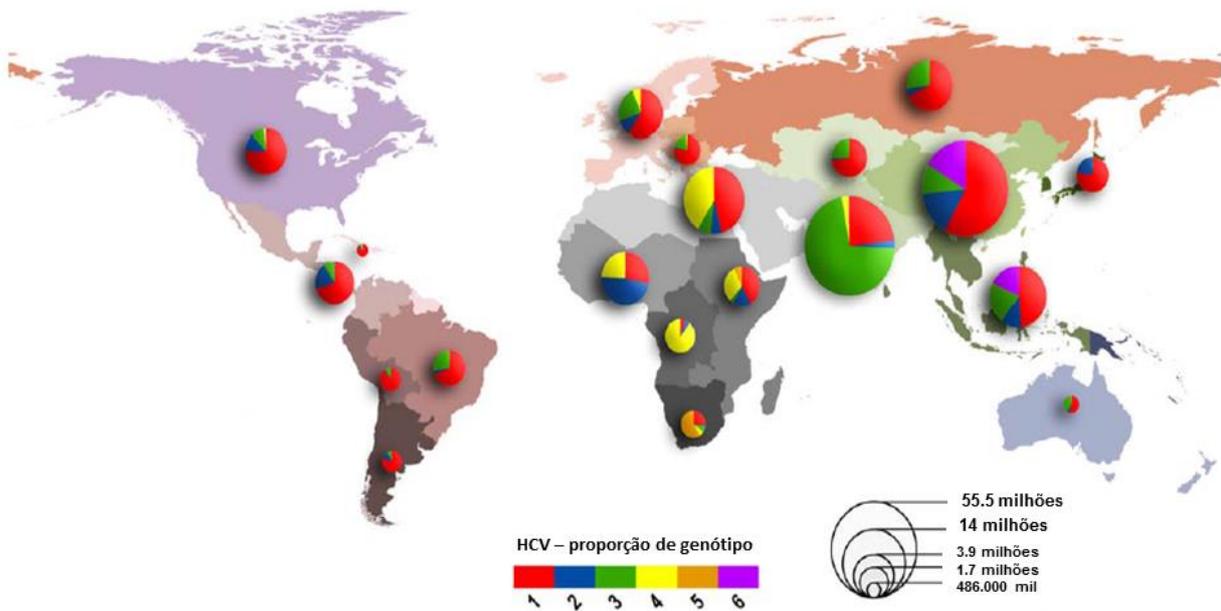


Figura 3: Prevalência relativa para cada genótipo por região.

\*Tamanho dos círculos é proporcional ao número de casos.

Fonte adaptada: Messina *et al.*, 2014.

### 1.3 – Transmissão

Desde os primeiros relatos do HCV, a transmissão por transfusão sanguínea era descrita como responsável por 90% dos casos de hepatite pós-transfusional registrados. No entanto, após o desenvolvimento de métodos sorológicos para detecção de anti-HCV e sua implantação em bancos de sangue como forma de triagem obrigatória em 1993, o risco de infecção associado à transfusão teve queda acentuada (Strauss 2001; Chan 2014).

Dessa forma, a hepatite pós-transfusional tornou-se cada vez mais rara. Atualmente, a principal via de transmissão do HCV é a parenteral (Strauss 2001; Mandell et al., 2010; Chan 2014). Dentre os diferentes mecanismos de transmissão parenteral destaca-se a transmissão via objetos perfurocortantes contaminados. Assim, usuários de drogas endovenosas e intranasais são classificados como grupo de risco, pela prática de compartilhamento de agulhas, seringas, espelhos e canudos (Lauer 2001; Kolling et al., 2007; Pereira *et al.*, 2013; Chan 2014). Essa via de transmissão também está relacionada à infecção em acidentes ocupacionais, realização de tatuagens e colocação de *piercings* com material reutilizado, procedimentos odontológicos, bem como o compartilhamento de materiais de uso pessoal (escova de dente, alicate de unha e lâmina de barbear) (Martins *et al.* 2011; Ministério da Saúde, 2015).

A via nosocomial, definida como infecção em meio hospitalar, é outra via importante no processo de transmissão do HCV. Pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, hemodiálise e exames invasivos, compõem mais um grupo vulnerável à contaminação pelo vírus, com aumento no número de casos de hepatite C em países como Brasil e Espanha (Santantonio *et al.* 2008; Martinez-Bauer *et al.* 2008; Ferreira *et al.* 2011; Pereira *et al.*, 2013).

A transmissão sexual tem sido relatada, principalmente, em indivíduos com prática sexual de risco (sem uso de preservativo), com múltiplos parceiros ou com trauma na mucosa em 1-5% (Thappa, 2000; Jou & Muir 2012; Bradshaw et al., 2014). Indivíduos portadores de HIV são descritos como um grupo de risco maior para contaminação com HCV por via sexual (Walsh, 2009; Hagan, et al., 2014; Gorgos, 2013). A transmissão vertical também já foi descrita, porém em menor número, 0,05%-5% (Yeung *et al.* 2014).

#### 1.4 –Replicação do HCV

O mecanismo de entrada do HCV nos hepatócitos inicia-se após a ligação da alça externa da glicoproteína viral E2 ao receptor celular CD81, proteína expressa na maioria das células nucleadas (Masciopinto et al., 2002; Irshad et al., 2013; Zeisel et al., 2013), bem como a interação com receptores do tipo classe B (SR-B1), receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) e glicosaminoglicanos (GAG) (Helle, 2008; Ke, 2012).

Acredita-se que o LDLR atue como receptor primário da partícula viral, direcionando-a, em seguida para GAG, SR-B1 e CD81. Estudos descrevem os receptores claudin-1 (CLDN-1) e ocludina (OCLN) como responsáveis pelo último estágio no processo de adsorção viral, desencadeando a endocitose mediada por clatrina, e posterior fusão das membranas viral e do endossoma através da redução de pH (Tscherne *et al.* 2006; Scheel et al., 2013). Ocorre então a liberação da fita simples de RNA positiva do HCV no citoplasma do hepatócito e é iniciado o processo de tradução a partir do sítio interno de entrada ribossomal (IRES) na extremidade 5'UTR.

Após a tradução do genoma viral, forma-se a poliproteína precursora que é direcionada para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde será clivada, dando origem a proteínas estruturais e não estruturais (Figura 1) (Penin *et al.* 2004; Chevaliez et al., 2006; Moradpour et al., 2013; Piñeiro *et al.*, 2012).

Por fim, são formadas fitas de RNA de polaridade negativa através da ação da RNA polimerase/RNA dependente (RpRd), que servem de molde para a síntese de fitas de RNA de polaridade positiva. O processo de encapsidação dessas fitas ocorre no RER. A partícula viral em formação passará por uma etapa de envelopamento e maturação no complexo de golgi, e posterior exocitose (Lindenbach & Rice 2005; Pawlotsky *et al.* 2007; Scheel et al., 2013) (Figura 4).

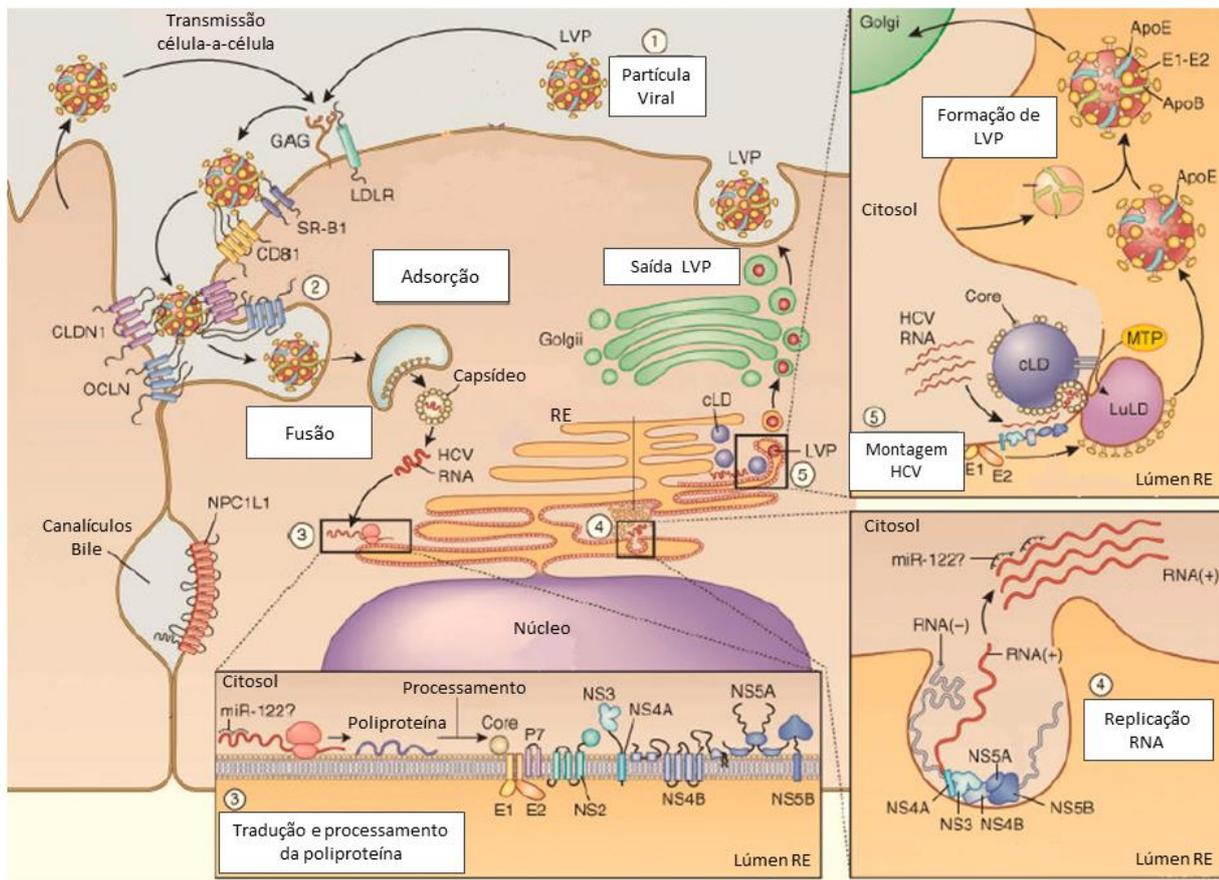


Figura 4 - Representação do ciclo replicativo do HCV. (1) Interação da partícula viral com receptores celulares. (2) Endocitose e desnudamento. (3) Tradução e processamento da poliproteína. (4) Replicação do HCV em esferas da membrana do RER. (5) Montagem da partícula viral e liberação para o meio extracelular. Fonte adaptada: Scheel, 2013.

### 1.5 – Patogênese

O HCV não é diretamente citotóxico. As alterações hepatocelulares estão relacionadas, principalmente, a mecanismos mediados pela resposta imunológica do hospedeiro. Após a entrada do vírus no meio intracelular, o processo de replicação ativa fatores metabólicos que levarão ao colapso celular através de mecanismos como necrose, citólise imuno-mediada, estresse oxidativo (causando efeitos como resistência à insulina, esteatose hepática, cirrose e hepatocarcinoma) (Cerny et al., 1999; Strauss, 2001; Irshad et al, 2006; Ke et al., 2012; Irshad et al., 2013).

Estudos têm proposto o estresse do retículo endoplasmático rugoso (RER) como responsável pela formação de esteatose hepática através da supra-regulação do metabolismo lipídico. Devido à replicação do HCV ocorrer na membrana do RER, aumentando a disponibilidade no meio intracelular de componentes lipídicos essenciais para o bom funcionamento da maquinaria viral (Kapadia et al., 2005; Syed et al, 2010) O estresse do RER também tem sido apontado como fator importante no

desenvolvimento de hepatocarcinoma, a partir do acúmulo de uma chaperona (GRP78) (Shuda et al., 2003).

A ocorrência da inflamação hepática e da hepatite fulminante tem sido relacionada com o extravasamento tecidual de neutrófilos e expressão de quimiocinas desencadeado pela ativação da morte por apoptose por via extrínseca (Maher et al., 1997; Faouzi et al., 2001). Em contrapartida, a partir do processo de autofagia celular, a apoptose pode ser regulada negativamente a fim de aumentar a sobrevivência celular, o que conduz a evolução para hepatocarcinogênese (Degenhardt et al., 2006; Amaravadi et al., 2007).

### **1.6 – Tratamento:**

Desde 1998, a terapia escolhida para tratamento de indivíduos com hepatite C crônica era a Ribavirina. Em 2001, iniciou-se a associação de Interferon com ribavirina. Posteriormente, potentes antivirais (inibidores de proteases) Boceprevir e Telaprevir foram aprovados nos Estados Unidos da América (EUA) (Vachon et al., 2011) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil para serem utilizados em associação aos fármacos já existentes (Portal Brasil, 2011).

Atualmente, novos fármacos como os inibidores de proteases de segunda geração (Simeprevir) (Jacobson *et al.*, 2014), inibidores de polimerase (Sofosbuvir) e inibidores do complexo replicativo HCV-NS5A (Daclatasvir) são medicamentos promissores para o tratamento da hepatite C (Asselah, 2014). Estes apresentam vantagens, como facilidade posológica; tratamento por menor período de tempo e com menos efeitos adversos; menor necessidade de exames de biologia molecular para avaliação do tratamento; e melhores resultados do que as modalidades de tratamento anteriormente indicadas (Kohli et al., 2014).

O tratamento de pacientes com hepatite C visa à erradicação do vírus para diminuir a ocorrência de complicações da doença hepática crônica (cirrose e carcinoma hepatocelular). Dessa forma, aumentando a expectativa e a qualidade de vida do paciente, e reduzindo a transmissão do HCV (EASL, 2015). A erradicação do vírus por meio do tratamento é constatada com o resultado de HCV-RNA indetectável a partir da 12ª semana pós-tratamento, conforme o regime terapêutico instituído. Essa condição caracteriza a Resposta Viroológica Sustentada (RVS). Classicamente, o tratamento é iniciado apenas na fase crônica da infecção pelo HCV. Entretanto, o tratamento na fase aguda da hepatite C tem sido proposto como forma de reduzir o risco de progressão para hepatite crônica (Wedemeyer et al., 2004). A detecção precoce da infecção aguda vem

sendo considerada uma importante medida de controle do HCV, uma vez que o início tardio da terapia tem sido relacionado à uma menor RVS. O tratamento precoce eleva a RVS a valores superiores a 80% (Tsai et al.,1996; Coreyet al., 2010; Jaeckel et al., 2001).

De acordo com o MS (2015), os critérios para tratamento de indivíduos na fase aguda da infecção são:

- Pacientes sintomáticos: aguardar 12 semanas após o início dos sintomas, caso não haja clareamento viral espontâneo (HCV-RNA negativo);

- Pacientes assintomáticos: iniciar o tratamento imediatamente após o diagnóstico, em média quatro semanas após a exposição, principalmente nas populações de maior risco: pessoas expostas a acidentes com instrumentos perfurocortantes, pacientes de hemodiálise e pessoas que usam drogas endovenosas.

## **1.7 – Evolução clínica da hepatite C**

### *1.7.1 – Fase aguda*

A hepatite C aguda ocorre, geralmente, com evolução subclínica. Cerca de 80% dos casos são assintomáticos, e aqueles com manifestações clínicas (20%), apresentam sinais e sintomas inespecíficos como dor abdominal, anorexia, astenia, mal-estar, náuseas, vômitos. A icterícia está presente em apenas 10% dos casos sintomáticos. As manifestações clínicas surgem em um período entre 6 e 20 semanas após infecção pelo vírus, que precede a soroconversão (primeiro anti-HCV positivo após 6 meses de exposição ao HCV) (MS, 2015; CDC, 2016).

O período agudo da hepatite C é caracterizado clinicamente pela elevação das transaminases, principalmente alanina aminotransferase (ALT), com ou sem a presença de sintomas. A elevação de ALT pode iniciar a partir de 2 semanas de infecção, como consequência da necrose do tecido hepático, atingindo  $\geq 10$  vezes o valor limite de normalidade (Major *et al.* 2004; Chung 2005).

A detecção de HCV-RNA ocorre anteriormente à detecção de anti-HCV no soro/plasma a partir de 2 semanas após exposição ao HCV. Os níveis máximos de detecção viral ( $10^5$  a  $10^7$  UI/mL) aparecem durante as primeiras semanas de infecção, sendo identificados antes do pico sérico de transaminases (Chen & Timothy 2006; Ozaras & Tahan 2009).

Dessa forma, a definição de fase aguda baseia-se nos seguintes critérios (MS, 2015):

- Soroconversão documentada do anti-HCV e recente (há menos de seis meses) e (anti-HCV não reagente no início dos sintomas ou no momento da exposição, com conversão para anti-HCV reagente na segunda dosagem, realizada com intervalo de 90 dias); ou

- Anti-HCV não reagente e detecção do HCV-RNA por até 90 dias após o início dos sintomas ou da data da exposição, quando esta for conhecida em indivíduos com histórico de exposição potencial ao HCV.

### 1.7.2 – *Evolução crônica:*

A persistência do HCV por mais de seis meses no organismo resulta na evolução para fase crônica da doença, em 55% a 85% dos indivíduos infectados (WHO 2014). Esse período é caracterizado, geralmente, por níveis séricos flutuantes de ALT (em 60% a 70% dos infectados) e níveis de HCV-RNA relativamente estáveis (Kuramoto *et al.* 2002; Alberti *et al.* 2005; Mandell *et al.*, 2010).

Como definição de fase crônica da hepatite C tem-se os critérios (MS, 2015):

- Anti-HCV reagente por mais de seis meses, e
- Confirmação diagnóstica com HCV-RNA detectável.

Na maioria dos casos, a evolução crônica da infecção ocorre de forma silenciosa (Seeff, 2002). Pode ocorrer evolução para cirrose hepática (20% dos indivíduos), varizes esofágicas, ascite e encefalopatia hepática, nos casos graves (Mincis & Mincis, 2008). Na ausência de tratamento, até 5% dos pacientes chegam a desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC) (Chen & Timothy 2006). Fatores virais, como as proteínas codificadas por regiões subgenômicas do vírus e suas *quasiespécies*, já foram descritos como mecanismos que contribuem para à patogênese da hepatite C (Arrese *et al.* 2010; Kondo *et al.* 2011; Irshad *et al.* 2013).

Estudos sugerem que a evolução para fibrose hepática, cirrose e CHC incluem fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro como: idade superior a 40 anos; sexo masculino; coinfeção com HBV e/ou HIV; consumo de álcool, imunossupressão; quadros de esteatose hepática e resistência insulínica (ocasionando varizes esofágicas, hemorragia digestiva, ascite, trombocitopenia) (Poynard *et al.*, 2010; Focaccia, 2013).

Tais estudos reforçam a necessidade da detecção precoce da infecção pelo HCV, como forma de prevenção e diminuição da morbimortalidade do agravo, com tratamento imediato a pacientes com risco de complicações severas (Lavanchy *et al.*, 2009; MS 2015).

### 1.7.3 – Resolução espontânea

A resolução espontânea da infecção pelo HCV ocorre em 15% a 45% dos pacientes, e é normalmente associada a indivíduos sintomáticos, do sexo feminino, raça branca e idade inferior a 40 anos (Conjeevaram *et al.* 2006; Santantonio *et al.* 2008; Hajarizadeh *et al.* 2013). Esse desfecho é caracterizado pela não detecção do HCV-RNA no soro/plasma do paciente e decréscimo nos níveis de ALT a partir de 12 semanas do início da infecção (Wasley *et al.* 2000; Nomura *et al.* 2004; Sofian *et al.* 2012).

Como característica de resolução espontânea observa-se os seguintes critérios (MS, 2015):

- Anti-HCV reagente, e
- HCV-RNA indetectável após 6 meses de infecção.

## 1.8 – Diagnóstico

O diagnóstico da hepatite C ocorre a partir de exames de sangue e biópsia hepática. Métodos imunológicos (teste rápido e ensaio imunoenzimático) são utilizados como triagem para a detecção de anticorpos anti-HCV. Assim, amostras com resultados reagentes para anti-HCV passam por uma etapa de confirmação da infecção, através de testes moleculares (PCR, RT-PCR) para a detecção direta do genoma do vírus (Manual MS, 2015).

O esquema de testes diagnósticos recomendados pelo Ministério da Saúde para confirmação da hepatite C é:

### 1.8.1 – Teste rápido:

Os testes imunocromatográficos são métodos de triagem para a detecção do HCV. A análise é baseada na detecção de anticorpos anti-HCV com metodologia simples e tempo máximo de execução, leitura e interpretação de resultados até 30 minutos após a aplicação da amostra. Os espécimes clínicos utilizados no teste para determinação de anticorpos são: sangue total, soro, plasma, saliva (Gold Analisa Diagnóstica 2012; WAMA, 2016).

O princípio de detecção da imunocromatografia se fundamenta na utilização de um suporte sólido (membranas de nitrocelulose, nylon, látex, micropartículas ou cartelas plásticas) contendo antígenos e anticorpos que são ativados após a aplicação de amostras fluidas (Vaz *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2011).

Atualmente, os testes rápidos apresentam sensibilidade (86,3% a 99%) e especificidade (93,75% a 100%) em indivíduos HCV-RNA positivo, similares ao ELISA de terceira geração (especificidade 99,8%) (Scalioni et al., 2014). Entretanto o mesmo não pode ser utilizado como teste diagnóstico definitivo, uma vez que os resultados estão sujeitos a variações influenciadas pelo período de janela imunológica e características dos pacientes (pacientes imunossuprimidos, em hemodiálise, com insuficiência renal crônica, indivíduos já em tratamento para hepatite C ou que utilizam prednisolona). Dessa forma, há a necessidade da realização de testes confirmatórios em casos de resultados reagentes para anti-HCV antes de serem repassados ao paciente (Manual MS, 2015).

As indicações para utilização dos testes rápidos para HCV são: triagem para o diagnóstico definitivo, triagem de doadores em bancos de sangue e outros tecidos biológicos.

#### 1.8.2 – *Ensaio imunoenzimático:*

O exame sorológico imunoenzimático (ELISA) combina a ligação do anticorpo com a detecção enzimática para quantificar moléculas de interesse. Na hepatite C, a detecção de anticorpos anti-HCV ocorre através da metodologia indireta. A partir da ligação de antígenos virais à placa de poliestireno, o anticorpo anti-HCV presente na amostra se ligará de forma específica dando origem ao complexo antígeno-anticorpo. Após adição de anticorpo marcado, substrato e cromógeno, o complexo antígeno-anticorpo é identificado (a partir de mudança na coloração) (Vaz et al., 2007; Reynolds et al., 2011).

Desde o desenvolvimento dos primeiros ensaios para detecção de anticorpos anti-HCV em 1992 (Gretch et al., 1992), a metodologia de ELISA vem sofrendo alterações quanto à sua amplitude diagnóstica. O teste de primeira geração (ELISA I) possuía como alvo apenas um tipo de antígeno, o polipeptídeo c100-3, da região NS3-4 do genoma viral, com sensibilidade de 80% e especificidade de 50-70%. Dessa forma, o teste ELISA I apresentava alta taxa de falso-positivos (Gretch et al., 1992), elevando a prevalência da infecção em grupos de baixo risco, como doadores de sangue (Romeo JM et al., 1993).

A segunda geração do teste ELISA (ELISA II) foi desenvolvida com a adição de dois tipos de antígenos (proteínas recombinantes) do HCV: c22-3 (região do *core*) e c33-c (região NS3). O polipeptídeo já utilizado no teste de primeira geração (c100-3)

foi fusionado com antígeno c33-c, formando uma nova proteína recombinante C200 (ampliando a região antigênica entre NS3 e NS4). O teste de segunda geração diminuiu 10% da taxa de falso-positivos em relação ao ELISA I (Alter HJ. Et al., 1992; Kleinman S et al., 1992; Gretch DR et al., 1997); teve sensibilidade elevada para 95%, assim como, passou a detectar os anticorpos a partir de 10 semanas de infecção (ELISA I – detecção com 16 semanas) (Gretch DR et al., 1997).

O teste ELISA III (terceira geração) manteve os antígenos usados no teste de segunda geração, com a inclusão apenas do antígeno para região NS5. Estudos mostraram uma elevação de sensibilidade do teste para 97% e diminuição de 25% dos valores de falso-positivos (Uyttendaele S et al., 1994; Barrera J et al., 1995; Kao J-H et al., 1996). Entretanto, a principal vantagem atribuída ao teste de terceira geração foi a redução no tempo para detecção de anticorpos anti-HCV para 7 semanas de infecção (Gretch DR et al., 1997). Dessa forma, atualmente é utilizado como metodologia diagnóstica para detecção de anti-HCV o teste de terceira geração (Ministério da Saúde).

Como indicações para teste de detecção de anti-HCV tem-se: receptores de transplantes (sangue e/ou hemoderivados) antes de 1993; casos de exposição percutânea ou de mucosa a sangue de pessoas portadoras ou com suspeita de infecção pelo HCV; indivíduo com icterícia aguda; dosagens de ALT com valor três vezes acima do normal (31U/L (mulheres) e 41 U/L (homens)); exames de triagem reagentes para hepatite C (doadores de sangue e/ou órgãos, pacientes em hemodiálise).

Os ensaios imunoenzimáticos, assim como os testes rápidos, sugerem apenas contato prévio com o HCV, uma vez que não confirmam a presença ativa do vírus. Para confirmação de infecção ativa são necessários testes moleculares para detecção do genoma viral (Protocolo MS 2015, Manual MS 2015).

### *1.8.3 – Testes moleculares:*

Uma vez que os testes imunológicos (rápido e ELISA) não são capazes de identificar infecção ativa, os testes moleculares são exigidos para confirmar a presença do HCV por meio da identificação dos ácidos nucleicos do HCV (HCV-RNA). Dessa forma, esses são os testes confirmatórios recomendados atualmente (CDC, 2016; Protocolo MS, 2015; WHO, 2014).

Apesar da existência de métodos moleculares qualitativos (PCR), a recomendação do Ministério da Saúde é a utilização do método quantitativo (PCR em Tempo Real) para a detecção de HCV-RNA (Manual MS, 2015).

O teste molecular quantitativo para detecção de HCV-RNA é indicado para as seguintes situações: confirmação do diagnóstico de hepatite C; confirmação de transmissão vertical; acidentes ocupacionais com materiais biológicos e quantificação do HCV-RNA com finalidade para avaliação de tratamento (Manual MS, 2015).

#### *1.8.4 – Genotipagem:*

O teste para identificação de genótipo do HCV é uma ferramenta complementar na avaliação clínico-laboratorial da infecção pelo HCV. É empregado para definição do tratamento de escolha em indivíduos com hepatite C crônica.

Esse método molecular se baseia em técnicas de amplificação do material genético viral, capazes de identificar diversos genótipos, subtipos e populações mistas do HCV (Protocolo MS, 2015).

#### *1.8.5 – Exames complementares:*

Além dos exames para identificação direta da infecção pelo HCV, são utilizados exames complementares durante a assistência ao paciente portador de hepatite C, para fins de avaliação do quadro clínico geral do indivíduo e indicação de resposta ao tratamento de escolha (Protocolo MS, 2015).

Os exames utilizados são:

- **Transaminases:** dosagem das enzimas hepáticas ALT e AST (marcadores de agressão hepatocelular). Em formas agudas podem atingir níveis até 100 vezes a dosagem habitual. O processo de elevação das transaminases inicia-se, geralmente, uma semana antes do aparecimento da icterícia e normaliza-se até seis semanas de curso clínico da infecção. Em casos crônicos, os valores das dosagens não chegam a ultrapassar 15 vezes o valor normal (MS, 2007).

- **Bilirrubina:** eleva-se após o aumento de ALT, podendo alcançar valores até 25 vezes maior que o normal, em fase aguda, sendo detectada precocemente na urina antes do aparecimento da icterícia (MS, 2007).

- **Proteínas séricas:** na fase aguda não encontram-se níveis alterados. Albumina apresenta diminuição acentuada em casos crônicos e evolução para cirrose (MS, 2007).

- Fosfatase alcalina: apresentam níveis elevados apenas em formas coleestáticas da infecção (MS, 2007).

- Gama-glutamilttransferase (GGT): elevação acentuada em casos coleestáticos (icterícias obstrutivas, hepatite alcoólica, hepatite medicamentosa, tumores hepáticos). Em relação à hepatite C, sua elevação é discreta (MS, 2007).

- Atividade de protrombina: na fase aguda ocorre pouca alteração, com exceção em casos de hepatite fulminante. Em casos de hepatite C crônica, pode haver um aumento no tempo de protrombina, indicando perda de função hepática associado a outros fatores (encefalopatia, ascite, aumento de bilirrubina, queda de albumina) (MS, 2007).

- Alfafetoproteína: fator de avaliação importante em casos de cirrose. O aumento progressivo ou presença de valores elevados indica o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (MS, 2007).

- Hemograma: a leucocitose em casos de hepatite C crônica é sugestiva de necrose hepatocelular ou coinfeções. A plaquetopenia também pode estar presente na infecção crônica (MS, 2007).

Apesar dos testes existentes serem eficientes para a identificação da infecção pelo HCV, o diagnóstico definitivo na fase aguda é realizado apenas pela soroconversão de anti-HCV, presença de HCV-RNA e elevação da ALT (Daniels *et al.*, 2009; Orland *et al.*, 2001).

Estudos sobre a história natural da infecção abrangendo desde a fase aguda até o estabelecimento da doença crônica são raros, reflexo da dificuldade da identificação de pacientes nos primeiros meses após exposição ao vírus. Assim como, a distinção entre casos de hepatite C aguda e a exacerbação de crônicos torna esse diagnóstico ainda mais difícil, uma vez que esses possuem dados clínicos, bioquímicos, virológicos e imunológicos muito semelhantes (Coppola *et al.*, 2005; Rumi *et al.*, 2005; Sagnelli *et al.*, 2005; Sheen *et al.*, 1996).

A frequente ausência de informações sobre o perfil sorológico dos pacientes nos meses anteriores não permite estabelecer o diagnóstico precoce (Sagnelli *et al.*, 2014). Como a presença do anticorpo anti-HCV IgM não é exclusiva para a fase aguda de infecção (Nikolaeva *et al.*, 2002), uma ferramenta útil seria a determinação do índice de avididade de anticorpos que aumenta progressivamente ao longo da infecção (Rodella *et al.*, 2006; Suligo *et al.*, 2002).

## **1.9 – Resposta humoral**

### *1.9.1 – Estrutura dos anticorpos*

Os anticorpos são as estruturas da resposta imune adaptativa de maior variedade antigênica, com elevada habilidade para diferenciar os antígenos existentes, com interações específicas tanto na fase de reconhecimento quanto na fase efetora da imunidade humoral e são as proteínas que apresentam a maior força de ligação com os antígenos (Abbas et al., 2011).

A estrutura básica dos anticorpos é composta por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas. Uma cadeia leve é ligada covalentemente a uma cadeia pesada por ponte de dissulfeto. Assim como, as duas cadeias pesadas permanecem ligadas entre si por pontes de dissulfeto (Hangartner et al., 2006).

Tanto as cadeias pesadas quanto as leves possuem uma região aminoterminal variável (Região V, variável pesada, VH, e variável leve, VL, respectivamente) que participa do reconhecimento dos antígenos, e regiões carboxiterminais constantes (Região C). Os domínios da região C, também denominada de porção Fc, não participam do processo de reconhecimento antigênico. A região C da cadeia pesada ancora os anticorpos à membrana dos linfócitos B, além de interagir com outras moléculas efetoras e células do sistema imunológico, participando como mediadora da maioria das funções biológicas dos anticorpos (Vaughan et al., 1998).

Na região V (porção Fab), encontram-se os três domínios hipervariáveis que formam a superfície de ligação ao antígeno, também chamados de regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Diferenças nas sequências das CDRs de diversos anticorpos resultam em estruturas químicas únicas e específicas para cada antígeno. A partir da porção aminoterminal VL ou VH, essas regiões são chamadas de CDR1, CDR2 e CDR3. A região CDR3 das duas alças é a mais variável (Beck et al., 2010) (Figura 5).

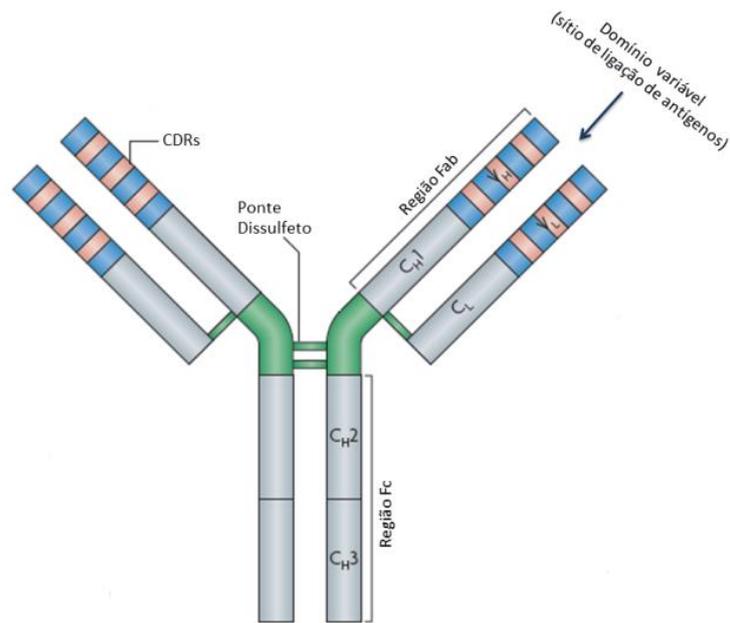


Figura 5: Estrutura básica dos anticorpos. Região Fab: região variável; Região Fc: região constante. CDRs: região hipervariável de interação com os antígenos. CH: cadeia pesada de domínio constante; CL: cadeia leve domínio constante; VH: domínio variável de cadeia pesada; VL: domínio variável da cadeia leve.

\*Fonte: Beck, 2010.

Apesar da alta variabilidade na região V, a estrutura básica de anticorpos de cada isótipo é mantida com a mesma sequência de aminoácidos na região C das cadeias pesadas. Dessa forma, o determinante de isótipo dos anticorpos encontra-se na diferença da estrutura da região C da cadeia pesada (Figura 6) (Vaughan et al., 1998; Beck et al., 2010). Nos anticorpos IgM e IgE humanos, as regiões C contêm quatro domínios Ig em cadeia. As regiões C de IgG, IgA e IgD contêm somente três domínios Ig. Esses domínios são denominados CH e numerados sequencialmente a partir da terminação aminoterminal.

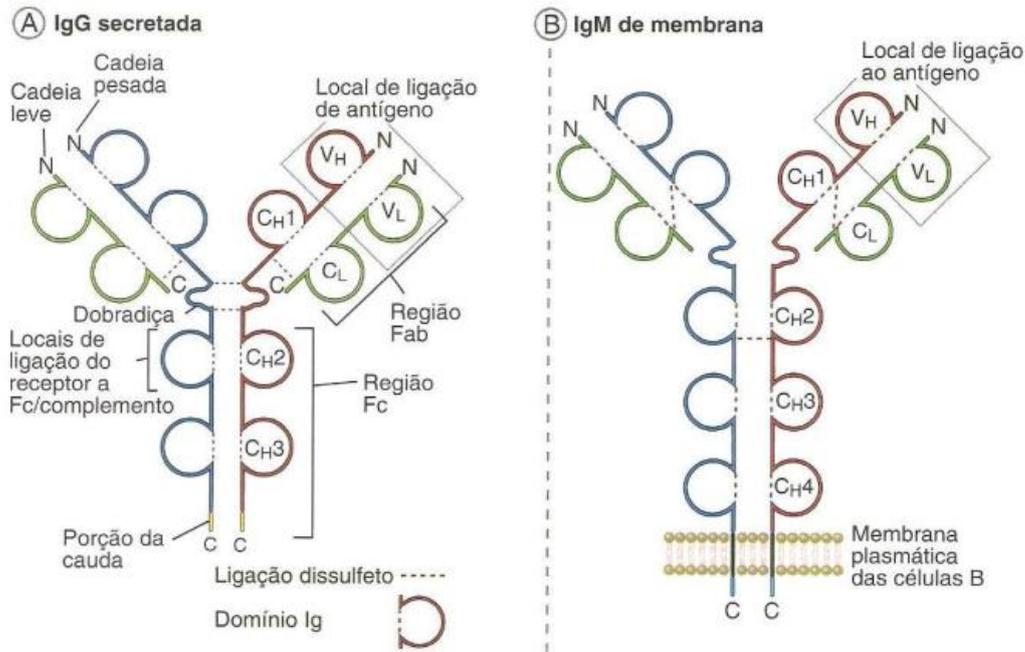


Figura 6 – Estrutura de uma molécula de anticorpo. Região Fc (constante). Região Fab (variável). Domínios variáveis das cadeias leves (VL) e pesada (VH). A) Molécula IgG secretada com três domínios Ig (CH1, CH2, CH3). B) Molécula de IgM ligada à membrana do linfócito B com quatro domínios Ig (CH1, CH2, CH3, CH4).

\*Fonte: Abbas 2011.

Os diversos isótipos de anticorpos desempenham funções efetoras diferentes, devido a ligações das regiões C dos anticorpos aos receptores de vários tipos de células, tais como as células fagocitárias, células NK e mastócitos, e a proteínas plasmáticas do sistema complemento.

A habilidade dos anticorpos de neutralizar toxinas e agentes infecciosos depende das ligações entre antígeno e anticorpo. As ligações que unem o antígeno ao sítio de ligação do anticorpo são todas não covalentes e ocorrem através de grupos químicos encontrados nas CDRs e na superfície antigênica (Abbas 2011).

As principais ligações entre antígeno e anticorpo são hidrofóbicas, sendo estas interações estáveis, devido à eliminação de moléculas de água na área de contato. Outros tipos de ligação são as pontes de hidrogênio, que ocorrem com a associação entre um átomo de hidrogênio e outro átomo eletronegativo, como: O-H-O; N-H-N e O-H-N (Tizard 2014).

As ligações intermoleculares do tipo eletrostáticas são formadas entre elementos de cargas opostas e podem estar presentes nas interações antígeno-anticorpo. Entretanto, os eletrólitos livres presentes no sangue tendem a neutralizar a carga das proteínas. Em decorrência disso, a relevância desse tipo de ligação não é bem estabelecida. Também descrita como um tipo de ligação entre antígeno e anticorpo, a

força de Van der Waals é a interação mais fraca entre dois elementos, e ocorre com uma grande aproximação entre dois átomos (Figura 7) (Tizard 2014).

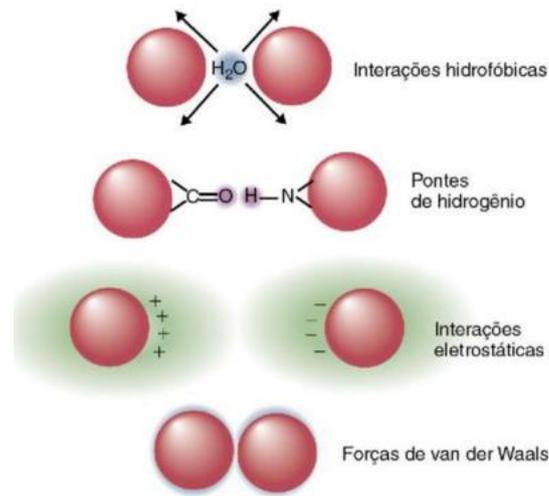


Figura 7: Tipos de interações entre antígeno e anticorpo, em ordem de importância. Todas essas ligações acontecem apenas a uma distância curta.

\*Fonte: Tizard 2014.

Apesar da diferença de força entre as ligações citadas acima, todas as ligações são relativamente fracas. Portanto, interações fortes no complexo antígeno-anticorpo ocorrem quando múltiplas ligações não covalentes se estabelecem perfeitamente. Esse mecanismo é obtido mediante interações de grande afinidade e avides (Abbas et al., 2011).

- Afinidade: é a força da reação entre um único determinante antigênico e um único sítio no anticorpo. Um anticorpo de resposta primária tem menor afinidade quando comparado a um anticorpo de resposta secundária. A afinidade se refere a estabilidade da ligação;

- Avides: é uma medida da interação total entre antígeno e anticorpo. A avides depende diretamente da afinidade e da valência dessas interações. Dessa forma, um anticorpo de resposta secundária possui maior avides em relação ao anticorpo primário.

A síntese e expressão das moléculas Ig ocorre a partir do amadurecimento de células B progenitoras. A chamada célula pré-B é responsável por sintetizar a cadeia pesada das imunoglobulinas que permanece ligada à membrana da célula. As cadeias pesadas expressas na superfície celular associam-se a cadeias leves e formam moléculas de IgM associadas à membrana. Linfócitos B maduros também expressam em sua membrana moléculas de IgD. Essas associações de Igs funcionam como receptores da

superfície celular para reconhecimento de antígenos e iniciação do processo de ativação de células B (Hazzel 2007; Abbas et al., 2011).

Os receptores de antígenos liberam sinais para os linfócitos em desenvolvimento ativando a proliferação e maturação, os quais são necessários para a sobrevivência dessas células. Na ausência da expressão do receptor de antígenos, os linfócitos em desenvolvimento entram em uma via que os levará à morte por apoptose (Nothelfer et al., 2015).

#### *1.9.2 – Expansão clonal e mudança de isótipo:*

A resposta imune humoral é iniciada com o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos B, através dos receptores de membrana IgM e IgD que ativam e induzem a proliferação das células B. Essa ativação resulta na expansão de clones celulares específicos para o antígeno apresentado, assim como a diferenciação celular, gerando células secretoras de anticorpos e de memória (Rawling et al., 2012).

A ativação das células B ocorre de duas formas. Primeiro, através da interação entre antígeno e receptores de membrana que iniciam um processo bioquímico de ativação celular. Segundo, por meio da internalização do receptor ligado ao antígeno, por vesículas endossomais, dando início ao processo de apresentação de antígeno aos linfócitos T auxiliares (Abbas et al., 2011).

Os receptores de antígenos presentes nas células B (IgM e IgD) apresentam cauda citoplasmática curta, composta somente por dois aminoácidos (valina e lisina). Essas caudas não conseguem realizar a transdução de sinal gerada pela ligação de antígenos às imunoglobulinas de membrana. Dessa forma, duas outras moléculas são essenciais para ativação dos linfócitos B, denominadas de  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ .

A associação entre os receptores de membrana IgM e IgD e as moléculas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , formam o complexo de receptor de células B para antígeno (BCR). Os domínios citoplasmáticos de  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  contêm motivos ricos em tirosina (ITAMS), que são fatores necessários para a transdução de sinais e consequente ativação celular (Figura 8) (Daeron et al., 1997; Getahun et al., 2006).

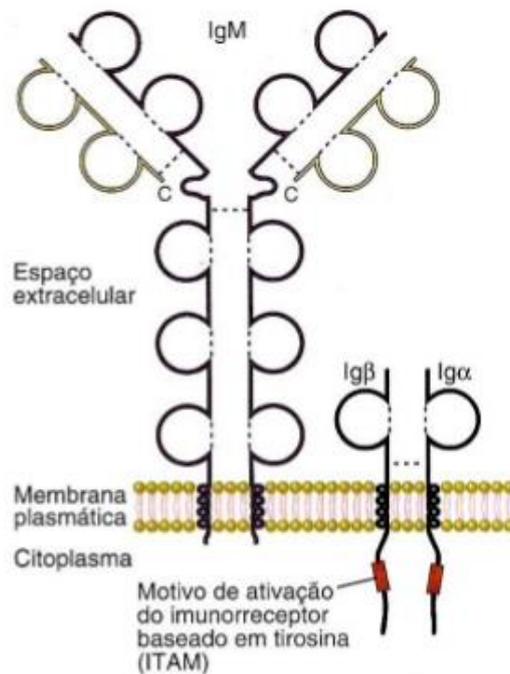


Figura 8 – Complexo receptor para o antígeno das células B. IgM (e IgD) expressas na superfície dos linfócitos B maduros associados às moléculas não-variantes Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  (BCR), que contêm ITAMS na cauda citoplasmática e medeiam as sinalizações celulares.

\*Fonte: Abbas 2011.

O reconhecimento do antígeno (via complexo BCR) estimula a entrada dos linfócitos B no estágio G1 do ciclo celular, com aumento no tamanho celular, RNA citoplasmático e biossíntese de organelas. Assim como, inibe a via de morte celular através da ativação de genes antiapoptóticos.

Após a ativação de linfócitos B por antígenos, algumas células da progênie sofrem diferenciação para plasmócitos (células secretoras de anticorpos). Esse processo modifica o padrão de produção de imunoglobulinas através da conversão de Ig de membrana para Ig secretada, bem como a troca de isótipos (Figura 9) (Vinuesa et al., 2013).

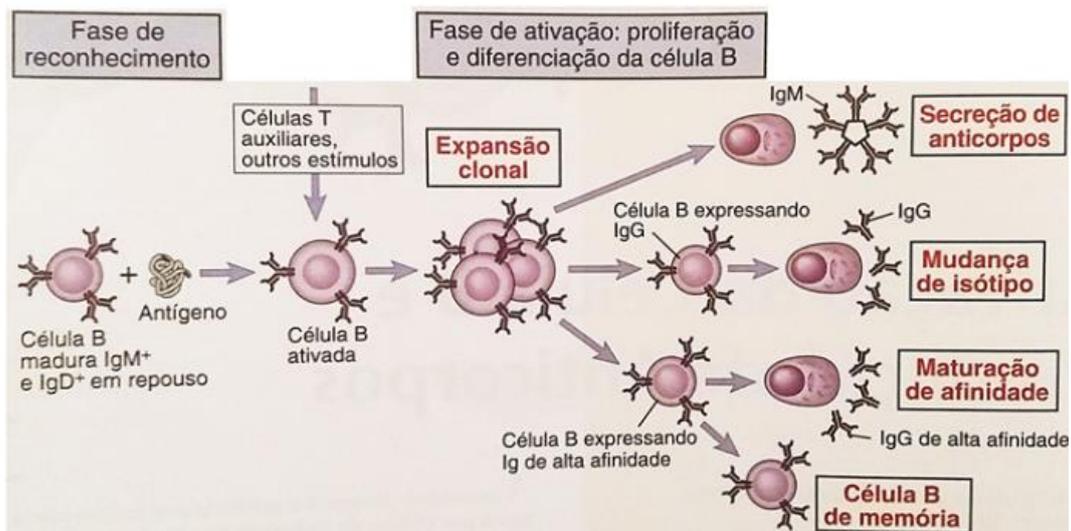


Figura 9: Ativação das células B iniciadas pelo reconhecimento antigênico específico pelos receptores de membrana (IgM e IgD). O antígeno e outros estímulos estimulam a proliferação e diferenciação dos clones das células B específicas. A progênie desses linfócitos pode produzir IgM e outros subtipos de Igs. \*Fonte: Abbas 2011.

A mudança no isótipo dos anticorpos ocorre a partir da troca de cadeia pesada, onde cada classe de anticorpo possui um tipo de cadeia pesada distinta. O mecanismo molecular de mudança de isótipo ocorre a partir de rearranjos dos segmentos gênicos VDJ dos linfócitos B, denominados de recombinação de troca, desencadeados pela ligação antigênica (Flajnik et al., 2010). Devido à capacidade de produzir diferentes isótipos, os linfócitos B fornecem plasticidade à resposta humoral, pela geração de anticorpos com funções efetoras distintas para diversos agentes infecciosos.

A resposta humoral desencadeada pela infecção de um patógeno é descrita na literatura pelo aparecimento inicial de anticorpos do tipo IgM de 3 a 15 dias após exposição ao agente infeccioso. Em seguida, a resposta do tipo IgG começa a ser formada de 3 a 7 dias após o aparecimento de IgM.

Entretanto, as infecções são mais complexas e a apresentação de antígenos durante o curso da infecção pode levar a modificações na resposta imune (Hazzel 2007). Apesar da troca de isótipo das imunoglobulinas ser um processo bem estabelecido na literatura, trabalhos demonstram que IgM pode persistir por semanas ou meses em algumas infecções (Pinon et al., 2001; Giraldo et al., 2002; Nikolaeva *et al.*, 2002; Roehrig et al., 2003). Por isso, basear-se na detecção de IgM para estabelecer o período de uma infecção torna-se um risco potencial para um diagnóstico equivocado (Korhonen et al., 1999; Hazzel 2007).

### 1.9.3 – Resposta humoral na hepatite C:

A resposta imune humoral constitui a base para o diagnóstico sorológico da hepatite C e estudos soroepidemiológicos, utilizando a detecção por ensaio imunoenzimáticos e testes de transferência de Western para detecção de anticorpos específicos anti-HCV (Raina et al., 2004)

O HCV, ao contrário de outros vírus hepatotrópicos que induzem resposta humoral protetora eficaz através da infecção natural ou por vacinação, não fornece imunidade protetora (Rehermann et al., 2005).

Um estudo realizado por Farci et al. em 1992 demonstrou, através da reinfecção de animais (chimpanzés) convalescentes com cepas homólogas e heterólogas de HCV, a ausência de resposta protetora dos anticorpos que resultaram no posterior reaparecimento da viremia. Outro estudo sugere que a evolução para a resolução espontânea da infecção não está associada com uma resposta humoral eficaz (Grellier et al., 1997). Isto tem sido relacionado ao fato da resposta imune humoral ao HCV originar anticorpos neutralizantes específicos possibilitando o escape do HCV à resposta imune, em virtude da diversidade gênica na envelope viral (Farci et al., 1994).

O aparecimento de anticorpos específicos ao HCV é altamente variável em pacientes com hepatite C quando comparado à outras infecções virais. Não há anticorpos que aparecem apenas no início da infecção (IgM) e, em alguns casos, eles podem não aparecer (Rehermann et al., 2005).

Na hepatite C os anticorpos surgem tardiamente em torno de 6 a 8 semanas após a exposição ao HCV, permanecendo durante todo o curso da infecção crônica (Bowen et al., 2005; Elliott *et al.* 2006) e desaparecendo gradualmente na resolução espontânea da doença (Strasak *et al.* 2011). Entretanto, em pacientes imunocomprometidos o processo de soroconversão pode ocorrer em períodos maiores (Maheshwari et al., 2008).

### 1.9.4 – Teste de avidéz:

A partir da análise da evolução da avidéz entre anticorpo e antígeno, é possível prever o tempo de infecção decorrida. Na fase inicial da infecção são encontrados anticorpos com baixa avidéz devido à resposta imunológica recente e conseqüentemente, ao longo do tempo, devido à maturação da resposta imune humoral, a avidéz tende a aumentar (Figura 10).

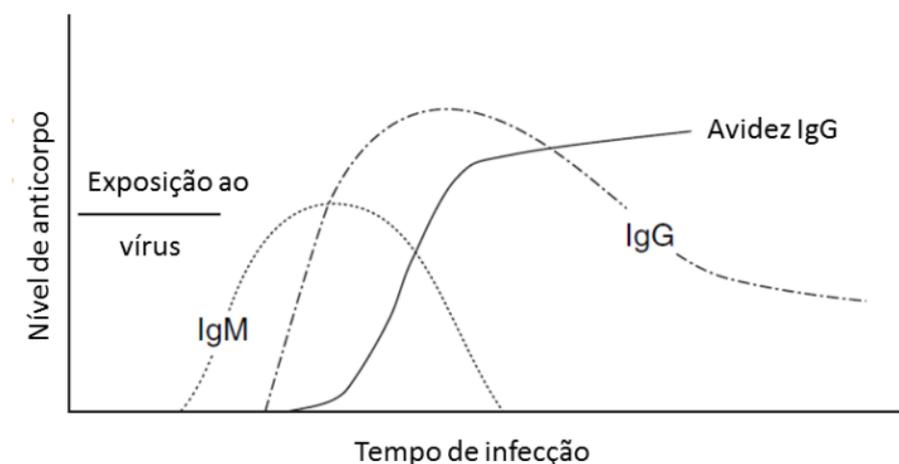


Figura 10: Representação esquemática clássica de resposta IgM e IgG. Aparecimento inicial de IgM em resposta à exposição ao vírus, seguida de aparecimento de IgG. A maturação de avidéz se dá ao longo do tempo de infecção. Baixa avidéz no período inicial do surgimento de IgG, ainda com presença de IgM, e aumento de avidéz consecutivo e desaparecimento de IgM. Fonte adaptada: Hazzel 2007.

Estudos realizados na década de 1980 impulsionaram a utilização do teste de avidéz como ferramenta diagnóstica (Lehtonen et al., 1982; Inouye et al., 1984; Steward et al., 1985; Hedman et al., 1988).

O princípio básico do teste de avidéz está relacionado com a medida da dissociação de ligações entre antígeno e anticorpo. Esse mecanismo é possível a partir da utilização de agentes desnaturantes ou caotrópicos (guanidina, ureia) que realizam a quebra das ligações fracas entre antígeno e anticorpo, através de fatores como: sua composição, a temperatura e a mudança de pH.

O teste de avidéz trata-se de um ELISA indireto, com a adição de uma etapa para tratamento com o agente desnaturante. As amostras são testadas em duplicata no ensaio, onde uma amostra é tratada com agente desnaturante e o outro espécime com solução salina (PBS). Dessa forma, após a realização do ensaio, a razão entre a leitura das duas amostras testadas é utilizado como índice de avidéz (Hedman et al., 1988; Korhonen et al., 1999; Fox et al., 2006).

Esse método tem sido empregado para diversos agravos. Blacburn e colaboradores em 1991 descreveram a utilização do teste de avidéz em pacientes (imunocompetentes, imunocomprometidos e recém nascidos) em diferentes fases da

infecção pelo citomegalovírus (CMV). Outros grupos empregaram o teste de avides para avaliação do risco de infecção primária por CMV em gestantes (Ruellan-Eugene et al., 1996; Lazzarotto et al., 2000; Macé et al., 2004; Munro et al., 2005). Com a mesma finalidade, o teste de avides foi utilizado para infecções como rubéola (Best et al., 1989) e toxoplasmose (Cozon et al., 1998; Liesenfeld et al., 2001; Candolfi et al., 2007; Emelia et al., 2014) sendo, atualmente, o teste de avides empregado em laboratórios de rotina para acompanhamento, principalmente, em casos de gravidez (Portal Sergio Franco).

Souza et al. (2004) e Lau et al. (2015) empregaram o teste de avides para comparação entre primeira e segunda infecção pelo vírus da Dengue. Em indivíduos portadores de HIV, o teste de avides já foi empregado em indivíduos com e sem soroconversão comprovada para avaliação do tempo de infecção (Martró et al., 2005; Suligoi et al., 2008; Sheperd et al., 2015).

Testes de avides para a hepatite C são comercializados em alguns países, tais como o *CV-11 HCV Avidity* (Medical Biological Union) na Rússia e o *DS-EIA-Anti-HCV Avidity* (DSI) na Itália, entretanto, no Brasil, estes testes não possuem registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), dificultando a identificação de casos agudos da infecção no país.

## 2. JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Hepatites Virais (LAHEP) do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz é acreditado desde 1986 pelo Ministério da Saúde como Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais (LRNHV). Este laboratório é uma importante unidade de consultoria e pesquisa do governo brasileiro e possui várias atribuições, incluindo programas de vigilância para hepatites virais. O ambulatório de hepatites virais (AHV) do LRNHV tem recebido pelo menos 2.500 indivíduos anualmente desde 2000, a grande maioria encaminhada para realização de testes diagnósticos para HCV.

Devido ao número elevado de quadros agudos de hepatite viral encaminhados para o AHV, foi elaborado, em 2002, um protocolo específico para investigação, com a finalidade de acelerar não somente o diagnóstico clínico mas também a identificação de casos graves, que necessitariam de intervenções de urgência. A partir de 2011, o AHV é reconhecido como unidade de referência para todos os casos agudos de hepatite viral no Município do Rio de Janeiro, pelo Programa de Hepatites Virais da Secretaria Municipal de Saúde/RJ e, conseqüentemente, onde vem sendo identificados, de forma contínua, casos agudos de infecção pelo HCV. Mediante o número elevado de pacientes identificados na fase aguda da infecção pelo HCV, considerada uma raridade, a equipe do AHV se tornou integrante de uma rede de centros de cooperação internacional em pesquisa para hepatite C (HCV Collaborative Research Center/NIAID/EUA) desde 2005.

Pelas razões citadas acima, no AHV é acompanhada uma coorte de pacientes recrutados desde a fase aguda da infecção pelo HCV, diagnosticada pela soroconversão e/ou perfil clínico epidemiológico laboratorial, resultando em um considerável biorrepositório de amostras biológicas (Lewis-Ximenez *et al.*, 2010).

Sabendo-se da dificuldade na identificação clínica da hepatite C aguda e na ausência de testes específicos disponíveis no Brasil, este estudo teve como objetivo desenvolver um teste para detecção da avidéz de anticorpos contra o HCV, avaliar avidéz ao longo da infecção e aplicar o teste na rotina de diagnóstico da hepatite C. Uma vez estabelecido um protocolo para o diagnóstico da fase aguda da infecção, este poderá intensificar a identificação de casos incidentes, auxiliando assim, a vigilância epidemiológica, bem como a intervenção médica direcionada, reduzindo os casos de evolução para cronicidade e suas conseqüências.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo geral**

Desenvolver o teste de avidéz de anticorpos IgG anti-HCV para confirmar exposição recente ao vírus da hepatite C.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

- a)** Padronizar o teste de avidéz a partir da adaptação de teste de ELISA comercial, testando amostras de pacientes nas fases aguda, crônica e de resolução espontânea da infecção pelo HCV;
- b)** Validar, avaliar o desempenho e aplicar o teste de avidéz;
- c)** Avaliar o perfil do índice de avidéz ao longo da infecção pelo HCV;
- d)** Aplicar o teste de avidéz em amostras de pacientes atendidos na rotina do Ambulatório de Hepatites Virais (AHV).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - População de estudo:

Foram selecionados um total de 570 amostras de 147 pacientes pertencentes à coorte de indivíduos com hepatite C aguda (composta por 170 participantes) do AHV, inclusos no projeto “Fase aguda da infecção pelo vírus da hepatite C: avaliação da resposta imunológica celular e humoral” recrutados de janeiro de 2001 a dezembro de 2015.

- Critério de inclusão: ter a primeira amostra coletada dentro dos 3 primeiros meses da infecção.
- Critério de exclusão: possuir acompanhamento clínico inferior a um ano.

#### 4.1.1 – População de estudo para padronização do teste:

Foram selecionados para a padronização do teste de avidéz 13 pacientes anti-HCV reagentes e HCV RNA positivos, cujas datas de infecção são conhecidas devido ao acompanhamento epidemiológico realizado pelo AHV em situações de surto de HCV em clínicas de hemodiálise. Estes pacientes compuseram o grupo com infecção aguda.

Também foram selecionados 13 pacientes que compuseram o grupo de infecção crônica (7 pacientes) e de resolução espontânea (6 pacientes).

#### 4.1.2 – População de estudo para identificação de pacientes na fase aguda da infecção e avaliação do índice de avidéz ao longo da infecção:

Inicialmente foram selecionados 50 pacientes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, para identificação da fase aguda da hepatite C. Este número era composto por indivíduos com soroconversão de anti-HCV comprovada com um último resultado negativo em um período máximo de 6 meses. Porém, pacientes sem soroconversão comprovada também foram incluídos, com a classificação de agudos a partir da data provável de infecção calculada como 6 semanas anteriores ao início da icterícia (Lewis-Ximenez *et al.*, 2010). Além disso, também foram utilizados outros 24 pacientes com hepatite C com data de infecção conhecida (surto de hepatite C em clínicas de hemodiálise).

Posteriormente, para avaliação do índice de avidéz ao longo da infecção, todos os pacientes identificados como agudos (nessa etapa e na etapa anterior) no teste de avidéz adaptado foram acompanhados de forma longitudinal.

#### *4.1.3 – População de estudo acompanhada na rotina do Ambulatório de Hepatites Virais para aplicação do teste de avidéz:*

Foram selecionados nessa fase do estudo 47 pacientes atendidos em rotina no ambulatório de junho de 2014 a dezembro de 2015. Neste grupo, os critérios de inclusão e exclusão não foram aplicados, uma vez que o teste foi aplicado como ferramenta diagnóstica de atendimento de rotina.

#### *4.1.4 – Considerações éticas:*

O presente estudo encontra-se vinculado ao projeto: “Fase aguda da infecção pelo vírus da hepatite C: avaliação da resposta imunológica celular e humoral”, financiado pelo Instituto Nacional da Saúde (*National Institute of Health* ou NIH) dos EUA, sob o nº U19 AI066345-01 (*Catalog of Federal Domestic Assistance* - CFDA Nº 93.856), até o ano de 2015.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/Fiocruz, Protocolo CEP 0142/01 (Anexo 1), registro CONEP 2830 (Anexo 2). Todos os participantes deste estudo assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

## **4.2- Levantamento de dados secundários**

### *4.2.1- Dados demográficos, clínicos e laboratoriais:*

Foi realizado o levantamento de dados demográficos, clínicos e laboratoriais como gênero, idade, cor, fator de risco para a infecção, análises bioquímicas e moleculares para a obtenção de informações referentes ao histórico dos pacientes.

As amostras selecionadas foram previamente submetidas a testes laboratoriais realizados pelo Laboratório de Hepatites Virais – LAHEP/IOC/FIOCRUZ, para dosagem da ALT, pesquisa de anti-HCV e análise molecular para a detecção de HCV-RNA com os métodos de quantificação de carga viral e genotipagem.

### **4.3– Padronização e validação do teste de avidéz adaptado:**

#### *4.3.1 – Teste de parâmetros:*

A padronização do teste de avidéz adaptado foi realizada a partir de modificações no protocolo do ensaio imunoenzimático comercial Murex Anti-HCV version 4.0 (DiaSorin), disponibilizado pelo Ministério da Saúde, Rede DST/Aids e Hepatites Virais ao Laboratório de Hepatites Virais/IOC/FIOCRUZ.

As amostras de plasma (20 µL) foram adicionadas à placa (1:10 em tampão contendo 0,05% de Bronidox e 0,1% de azida de sódio) em seis replicatas e incubadas por 1h a 37°C, seguidas de lavagem. Posteriormente, foram separados em dois grupos de triplicatas, sendo um grupo tratado com 200 µL de PBS 1x (NaCl 137 mM, fosfato 10mM, KCl 2.7mM com pH 7,2) e o outro grupo tratado com 200 µL PBS com guanidina 1M ou 1,5M (em PBS 1X com pH 7,2) com incubação por 15 minutos a 37°C, para identificação da melhor condição de tratamento para obtenção do índice de avidéz.

As etapas seguintes do ensaio foram realizadas de acordo com instruções do fabricante. A leitura da densidade ótica (DO) foi obtida com o equipamento Leitor de ELISA (Mindray) no comprimento de onda 450 nm e 620-690 nm como referência.

O índice de avidéz foi calculado de acordo com a fórmula abaixo (Hedman et al., 1989):

$$\frac{\text{DO tratado Guanidina}}{\text{DO tratado PBS}} \times 100$$

#### *4.3.2 – Análise de repetibilidade pelo coeficiente de variação:*

O coeficiente de variação foi utilizado como forma de avaliação da repetibilidade do método empregado. Para a realização desta etapa foram selecionadas amostras de plasma de dois pacientes na fase crônica e dois pacientes na fase aguda da infecção pelo HCV. No teste intraensaio, cada amostra foi aplicada em 15 réplicas tratadas com PBS e 15 com PBS com guanidina. Para o teste interensaio foram utilizadas as mesmas amostras aplicadas em duplicatas com PBS e com guanidina em 15 ensaios distintos (Coppola *et al.*, 2009; Coppola *et al.*, 2007). Ambos os testes foram realizados nas condições de guanidina 1,5M/15 minutos a 37°C. As demais etapas do teste foram realizadas conforme instruções do fabricante.

De acordo com Murray 1993 para testes sorológicos as variações aceitas para avaliações intraensaios devem estar abaixo de 10% e, para interensaios, inferiores a 15%.

#### *4.3.3 – Acompanhamento de controles internos:*

Para validação do ensaio e garantia de confiabilidade dos resultados obtidos dos controles internos, os mesmos foram analisados segundo a metodologia de *Levey-Jennings* através da análise gráfica de resultados de controles de corrida analítica em função do tempo ou número de corridas (Levey Jennings 1950).

Os gráficos de Levey-Jennings foram avaliados segundo as “Regras de Westgard”. O controle de qualidade das regras de Westgard utiliza a combinação de critérios para decidir se a corrida analítica está dentro dos padrões de aceitabilidade. Para isso, são utilizadas 5 regras básicas para julgar a aceitabilidade de uma corrida analítica (Westgard et al., 1986). Essas regras são:

- Regras de alerta: Um ponto que excede  $\pm 2$  desvios-padrão (dp); Dois pontos consecutivos que excedem  $\pm 2$  dp; Quatro pontos consecutivos que excedem  $\pm 1$  dp.

- Regras mandatórias: Um ponto que excede  $\pm 3$  dp; quando 10 valores consecutivos encontram-se de um mesmo lado da média.

Para a validação do ensaio apenas uma regra de alerta pode ser violada. Caso duas regras sejam violadas, o mesmo é rejeitado. Entretanto, não pode haver violação de nenhuma regra mandatória. A quebra de uma regra mandatória rejeita de imediato o ensaio proposto.

#### *4.3.4 – Avaliação dos controles positivo e negativo do kit Murex Anti-HCV version 4.0 (DiaSorin):*

Devido à adição de uma etapa no protocolo do ensaio imunoenzimático comercial Murex Anti-HCV version 4.0 (DiaSorin), descrita anteriormente, os controles do kit (positivo e negativo) foram avaliados para identificação de possíveis interferências em seus resultados. Os controles em questão foram incubados em duplicata na presença e ausência de PBS durante a etapa extra.

Os resultados obtidos em todos os testes realizados foram analisados de acordo com os seguintes grupos: Controle negativo com PBS; Controle negativo sem PBS; Controle positivo com PBS; e Controle positivo sem PBS.

#### **4.4 – Análise de desempenho do teste de avidéz adaptado:**

##### *4.4.1 – Determinação do valor de corte, zona cinza, sensibilidade e especificidade,:*

O valor de corte para diferenciação entre fase aguda e fase crônica da infecção pelo HCV foi determinado pela análise *receiver operating characteristics* ou curva ROC, com a utilização 139 amostras de 16 pacientes com data de infecção conhecida oriundos de clínicas de hemodiálise. A zona cinza foi estipulada de acordo com a variação interensaio encontrada.

Posteriormente, com a utilização de 52 amostras de 37 pacientes com data de infecção conhecida ou soroconversão comprovada foi realizado o cálculo de sensibilidade, especificidade do teste de avidéz.

##### *4.4.2 – Comparação do teste de avidéz adaptado neste estudo com o teste de avidéz comercial DS-EIA-Anti-HCV Avidity (Diagnostic System Italy, DSI, Itália):*

Foram testados grupos de amostras de pacientes na fase aguda e fase crônica da infecção pelo HCV, tanto no teste padronizado neste estudo, como no teste comercial DS-EIA-Anti-HCV Avidity (Diagnostic System Italy, DSI, Itália).

No teste comercial foram seguidas as recomendações do fabricante: amostras de fase aguda apresentam valores no índice de avidéz  $\leq 36\%$ . Após a realização de ambos os testes, os grupos foram analisados quanto à capacidade, de cada metodologia empregada, de identificação de amostras de pacientes em fase aguda da infecção pelo HCV.

##### *4.4.3 – Análise de concordância entre o teste de avidéz adaptado e a classificação dos pacientes de acordo com critérios clínico-laboratoriais:*

Para a identificação de casos de hepatite C aguda não existe uma metodologia padrão-ouro utilizada no Brasil. Dessa forma, a análise de concordância (índice Kappa) foi realizada entre a classificação da fase de infecção obtida com o teste de avidéz e a classificação da fase de infecção por critérios clínico-laboratoriais. A população utilizada para essa análise compreendeu todos aqueles pacientes classificados na fase aguda e crônica da infecção, pertencentes à coorte do AHV, bem como pacientes oriundos de clínicas de hemodiálise com data de infecção conhecida.

Segundo Landis e Koch (1977), a análise do índice kappa deve se basear nos seguintes intervalos:  $\leq 0,40$  (baixa concordância);  $0,40 - 0,75$  (concordância mediana);  $\geq 0,75$  (excelente concordância).

#### **4.5– Aplicação do teste de avidéz adaptado**

##### *4.5.1 – Identificação de pacientes na fase aguda da infecção:*

A primeira aplicação do teste de avidéz adaptado foi a identificação de casos agudos, na coorte de indivíduos supracitada (5.1.2), pela análise da avidéz da primeira amostra de plasma disponível de cada paciente para identificação de pacientes na fase aguda da hepatite C.

##### *4.5.2 - Avaliação do perfil do índice de avidéz ao longo da infecção pelo HCV:*

A segunda aplicação foi o acompanhamento da evolução do índice de avidéz ao longo da infecção em todos aqueles pacientes enquadrados no grupo de infecção aguda.

O período mínimo avaliado foi de 12 meses. O período máximo avaliado foi de 30 meses. Já as amostras provenientes de surtos em clínicas de hemodiálise, por se tratarem de eventos mais recentes, o acompanhamento foi em um menor espaço de tempo, até 15 meses.

##### *4.5.3 – Análise do índice de avidéz em pacientes atendidos na rotina do Ambulatório de Hepatites:*

O teste de avidéz adaptado foi aplicado em pacientes atendidos na rotina do AHV de junho de 2014 a dezembro de 2015, como teste complementar para auxílio na identificação da fase de infecção pelo HCV.

#### **4.6– Análise estatística:**

O programa estatístico utilizado para a análise dos resultados foi o GraphPad Prism 5.0. A análise estatística dos dados demográficos (gênero, idade e raça), clínicos (risco de infecção e icterícia) e laboratoriais (genótipo do HCV) foi realizada por frequência relativa (%). Os demais dados laboratoriais dos pacientes (ALT e HCV-RNA) foram analisados por média e desvio padrão.

Os resultados obtidos na padronização, validação, desempenho do teste de avidéz adaptado e acompanhamento do índice de avidéz ao longo da infecção foram analisados pelos métodos de Kruskal-Wallis e Dunn's Multiple Comparison Test. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O índice kappa foi calculado por uma extensão do programa GraphPad, o QuickClacs.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 - Dados demográficos, clínicos e laboratoriais:**

Na população selecionada para o desenvolvimento do estudo (147 indivíduos) observou-se um predomínio de indivíduos do sexo feminino (55%), com média de idade de 49 anos e com predomínio de cor parda.

Em relação aos dados clínicos, a via de infecção presumida mais prevalente foi a parenteral. A maioria da população estudada não apresentou sintomatologia (61%). O genótipo 1 foi o mais frequente 62%.

**Tabela 1** - Características demográficas, clínicas e laboratoriais da população estudada.

	Pacientes (n=147)
Média de idade (variação)	49 (22-78)
Feminino/Masculino	80/67
<b>Cor</b>	
Branca	35 (24%)
Parda	53 (36%)
Negra	17 (12%)
Não informada	42 (28%)
<b>Risco de infecção (%)</b>	
Parenteral	89 (60%)
Sexual	23 (16%)
Desconhecido	35 (24%)
<b>Sintomáticos</b>	57 (39%)
<b>Dados laboratoriais</b>	
ALT, média ( $\pm$ DP)	133,2 ( $\pm$ 239,9)
HCV-RNA UI/mL, média do pico ( $\pm$ DP)	220.500 ( $\pm$ 697.000)
<b>Genótipo</b>	
1	91 (62%)
2	4 (3%)
3	3 (2%)
4	1 (0,7%)
Desconhecido	48 (32,3%)

ALT: alanina aminotransferase, DP: desvio-padrão, UI: unidades internacionais.

## **5.2 – Padronização e validação do teste de avidéz adaptado:**

### *5.2.1 – Avaliação de parâmetros do teste de avidéz adaptado com guanidina a 1M e 1,5M por 15 minutos a 37°C:*

A padronização do teste de avidéz foi realizada com a utilização de 26 amostras de plasma de 13 pacientes na fase aguda da hepatite C com data de infecção conhecida (oriundos de surtos de hepatite C em clínicas de hemodiálise), sete amostras de plasma de sete indivíduos na fase crônica e seis amostras de plasma de seis indivíduos que eliminaram espontaneamente a infecção. As amostras foram testadas em duas concentrações do agente desnaturante guanidina (1M e 1,5M) e incubadas por 15 minutos a 37°C.

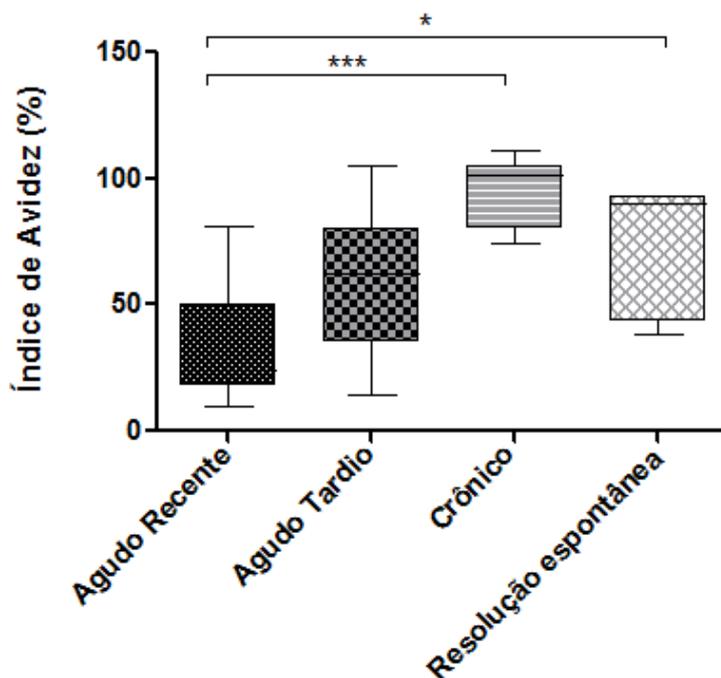
Inicialmente, a análise do índice de avidéz por mês após infecção (variação de 2 a 26 meses) não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Dessa forma, as amostras foram agrupadas em intervalos de tempo após infecção: agudo recente (até 4 meses), agudo tardio (5-6 meses), crônico (>6 meses) e resolução espontânea (>6 meses).

Após o tratamento com guanidina 1M o resultado do índice de avidéz [mínimo e máximo (%)], média  $\pm$  desvio padrão, de cada grupo foi de: agudo recente 9,9% a 105,7% ( $44,60 \pm 26,13$ ); agudo tardio 14% a 105% ( $59,45 \pm 27,22$ ); crônico 74% a 111% ( $95,50 \pm 14,27$ ) e; resolução espontânea 38% a 93% ( $72,60 \pm 26,88$ ).

No tratamento com guanidina 1,5M o resultado foi: agudo recente 12% a 29% ( $20,67 \pm 5,47$ ); agudo tardio 16% a 90% ( $51,67 \pm 26,17$ ); crônico 69,8% a 100% ( $89,14 \pm 13,35$ ) e; resolução espontânea 12% a 56,4% ( $31,17 \pm 16,35$ ).

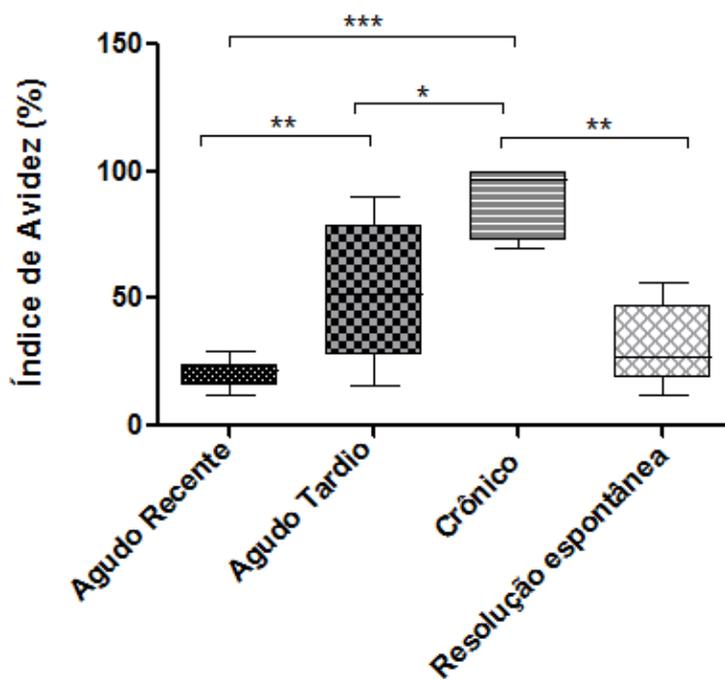
Os índices de avidéz obtidos no tratamento de guanidina 1M (Gráfico 1) entre os grupos agudo recente e agudo tardio não apresentaram significância ( $P > 0,05$ ). Entretanto quando tratados com guanidina 1,5M a diferença foi significativa ( $P < 0,01$ ) (Gráfico 2). Ambas as condições de tratamento (guanidina 1M e 1,5M) apresentaram diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre os grupos Agudo recente e Crônico. Os grupos agudo tardio e crônico apresentaram diferença significativa apenas no tratamento com guanidina 1,5M ( $P < 0,05$ ), assim como os grupos crônico e resolução espontânea ( $P < 0,01$ ) (Gráfico 2). Apenas no tratamento com guanidina 1,5M foi possível obter diferença entre os grupos crônico e resolução espontânea ( $P < 0,01$ ).

## GUANIDINA 1M



**Gráfico 1** - Índice de avidez Anti-HCV IgG de amostras de plasma tratadas com guanidina 1M. Grupos: Agudo recente (n=9), Agudo tardio (n=19), Crônico (n=7) e Resolução espontânea (n=6). N: número de amostras. (\*\*P<0,05) / (\*\*\*)P<0,001).

## GUANIDINA 1,5M



**Gráfico 2** - Índice de avidez Anti-HCV IgG de amostras de plasma tratadas com guanidina 1,5M. Grupos: Agudo recente (n=9), Agudo tardio (n=19), Crônico (n=7) e Resolução espontânea (n=6). N: número de amostras. (\*\*P<0,05) / (\*\*\*)P<0,001 / (\*\*)P<0,01).

As fases da infecção pelo HCV foram estatisticamente diferenciadas através do índice de avidéz obtido após tratamento com guanidina 1,5M por 15 minutos a 37°C, assim, esta foi a metodologia empregada nas demais etapas do estudo.

*5.2.2 - Análise da repetibilidade do teste de avidéz adaptado pelo coeficiente de variação:*

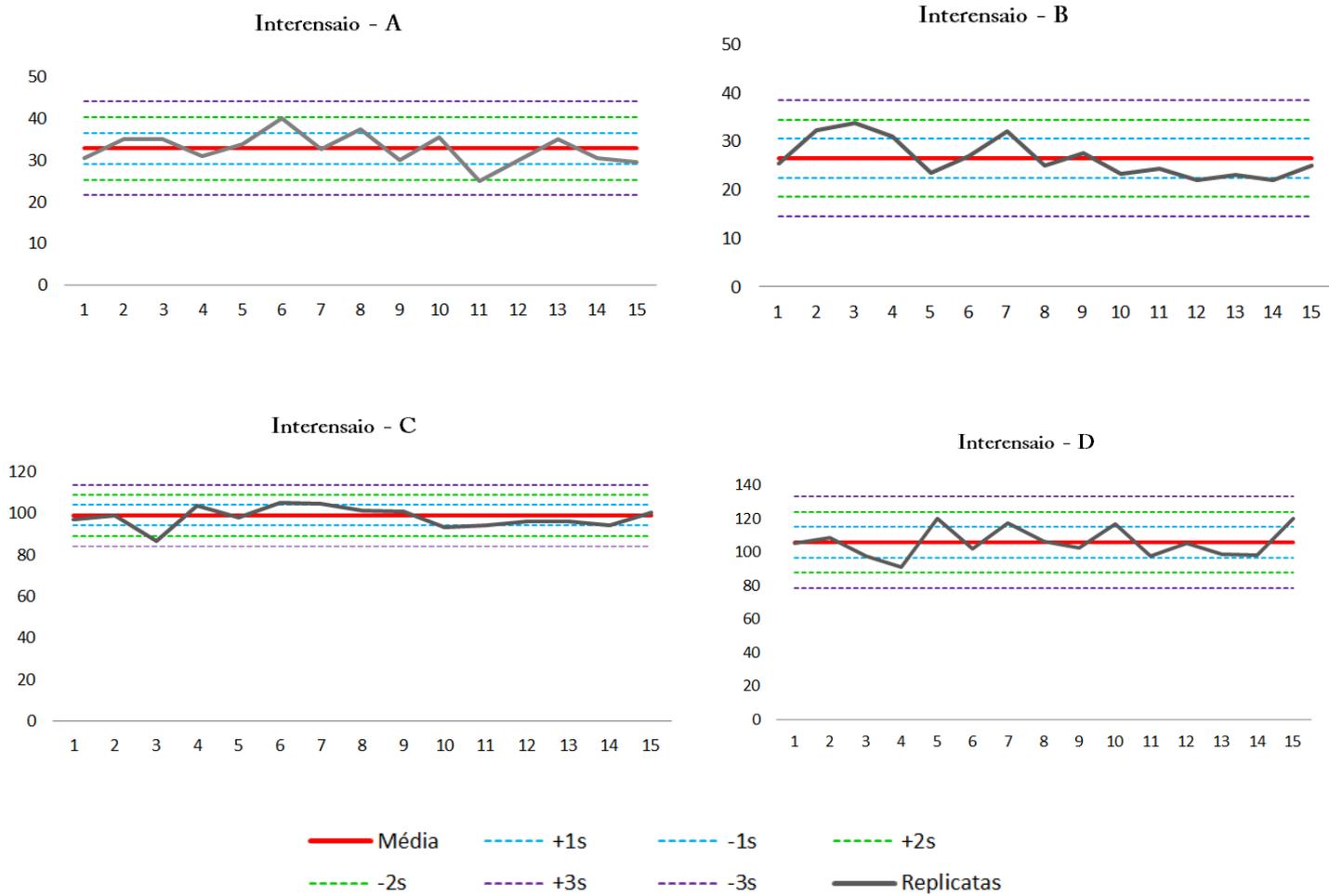
A análise da repetibilidade intraensaio do teste foi realizada com amostras de plasma de dois indivíduos na fase aguda da infecção pelo HCV (A e B) e dois na fase crônica (C e D), em um mesmo ensaio. Os coeficientes de variação encontrados foram: 8,7% (A), 9,9% (B), 1,3% (C) e 2,8% (D). A média do coeficiente de variação encontrado nos pacientes agudos, 9,3%, foi maior do que o coeficiente de variação do kit comercial Murex, até 7,2%.

A análise da repetibilidade interensaio foi realizada em 15 ensaios diferentes utilizando amostras de plasma dos mesmos indivíduos A, B, C e D. Os coeficientes de variação encontrados foram: 11,4% (A), 15,1% (B) 5,0% (C) e 8,6% (D). A média do coeficiente de variação obtidos para os pacientes em fase aguda estiveram acima do coeficiente de variação interensaio do teste comercial Murex, até 10,2%.

*5.2.3 – Acompanhamento de controles internos:*

O índice de avidéz obtido na análise interensaio foi avaliado como controle interno dos ensaios. De acordo com as normativas seguidas para validação dos controles internos, nenhum dos ensaios violou duas ou mais regras de alerta, ou regras mandatórias, então validando o ensaio.

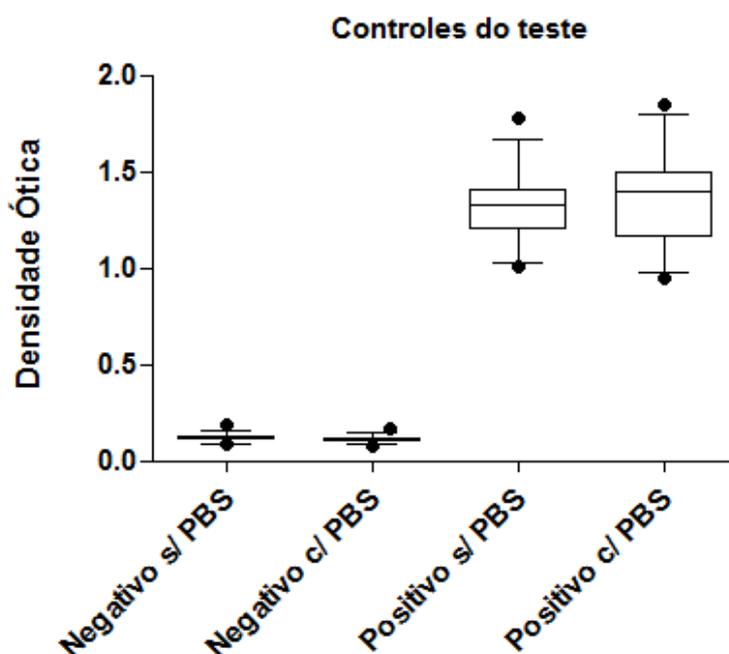
Apenas um teste realizado com a amostra (C) de paciente na fase crônica da infecção ultrapassou dois desvios padrões. Entretanto, com apenas uma regra de alerta violada, o teste continua sendo validado (Gráfico 3).



**Gráfico 3** – Gráfico de Levey-Jennings para representação da distribuição do índice de aidez das amostras testadas (A, B, C e D). Interensaio: 15 ensaios distintos. (+/-s : desvio padrão).

5.2.4 - Avaliação dos controles positivo e negativo do kit Murex Anti-HCV version 4.0 (DiaSorin):

Foram também avaliados os controles negativo e positivo do teste comercial Murex quanto à possível alteração dos resultados devido à adição da etapa de incubação com PBS a 37°C por 15 minutos ao protocolo do fabricante. Não foram observadas diferenças significativas no resultado dos controles negativo e positivo ( $P > 0,05$ ) na presença ou ausência de PBS durante a etapa de incubação (Gráfico 4). Em todos os ensaios, os controles negativo e positivo validaram o ensaio, segundo instruções do fabricante.

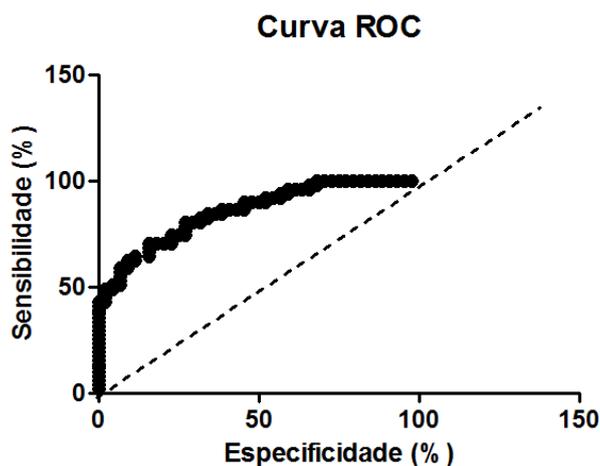


**Gráfico 4** – Gráfico de comparação dos resultados dos controles negativo e positivo do teste comercial de cada ensaio. Negativo s/ PBS (n=34), Negativo c/ PBS (n=34), Positivo s/ PBS (n=34), Positivo c/ PBS (n=34). \*n= número de amostras

### 5.3 – Análise de desempenho do teste de avidéz adaptado:

#### 5.3.1 – Determinação do valor de corte, zona cinza, sensibilidade e especificidade,:

A capacidade do teste de avidéz adaptado em discriminar pacientes em fase aguda daqueles em fase crônica foi avaliada a partir da curva ROC. O valor de corte de 71% foi escolhido para máxima obtenção de sensibilidade e identificação do maior número possível de pacientes em fase aguda. A área da curva teve valor de 0,85 (Gráfico 5).



**Gráfico 5** – Curva ROC para avaliação do valor de corte. Area:0,85

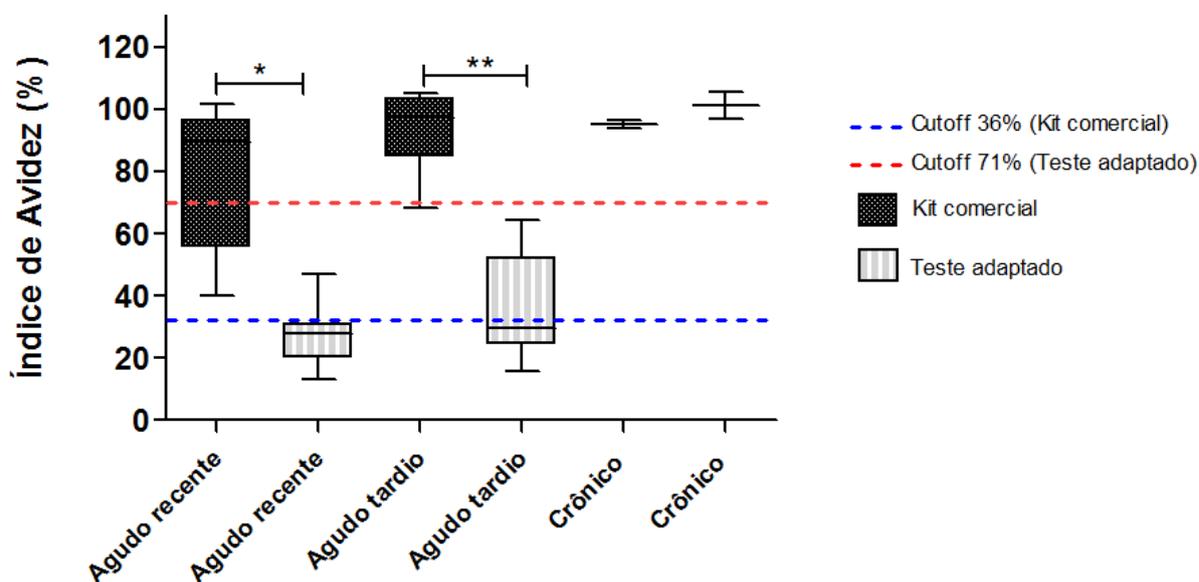
Posteriormente, foi estipulada a zona cinza de 10% sobre o valor de corte ao considerar-se a variação média intra e interensaio de pacientes em fase aguda. Assim, os valores de referência estabelecidos foram:  $\leq 64\%$  Agudo; 65-77% indeterminado;  $\geq 78\%$  crônico; 45-54% (associado à HCV-RNA negativo) resolução espontânea. Amostras de pacientes com resultados na faixa de indeterminado foram testadas novamente e feito a média do primeiro e do segundo IA obtidos.

Com a utilização de 52 amostras de 37 pacientes com data de infecção conhecida ou soroconversão comprovada, elevados valores de sensibilidade e especificidade foram obtidos: 90% e 95%, respectivamente. As amostras de indivíduos na fase aguda da infecção também foram utilizadas para cálculo da sensibilidade e especificidade durante a evolução da fase aguda e transição para a fase crônica (até 6 meses de infecção). Nessa avaliação foi observado uma queda na sensibilidade e especificidade para 73% e 75%, respectivamente.

### 5.3.2 - Comparação dos índices de avidéz obtidos no teste adaptado e o teste comercial DS-EIA-Anti-HCV Avidity.

Foram comparados os resultados do teste de avidéz adaptado deste trabalho com o teste de avidéz comercial *DS-EIA-Anti-HCV Avidity*. Foram utilizadas 25 amostras de plasma de 22 pacientes divididos em grupos de acordo com a fase da infecção: agudo recente e agudo tardio (aqueles com data de infecção conhecida ou soroconversão comprovada) e crônico.

De acordo com os parâmetros do teste comercial, nenhuma das amostras de plasma testadas apresentou índice de avidéz referente à fase aguda da hepatite C, sendo os valores encontrados nos grupos agudo recente ( $77,6 \pm 23,7$ ) e agudo tardio ( $84,9 \pm 23,1$ ). Entretanto, o teste desenvolvido neste trabalho identificou como amostras de indivíduos em fase aguda da infecção tanto aquelas pertencentes ao grupo agudo recente ( $32,7 \pm 20,0$ ) como aquelas inseridas no agudo tardio ( $52,9 \pm 28,4$ ). No grupo crônico, ambos os testes identificaram corretamente a fase da infecção, não sendo observada significância entre o teste comercial ( $95,2 \pm 1,8$ ) e o teste adaptado ( $101,2 \pm 5,8$ ) (Gráfico 6).



**Gráfico 6** - Comparação dos índices de avidéz Anti-HCV IgG obtidos em amostras de plasma no teste comercial *DS-EIA-Anti-HCV Avidity* (barras cinza pontilhado) e no teste adaptado (barras listras cinza e branca). Grupos: Agudo recente (n=10), Agudo tardio (n=13) e Crônico (n=2). N: número de amostras. ( \*\*P<0,01 / \*P<0,05).

### *5.3.3 – Análise de concordância entre o teste de avidéz adaptado e a classificação dos pacientes de acordo com critérios clínico-laboratoriais:*

A análise de concordância (índice Kappa) na classificação de indivíduos na fase aguda da hepatite C foi realizada entre o teste de avidéz e a classificação clínico-laboratorial. Inicialmente a comparação foi realizada utilizando apenas pacientes com data de infecção conhecida e/ou soroconversão comprovada. Esta obteve índice kappa de 0,84, demonstrando excelente concordância entre as metodologias.

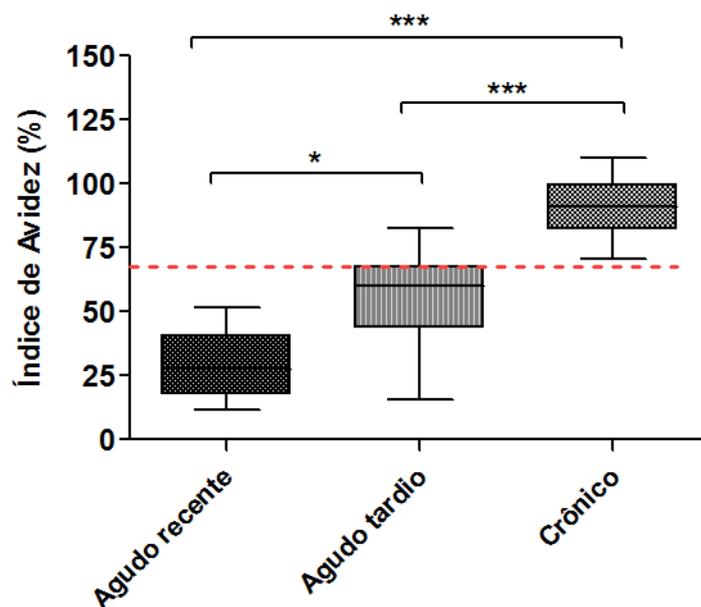
Posteriormente, além dos pacientes acima citados, foram também utilizados os pacientes sem data de infecção conhecida e/ou soroconversão comprovada). Nessa etapa o valor de kappa obtido foi de 0,53, referindo-se a uma concordância moderada na classificação de pacientes agudos e crônicos entre as diferentes metodologias. Essa queda na concordância entre as metodologias (teste de avidéz e clínico-laboratorial) na classificação de pacientes na fase aguda da infecção demonstra um viés existente na metodologia clínico-laboratorial, uma vez que alguns pacientes são classificados apenas com base em cálculos a partir da data de icterícia e/ou anmese feita com o paciente

## **5.4 –Aplicação do teste de avidéz adaptado**

### *5.4.1 - Identificação da fase aguda da infecção:*

Foram testadas 112 amostras de plasma de 74 pacientes. Dentre eles, 24 eram oriundos de clínicas de hemodiálise e por isso poderiam apresentar diferença... Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os mesmos. Dessa maneira, todas as amostras passaram a ser avaliadas como um único grupo.

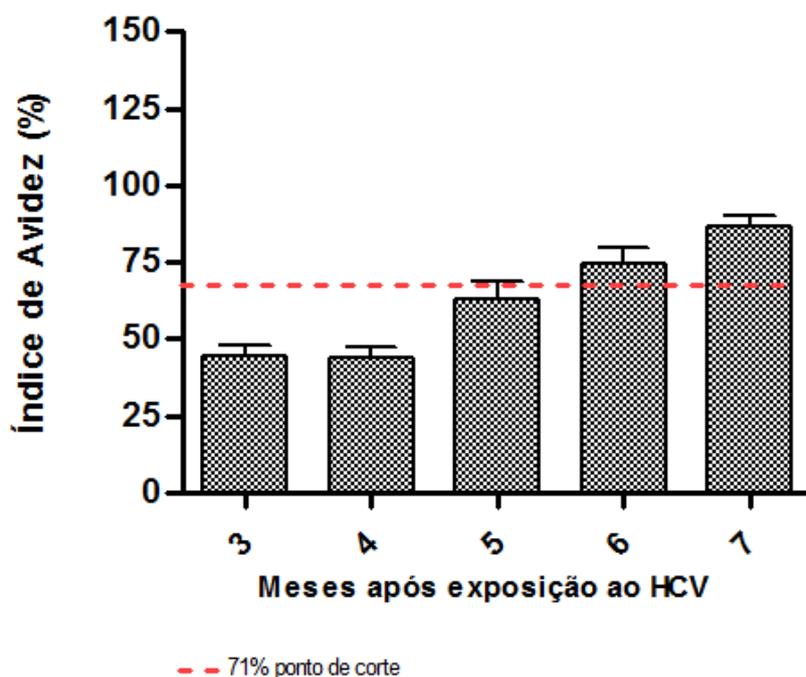
Foi possível observar que o grupo agudo recente com IA: 29,52 ( $\pm 12,66$ ) apresentou diferença significativa ( $P<0,05$ ) quando comparado ao grupo agudo tardio 54,88 ( $\pm 16,67$ ). Da mesma forma, foi possível encontrar diferença significativa entre os grupos agudo recente e crônico 91,20 ( $\pm 9,99$ ) ( $P<0,001$ ) e entre agudo tardio e crônico ( $P<0,001$ ) (Gráfico 7).



**Gráfico 7** - Índice de avidéz Anti-HCV IgG de amostras de plasma de pacientes com hepatite C tratadas com guanidina 1,5M. Grupos: Agudo recente (n=29), Agudo tardio (n=29), Crônico (n=54). N: número de amostras. (\*\*\*) $P < 0,001$  / (\*) $P < 0,05$ ).

A partir destes dados foi possível estabelecer um intervalo de confiança (95%) para diferenciação de indivíduos na fase aguda de acordo com o período da infecção, até 4 meses (agudo recente) e 5-6 meses (agudo tardio): agudo recente (até 34%); agudo tardio (45-58%), e indeterminado (35-44%).

Cada paciente selecionado para este teste possuía pelo menos duas amostras em tempos distintos, com uma variação total de 2,1 a 7,0 meses. Deste modo, foi possível acompanhar a elevação do índice de avidéz mensalmente durante a fase aguda da infecção. Inicialmente, entre o terceiro e quarto mês não foi observado aumento do índice de avidéz. Entre o quarto e quinto mês o índice de avidéz apresentou elevação de 43,5%. Em seguida, o índice de avidéz elevou 18,2% no sexto mês e 15,7% no sétimo. A elevação do índice de avidéz do terceiro ao sétimo mês foi de 94,1% (Gráfico 8).



**Gráfico 8** – Avaliação da elevação do índice de avidéz Anti-HCV IgG na fase aguda da hepatite C. Grupos: 3 meses (n=20); 4 meses (n=47); 5 meses (n=21); 6 meses (n=27); 7 meses (n=14). \*n= número de amostras

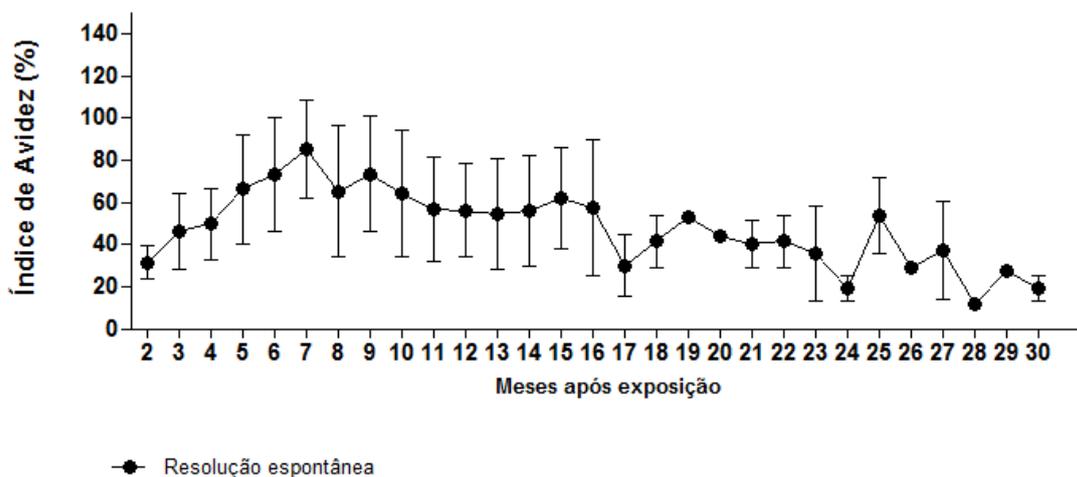
#### 5.4.2. – Avaliação do perfil do índice de avidéz ao longo da infecção pelo HCV:

Todos os pacientes classificados no teste de avidéz adaptado como em fase aguda (recente ou tardio, n=39 pacientes) foram acompanhados de forma sequencial para avaliação da evolução do índice de avidéz ao longo da infecção.

Todas as amostras referentes a um mesmo mês de infecção foram agrupadas. A partir da média e desvio padrão foi possível identificar a tendência do índice de avidéz de acordo com o desfecho da infecção.

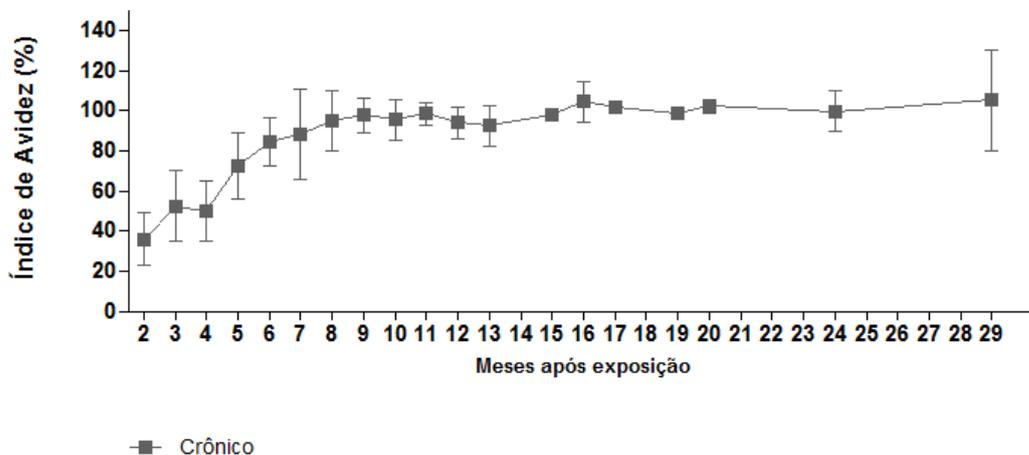
Nos gráficos 9 e 10 estão representadas as tendências do índice de avidéz de pacientes com resolução espontânea e infecção crônica, após exposição ao HCV, respectivamente.

O pico no índice de avidéz em pacientes com resolução espontânea da infecção foi observado entre o sexto e sétimo mês da doença com média e desvio padrão de  $73,30 \pm 26,8$  e  $84,96 \pm 23,29$ . Foi possível observar queda no índice de avidéz a partir do décimo mês de infecção ( $64,24 \pm 30,00$ ) (Gráfico 9).



**Gráfico 9** – Acompanhamento da evolução do índice de avidez em pacientes que evoluíram para resolução espontânea da infecção após exposição ao HCV (n=241). \*n= número de amostras

Na evolução para fase crônica da infecção o índice de avidez apresentou pico no oitavo mês ( $95,29 \pm 15,03$ ), mantendo-se com baixa variação nos meses seguintes (3,6%) (Gráfico 13).



**Gráfico 10** – Acompanhamento da evolução do índice de avidez em pacientes que cronificaram a infecção após exposição ao HCV (n=185). \*n= número de amostras

A partir da análise de resultados foi observada diferença significativa ( $P < 0,001$ ) no IA entre os grupos crônico e resolução espontânea a partir de 10 meses de infecção.

#### *5.4.3 – Análise do índice de avidéz em pacientes atendidos na rotina do Ambulatório de Hepatites Virais*

Após o desenvolvimento e avaliação do teste de avidéz, o mesmo passou a ser utilizado como ferramenta de diagnóstico complementar na rotina do Ambulatório de Hepatites Virais (AHV). Foram realizados testes de avidéz em 122 amostras plasma de 61 pacientes entre junho de 2014 a janeiro de 2016.

Foram identificados quatro pacientes na fase aguda recente da infecção, oito na fase aguda tardia, 26 na fase crônica e 23 pacientes com resolução espontânea da hepatite C. Alguns pacientes identificados na fase aguda tiveram acompanhamento do índice de avidéz na evolução da infecção: dois pacientes evoluíram para a resolução espontânea e sete pacientes para a fase crônica.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra, pela primeira vez no Brasil, o desenvolvimento e aplicação de um teste para a identificação e diferenciação da hepatite C aguda, com elevadas sensibilidade e especificidade. A identificação da hepatite C aguda é importante para auxiliar no diagnóstico de casos incidentes da infecção, bem como auxiliar na melhor condução dos pacientes a partir da descoberta da fase em que se encontra a doença.

Foi descrito neste trabalho a adaptação de um teste ELISA comercial de terceira geração para estimar a avidéz de anticorpos anti-HCV em 570 amostras de plasma de 147 pacientes com hepatite C. Foi possível demonstrar a avidéz dos anticorpos precocemente, desde o segundo mês após infecção, e o aumento da avidéz ao longo do tempo, atingindo níveis máximos no oitavo mês de infecção.

O teste de avidéz adaptado consistiu na adição de uma etapa de incubação com guanidina 1,5M ao protocolo do kit comercial com posterior cálculo do índice de avidéz pela razão entre os resultados de amostras incubadas com guanidina e com tampão fosfato (Hedman et al., 1989). Esta metodologia é empregada para a hepatite C desde 1994 quando Ward et al. relataram a adaptação do teste de ELISA de segunda geração. Posteriormente, assim como em nosso estudo, outros trabalhos demonstraram a modificação de testes de terceira geração (Kanno et al., 2002; Coppola et al., 2007; Klimashevskaya et al., 2007; Gaudy-Graffin et al., 2010; Sheperd et al., 2013), aliando as elevadas sensibilidade e especificidade à praticidade e baixo custo de implantação e realização proporcionadas pela utilização de um teste comercial. Assim, foi possível empregar na rotina de diagnóstico da hepatite C imediatamente após a padronização do teste.

Empregando-se os valores de  $\leq 64\%$  para fase aguda, zona cinza entre 65-77% e  $\geq 78\%$  para fase crônica, foram obtidas sensibilidade de 90% e especificidade de 95% até 4 meses após infecção, e sensibilidade de 73% e especificidade de 75% entre 5-6 meses após infecção. Outros estudos tiveram como valor de corte 30% (Sheperd et al., 2013); 42% (Klimashevskaya et al., 2007); 43% (Gaudy-Graffin et al., 2010) e 70% (Coppola et al., 2007). Essa variação quanto ao valor de corte empregado em cada trabalho esta relacionada, provavelmente, ao tipo de população empregada, às diferentes metodologias e agentes desnaturantes utilizados. Com relação à variação da sensibilidade e especificidade com o avanço da fase aguda (5-6 meses de infecção) pode-se relacionar com o fato de ser

uma faixa de transição entre a fase aguda e a fase crônica, mostrando a heterogeneidade das amostras.

Outra variabilidade encontrada na avidéz das amostras analisadas foram os coeficientes de variação intra e interensaio mais elevados nas amostras provenientes de fase aguda do que de fase crônica. A variação mais elevada na fase aguda foi de 15% na avaliação interensaio, que está em concordância com outros trabalhos que demonstraram uma variabilidade interensaio de 13% (Gaudy-Graffin et al., 2010) e até 29% (Shepherd et al., 2015).

Diferentemente de outros testes de avidéz que classificam a fase de infecção por meses ou dias após estabelecimento dos sintomas (Coppola et al., 2007), ou após último anti-HCV negativo (Ward et al., 1994; Kanno et al., 2002; Klimashevskaya et al., 2007; Gaudy-Graffin et al., 2010), o presente estudo foi padronizado a partir de amostras de pacientes com data de infecção conhecida provindas de clínicas de hemodiálises com casos de surtos internos de hepatite C. Além disso, um dos pacientes pertencente à coorte do AHV, também possuía data de infecção conhecida devido a um acidente biológico e foi acompanhado a partir de 8 dias de infecção. Assim, foi possível determinar a avidéz dos anticorpos com exatidão durante a fase aguda da hepatite C, incluindo a diferenciação entre agudo recente e agudo tardio de acordo com meses após infecção.

A população de estudo investigada com o teste de avidéz padronizado foi diversificada, compreendendo pacientes com vias de risco de infecção diversas como: hemodiálise, transmissão sexual, acidente biológico e utilização de drogas endovenosas e nasais. Neste trabalho, a população foi de minoria assintomática, sendo estes indivíduos compreendidos no grupo de pacientes com risco de infecção em hemodiálise. Naqueles indivíduos sintomáticos, os sinais e sintomas mais frequentemente encontrados foram icterícia e colúria, respectivamente. Com a utilização de pacientes oriundos de surtos de hepatite C em clínicas de hemodiálise, este trabalho contou com uma população rara, uma vez que a data de infecção pelo HCV era conhecida, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos no teste. Além disso, também foram utilizados pacientes com soroconversão documentada. Em 1994, Ward et al. descreveram o primeiro teste de avidéz para hepatite C avaliando pacientes imunocomprometidos. Outros estudos avaliaram o índice de avidéz em pacientes imunocompetentes com soroconversão documentada (Kanno et al. 2002; Klimashevskaya *et al.*, 2007; Sheperd et al., 2013). Outra população estudada empregando-se o teste de avidéz para hepatite C foram usuários de drogas endovenosas

(Coppola et al., 2007; Cullen et al., 2015). Em 2009, Coppola et al. realizaram um estudo com método de avidéz em populações mistas compostas por pacientes sintomáticos hemodialisados, usuários de drogas endovenosas e indivíduos imunocompetentes infectados pelo HCV.

O desempenho do teste de avidéz adaptado foi comparada com duas metodologias: (a) teste de avidéz comercial não disponível no país e (b) metodologia de classificação da hepatite C através da avaliação clínico laboratorial empregada no AHV (Lewis et al. 2010). Com relação ao teste comercial *DS-EIA-Anti-HCV Avidity*, o resultado obtido foi inesperado. O teste comercial não classificou nenhum paciente em fase aguda mesmo com data de infecção conhecida, de acordo com o protocolo do kit. A discrepância entre os resultados obtidos nas duas metodologias pode estar relacionada ao agente desnaturante utilizado, tempo e temperatura de incubação, bem como aos antígenos de sensibilização das placas.

Posteriormente, na comparação da classificação clínico laboratorial (Lewis, et al., 2010) e o teste de avidéz adaptado, o resultado apresentou concordância excelente. Entretanto, quando pacientes sem data de infecção conhecida ou soroconversão documentada foram adicionados à avaliação, a concordância obtida teve queda, tornando-se mediana. Isso pode ser explicado pela ausência de evidências comprobatórias da data de infecção, levando, muitas vezes, à uma classificação baseada no histórico do paciente. Sugerindo, dessa forma, um viés existente na atual forma de identificação dos pacientes. Essa classificação está sujeita a erro quanto ao tempo de infecção, principalmente em casos de transmissão sexual, uma vez que, geralmente, não se pode predizer o dia exato de infecção nesta via. Corroborando com essa hipótese o achado de que 54% dos pacientes com índice de avidéz de fase crônica na primeira amostra testada neste trabalho, tinham como risco de infecção a transmissão sexual. Não há na literatura, até o momento, descrição de comparações de concordância entre os testes de avidéz desenvolvidos e o critério clínico laboratorial.

Posteriormente, acompanhamos a evolução do índice de avidéz mensalmente em pacientes desde a fase aguda até 30 meses após infecção. Ao realizar comparação estatística entre os grupos crônico e resolução espontânea, foi possível identificar diferença significativa entre os mesmos somente a partir de 10 meses de infecção. Naqueles que evoluíram para a cronicidade da doença foi possível observar uma elevação no índice de avidéz até o 10º mês de infecção, o que foi observado por Kanno et al. 2002 até o 15º mês, depois os índices se mantiveram em nível elevado. Por outro

lado, na avaliação longitudinal inédita da avidéz em pacientes que evoluíram para a resolução espontânea da hepatite C, foi observado pico no índice de avidéz com 6 meses de infecção e posterior queda para níveis considerados de fase aguda, mas com HCV RNA negativo. Por isso, concomitantemente ao teste de avidéz o HCV RNA deve ser investigado para excluir a possibilidade de falso caso agudo. Klimashevskaya et al., 2007 demonstraram, através da diluição seriada de amostras de pacientes com evolução para resolução espontânea, que a diminuição no índice de avidéz nessa fase da doença deve-se, provavelmente, à diminuição nos níveis de anticorpos circulantes. Todavia, os níveis de anticorpos circulantes nos pacientes deste estudo permaneceram compatíveis com resultado reagente no ELISA anti-HCV convencional. Essa diminuição no índice de avidéz em indivíduos com resolução espontânea da hepatite C é controversa ao encontrado na literatura. Em outros agravos, o índice de avidéz permanece elevado após a resolução da doença ou após imunização prévia, como: varicela-zoster; toxoplasma gondii; hepatite B; citomegalovírus; herpes vírus (Kangro et al., 1991; Jenum et al., 1997; Thomas, 1997; Eggers et al., 2000; Ward et al., 2001; Suligoj et al., 2003; Puchhammer-Stockl et al., 2005).

Por fim, o teste de avidéz adaptado foi aplicado em pacientes da rotina do AHV com a identificação de 20% de pacientes na fase aguda, 42% na fase crônica e 38% de pacientes com resolução espontânea. Dessa forma, o primeiro teste de avidéz desenvolvido no país demonstrou ser útil para a identificação das fases da infecção pelo HCV. Principalmente em situações de ausência de informações sorológicas prévias, o teste de avidéz adaptado deve ser utilizado como ferramenta diagnóstica complementar para elucidação do caso clínico. Além disso, deve ser utilizado no auxílio à vigilância epidemiológica para o diagnóstico da hepatite C aguda.

## 7. CONCLUSÕES

Coletivamente os resultados deste estudo demonstraram que:

- A padronização do teste de avidéz adaptado ocorreu de forma satisfatória a partir da utilização de guanidina 1,5M por 15 minutos a 37°C, sendo eficaz na detecção da elevação do índice de avidéz durante a fase aguda e eficaz na diferenciação de pacientes na fase aguda e crônica da infecção pelo HCV.

- O teste de avidéz foi validado após apresentar os coeficientes de variação intra e interensaio dentro dos limites aceitáveis descritos na literatura; pelos controles internos não terem violado as regras de Levey-Jennings; bem como não ter havido interferência no resultado dos controles positivo e negativo do teste comercial após a adição da etapa de tratamento com guanidina.

- O desempenho do teste foi considerado satisfatório com a diferenciação das fases aguda recente, aguda tardia e crônica da hepatite C com alta sensibilidade e especificidade; com a identificação correta de pacientes quando comparado ao teste comercial DS-EIA-Anti-HCV Avidity.

- Na fase aguda da infecção, pacientes que evoluíram para a cronicidade ou resolução espontânea não apresentaram diferença significativa quanto ao índice de avidéz.

- A utilização do teste de avidéz adaptado como método complementar na rotina do atendimento no AHV foi útil na detecção de pacientes nas fases aguda, crônica e resolução espontânea da infecção.

## **8. PERSPECTIVAS**

Avaliar o teste de avidéz adaptado com painéis de soroconversão e maior número de pacientes com data de infecção conhecida;

Avaliar a performance do teste de avidéz adaptado em outros laboratórios.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaravadi RK, Thompson CB. 2007. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* 13: 7271-7279.

Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. 2005. Chronic hepatitis C – natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol.* 1(22):74-78.

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

Asselah T 2014. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection: An oral combination therapy with high antiviral efficacy. *Journal of Hepatology* . 61: 435–438

Barrera J, Prancis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, Lee S. 1995. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third generation ELISA. *Vox Sang;*68:15-18.

Bradshaw D, Matthews G, Danta M. (2014). Sexually transmitted hepatitis C infection: the new epidemic in MSM. *Current opinion in infectious diseases,* 26(1).

Bowen DG, Walker CM. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* 436:946–952.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Silva C, Spinelli LM, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP 2005. Geographic distribution of hepatitis C vírus genotype in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(1): 41-9.

CDC - Infectious Diseases Related to Travel - Hepatitis C - Chapter 3 - 2016 Yellow Book – Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-totravel/hepatitis-c> (Acessado em 22 de fevereiro de 2016, 14:33)

Cerny A, Chisari FV. 1999. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology.* 30(3):595-601

Chan J 2014. Hepatitis C. *Dis Mon.* 60(5):201-212.

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

Chevaliez S, Pawlotsky JM 2006. HCV Genome and Life Cycle. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology.* Horizon Bioscience, Norfolk (UK), 5-26.

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

Chun-Yan Yeung, Hung-Chang Lee, Wai-Tao Chan, Chun-Bin Jiang, Szu-Wen Chang, Chih-Kuang Chuang. 2014. Vertical transmission of hepatitis C virus: Current knowledge and perspectives *World J Hepatol.* 6(9): 643-651.

Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ, Terrault NA, Wiley-Lucas TE, Afdhal N, et al 2006. Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology*. 131(2):470-477.

Cooke GS, Lemoine M, Thursz M, Gore C, Swan T, Kamarulzaman A, et al. 2013. Viral hepatitis and the Global Burden of Disease: a need to regroup. *Journal of Viral Hepatology*. 20: 600-601.

Coppola N, Pisapia R, Marrocco C, Martini S, Vatiere LM, Messina V, et al. 2007. Anti-HCV IgG Avidity index in acute hepatitis C. *Journal of clinical virology*. 40:110-115.

Coppola N, Pisapia R, Tonziello G, Masiello A, Martini S, Pisaturo M, Messina V, Sagnelli C, Macera M, Signoriello G, Sagnelli E 2009. Improvement in the aetiological diagnosis of acute hepatitis C: A diagnostic protocol based on the anti-HCV-IgM titre and IgG Avidity Index. *Journal of Clinical Virology*. 222–229.

Coppola N, Vatiere LM, Sagnelli E 2005. HCV genotype 2 as a risk factor for reactivation of chronic HCV infection. *GUT*. 54:1207.

Corey K, Mendez-Navarro J, Gorospe E, Zheng H, Chung R. 2010. Early treatment improves outcomes in acute hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Journal of Viral Hepatitis*. 17(3): 201-7.

Daeron M 1997. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*.15:203–34.

Daniels D, Grytal S, Wasley A 2009. Surveillance for acute viral hepatitis—United States, 2007. *MMWR Surveill. Summ*. 58:1–27.

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10: 51-64.

Donahue JG, Muñoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yawn DH, McAllister HA Jr, et al. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992. 327(6):369-373.

Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci*. 106(33):14046-51

Elliot LN, Lloyd AR, Ziegler JB, Ffrench RA. 2006. Protective immunity against hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*. 84(3):239-249.

Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, Maher JJ. 2001. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B independent, caspase-3-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 49077-49082.

Farci P, Alter HJ, Govindrajan S, et al. 1992. Lack of protective immunity against hepatitis C virus. *Science*. 258:135–140.

Farci P, Alter HJ, Wong DC, et al.: Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:7792–7796.

Ferreira Ade S, Perez Rde M, Ferraz ML, Lewis-Ximenez LL, Pereira JL, de Almeida PR, et al. 2011. Acute Hepatitis C Study Group of The Brazilian Society of Hepatology. Acute hepatitis C in Brazil: results of a national survey. *J Med Virol*. 83(10):1738-1743.

Focaccia, R. 2013. *Tratado de Hepatites Virais e Doencas Associadas*. São Paulo: Atheneu.

Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. 2006: Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin. Vacc. Immunol*. 13 : 33 -36.

Gaudy-Graffin C, Lesage G, Kousignian I, Laperche S, Girault A, Dubois F, Goudeau A, Barin F 2010. Use of an Anti-Hepatitis C Virus (HCV) IgG Avidity Assay To Identify Recent HCV Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(9): 3281-3287.

Giraldo M, Portela RWD, Snege M. 2002. Immunoglobulin M (IgM)-glycoinositolphospholipid enzyme-linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute Toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. *J. Clin. Microbiol*. 40 : 1400 -1405

Gorgos L. (2013). Sexual transmission of viral hepatitis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 27(4).

Grellier L, Brown D, Power J, Dusheiko G: Absence of anti-envelope antibodies and clearance of hepatitis C virus in a cohort of Irish women infected in 1977. *J Viral Hepat* 1997, 4:379–381.

Gretch DR, 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. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. *Clin Liver Dis*. 1(3):543-557.

Hagan H, Neurer J, Jordan A, Des Jarlais D, Wu J, Dombrowski K, et al. 2014. Hepatitis C virus infection among HIV-positive men who have sex with men: protocol for a systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*. 3(31).

Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ 2013. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 10(9):62-553.

Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nature reviews*. (6): 231-246.

Hedman K, Seppa LAI 1988. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Clin. Immunol.* 8: 214 -221.

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

Henry RJ, Segalove M 1952. The running of standards in clinical chemistry and the use of the control chart. *J Clin Pathol.* 27:493-501.

[Hoofnagle JH](#). 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* (5 Suppl 1):S21-9.

Idrees M, Riazuddin S 2008. Frequency distribution of hepatitis C virus genotypes in different geographical regions of Pakistan and their possible routes of transmission. *BMC Infect Dis.* 8 (69)

Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S 1984. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J. Clin. Microbiol.* 20: 525 -529.

Irshad M, Dhar I 2006. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 15: 405-416

Irshad M, Dhar I, Irshad K 2013. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection *World Journal Gastroenterology.* 19(44): 7896-7909

Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, et.al 2014. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 384: 403-413

Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, Santantonio T, Mayer J, Zankel M, et al. 2001. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *The New England Journal of Medicine.* 15: 1452-7.

Jou JH, Muir AJ 2012. Hepatitis C. *Ann Intern Med.* 157(11):1-6.

Kanno A, Kazuyama Y 2002. Immunoglobulin G Antibody Avidity Assay for Serodiagnosis of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medical Virology.* 68: 229-233.

Kao JH, Lai MY, Hwang YT, Yang PM, Chen PJ, Sheu JC, Wang TH, et al 1996. Chronic hepatitis C without anti-hepatitis C antibodies by second-generation assay: a clinicopathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. *Dig Dis Sci.* 41:161- 165

Kapadia SB, Chisari FV. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2561–2566.

Ke PY, Chen SS. 2011. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest.* 121: 37-56.

Ke PY, Chen SSL, 2012. Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases. *Viruses.* 4: 2251-2290.

Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeir G, Nelles M, et al. 1992. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion.* 32(9): 805-813.

Klimashevskaya S, Obriadina A, Ulanova T, Bochkova G, Burkov A, Araujo A, Stramer SL, Tobler LH, Busch MP, Fields HA 2007. Distinguishing Acute from Chronic and Resolved Hepatitis C Virus (HCV) Infections by Measurement of Anti-HCV Immunoglobulin G Avidity Index. *Journal of Microbiology.* 3400–3403.

Kohli A, Shaffer A, Sherman A, Kottlilil S 2014. Treatment of hepatitis C: a systematic review. *JAMA,* 12(6): 631-40.

Kolling G, Castro AC, de Kastro P. 2007. Chute no Fígado. *Placar Magazine.* 42-44.

Kuramoto IK, Moriya T, Schoening V, Holland PV 2002. Fluctuation of serum HCV-RNA levels in untreated blood donors with chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 9(1):36-42.

Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espirito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, et al. 2013. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antiviral Therapy.* 18: 435-444.

Landis JR, Koch GG 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33:159-75.

Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, García-Garzón S, Lázaro A, Miquel J, Perna C, Sanz-de-Villalobos E 2014. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology.* 20(13): 3418-3430.

Lauer GM, Walker BD 2002. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 345(1):41-52.

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

Lehtonen OP, Meurman OH 1982. An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. *J. Virol. Methods.* 5 : 1 -10.

Levey S, Jennings ER 1950. The use of control charts in the clinical laboratory. *J Clin Pathol.* 20:1059-66.

Lewis-Ximenez, LL, Lauer GM, zur Wiesch JS, Sousa PSF, Ginuino CF, Paranhos-Baccalá, et al 2010. Prospective follow-up of patients with acute hepatitis C virus infection in Brazil. *Clin Infect. Dis.* 50(9):1222-1230.

Li Hui-Chun, Lo Shih-Yen. 2015. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol.* 7(10): 1377–1389.

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

Major ME, Dahari H, Mihalik K, Puig M, Rice CM, Neumann AU, et al. 2004. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology.* 39(6):1709-1720.

Maher JJ, Scott MK, Saito JM, Burton MC. 1997. Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. *Hepatology,* 25: 624-630.

Mandell G, Bennett J, Dolin R 2010. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (7th Edition ed., Vol. 1).

Martin FF, Masanori K‡ 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures.. *Nature reviews.* (11): 47-59.

Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara Met al. 2008. Spanish Acute HCV Study Group. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol.* 48(1):20-27.

Martins T, Narciso-Schiavoni JL, Lucca Schiavoni L 2011. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Rev Assoc Med Bras.* 57(1):107-112

Masciopinto F, Freer G, Burgio VL, Levy S, Galli-Stampino L, Bendinelli M, Houghton M, Abrignani S, Uematsu Y 2002. Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology.* 304: 187-196

Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ . 2008. Acute hepatitis C. *Lancet.* 372: 321–32

McGovern BH, et al. 2009. Improving the diagnosis of acute hepatitis C infection using expanded viral load criteria. *Clin. Infect. Dis.* 49:1051–1060.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E 2014. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology.* 00: 1-11.

Mincis M, Mincis R 2008. *Gastroenterologia & Hepatologia - Diagnostico e Tratamento.* Editora Leitura Médica.

MS, Ministério da Saúde 2009. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. A B C D E do Diagnóstico para as Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde, . 1. ed. p. 24.

MS, Ministério da Saúde 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasília: Ministério da Saúde;.

Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST 2013. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 57: 1333-1342.

Moradpour D, Penin F 2013. Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer. 369: 113-135.

Murray JD, 1993. *Mathematical Biology*. Berlin: Springer-Verlag

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):429-37.

Nomura H, Sou S, Tanimoto H, Nagahama T, Kimura Y, Hayashi J, et al 2004. Short-term interferon-alfa therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial. *Hepatology*. 39(5):1213-1219.

Orland JR, Wright TL, Cooper S 2001. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 33: 321–7.

Ozaras R, Tahan V 2006. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 7(3):351-361.

Papatheodoridis GV, Delladetsima JK, Katsoulidou A, Sypsa V, Albrecht M, Michel G, Hatzakis A, Tassopoulos NC 1997. Significance of IgM anti-HCV core level in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 27:36–41.

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

Pereira LMMB, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima MLC, Alencar LCAMC, Santos AA, Ximenes RAA 2013. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BioMed Central Infectious Diseases*. 13: 60.

Piñeiro D, Martinez-Salas E 2012. RNA Structural Elements of Hepatitis C Virus Controlling Viral RNA Translation and the Implications for Viral Pathogenesis. *Viruses*. 4: 2233-2250.

Pinon JM, Dumon H, Chemila C 2001. Strategy for diagnosis of congenital Toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of Immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J. Clin. Microbiol*. 39 : 2267 -2271.

Portal Brasil, [<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/10/anvisa-aprova-medicamento-para-o-tratamento-da-hepatite-c-1>] Anvisa aprova medicamento para o tratamento da hepatite C. [31 Out 2011].

Portal Sergio Franco [http://  
http://portal.sergiofranco.com.br/arquivos/texto/TESTE%20DE%20AVIDEZ.pdf]  
Utilidade do teste de avidéz dos anticorpos IgG no diagnóstico das doenças

Poynard T, Afdhal N 2010. Perspectives on fibrosis progression in hepatitis C: an à la carte approach to risk factors and staging of fibrosis. *Antiviral Therapy*. 15(3): 281-91.

Raina D, Wu GY. 2004. Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Current Hepatitis Reports*. 4: 136-139.

Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A 2012. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nature Rev. Immunol*. 12: 282–294.

Rehermann B, Nascimbeni M.2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Immunology*. 5: 215-229.

Rodella A, Galli C, Terlenghi L, Perandin F, Bonfanti C, Manca N 2006. Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Virology*. 206–212.

Roehrig JT, Nash D, Maldini B 2003. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg. Infect. Dis*. 9 : 376 -379.

Rumi MG, De Filippi F, La Vecchia C, Donato MF, Gallus S, Del Ninno E, et al 2005. Hepatitis C reactivation in patients with chronic infection with genotype 1b and 2c: a retrospective cohort study of 206 untreated patients. *GUT*. 54:402–6

Sagnelli E, Coppola N, Marrocco C, Coviello G, Battaglia M, Messina V, et al 2005. Diagnosis of HCV related acute hepatitis by serial determination of IgM anti-HCV titres. *J Hepatol*;42:646–51.

Sagnelli E, Santantonio T, Coppola N, Fasano M, Pisaturo M, Sagnelli C 2014. Acute hepatitis C: clinical and laboratory diagnosis, course of the disease, treatment. *Infection*. 42(4): 601-610.

Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT 2008. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J. Hepatol*. 49:625–633.

Scheel TKH, Rice CM. 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 19(7): 837–849.

Seeff L 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 5(Suppl. 1).

Sheen IS, Liaw YF, Lin DY, Chu CM 1996. Acute exacerbations in chronic hepatitis C: a clinicopathological and prognostic study. *J Hepatol*; 24:525–31.

Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M. 2003. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* 38: 605-614.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 42(4):962-973.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P 2014. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology.* 59(1): 318-327.

Sofian M, Aghakhani A, Farazi AA, Banifazl M, Eslamifar A, Rashidi N, et al 2012. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in hepatitis C virus infected patients. *Hepat Mo.* 12(12): e6156.

Steward MW, Lew AM 1985. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J. Immunol. Methods.* 78: 173 -190.

Strasak AM, Kim AY, Lauer GM, de Sousa PS, Ginuino CF, Fernandes CA, et al. 2011. Antibody dynamics and spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis.* 12(11):15.

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

Suligoï B, Galli C, Massi M, Di Sora F, Sciandra M, Pezzotti P, Recchia O, Montella F, Sinicco A, Rezza G 2002. Precision and Accuracy of a Procedure for Detecting Recent Human Immunodeficiency Virus Infections by Calculating the Antibody Avidity Index by an Automated Immunoassay-Based Method. *Journal of Clinical of Clinical Microbiology.* 4015–4020.

Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. 2010. Hepatitis C Virus Hijacks Host Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 21(1) p. 1-13

Thappa, D. 2000. Sexual co-transmission of HIV, hepatitis B, and hepatitis C viruses. *Sexual Transmitted Infections.* 76: 317-318.

Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology.* 80(4):1734-41.

EASL, The European Association for the Study of the Liver. 2015. Clinical Practice Guidelines:EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. Elsevier.

Tohme RA, Holmberg SD 2010. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology.* 52(4):1497-1505.

Tresó B, Takács M, Dencs Á, Dudás M, Pár A, Rusvai E 2013. Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes and subtypes among injecting drug users in Hungary. *Euro Surveill*. 1-6.

Tsai J, Jeng J, Ho M, Chang W, Lin Z 1996. Independent and additive effect modification of hepatitis C and B viruses infection on the development of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*. 24(3): 271-6.

Tyczyno M, Halota W, Nowak W, Pawlowska M 2014. Distribution of HCV Genotypes in the Populations of Inmates in Polish Prison Potulice and Patients Hospitalised in Bydgoszcz. *Hepat Mon*. 14(5): 1-3.

Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C 1994. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang*. 66:122-129.

Vachon ML, Dieterich DT 2011. The era of direct-acting antivirals has begun: the beginning of the end for HCV? *Seminars in liver disease*. 31: 399-409

Vaz AJ, Takei K, Buemp EC 2007. *Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações*. Ed.: Guanabara Koogan.

Vinuesa CG, Chang PP 2013. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nature reviews*. 4: 119-126.

Walsh N 2009. A review of viral hepatitis and HIV coinfection among injecting drug users and assessment of priorities for future activities. *WHO*. 1-53.

Wama Diagnóstica. Manual de uso do kit Imuno-Rápido HCV. Disponível em: . Acesso em: 02 de março. de 2016.

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

Wedemeyer H, Jäckel E, Wiegand J, Cornberg M, Manns M 2004. Whom? When? How? Another piece of evidence for early treatment of acute hepatitis C. *Hepatology*, 39(5), 1201-1203

Westgard JO, Barry PL 1986. Improving Quality Control by use of Multirule Control Procedures. Chapter 4 in *CostEffective Quality Control: Managing the quality and productivity of analytical processes*. AACC Press,. 92-117.

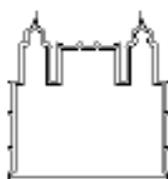
WHO. World Health Organization 2015. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection.

Yeung Chun-Yan , Lee Hung-Chang , Chan Wai-Tao , Jiang Chun-Bin , Chang Szu-Wen , Chuang Chih-Kuang. 2014. Vertical transmission of hepatitis C virus: Current knowledge and perspectives. *World J Hepatol*. 6(9): 643–651.

Zeisel MB, Felmler DJ, Baumert TF 2013. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol*; 369: 87-112

Zeuzem S, Franke A, Lee JH, Herrmann G, Ruster B, 1996. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology*. 24(5): 1003-1009.

## ANEXO I



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

Rio de Janeiro, 28 de janeiro de 2015.

### PARECER APROVADO

**Título do Projeto: "Fase aguda de infecção pelo vírus da hepatite C: avaliação da sua resposta imunológica celular e humoral".**

**Protocolo CEP: 0142/01**

**Pesquisador Responsável: Lia Laura Lewis-Ximenez**

**Instituição: Ambulatório de Hepatites Virais/LAHEP/IOC/Fiocruz**

Foi submetido à apreciação do CEP Fiocruz/IOC o relatório anual do projeto supracitado, datado de 16 de janeiro de 2015, assim como a solicitação para extensão do estudo por mais cinco anos.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 496/12, manifesta-se por aprovar o relatório anual do projeto supracitado, assim como a solicitação para extensão do estudo, submetida para avaliação do CEP Fiocruz/IOC.

Informamos que deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

**José Henrique da Silva Pilotto**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
(CEP Fiocruz-IOC)

## ANEXO II



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

### PARECER Nº 1115/2001

Registro CONEP = 2830 ( Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto )

Protocolo CEP = 142/01

Processo nº 25000.097699/2001-32

**Projeto de Pesquisa:** *Identificação de casos agudos de infecção pelo vírus da hepatite C e avaliação da sua resposta imunológica mediada por células*

**Pesquisador Responsável:** Dra. Lia Laura Lewis Ximenes de Souza Rodrigues

**Instituição:** Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ / RJ

**Área Temática Especial :** Pesquisa com cooperação estrangeira.

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

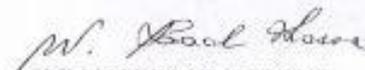
a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais das Res. CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 20 de setembro de 2001.

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP-MS

MSL

