

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR
COLORIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO
VÍRUS DA HEPATITE C**

CINTIA COSTI

Porto Alegre, dezembro de 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

CINTIA COSTI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR
COLORIMÉTRICO PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO
VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Co-orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, dezembro de 2008.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e recebeu financiamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Edital 04/2003 da FEPPS, PSUS-FAPERGS e FINEP.

"...Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer o que quero. Tenho felicidade bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte, tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos..."

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Maria Lúcia Rossetti, minha eterna gratidão pela oportunidade, paciência, confiança em mim depositada e, acima de tudo, pela amizade e pelo constante e incansável apoio nos momentos difíceis e ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela co-orientação e ajuda na realização desse trabalho, pelo apoio a esta e outras iniciativas de pesquisa que reafirmam a importância do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS no Rio Grande do Sul e no Brasil, e, acima de tudo, pelo exemplo de profissionalismo e ética. Muito obrigada!

A Dra. Cláudia Dornelles, pelos primeiros ensinamentos em biologia molecular e em hepatites virais e pelos conselhos e ajuda durante todas as etapas desse trabalho. Agradeço também pelas exigências sempre pertinentes, por todos estes anos de convivência e por me incentivar na busca do conhecimento. Muito obrigada!

À Márcia que, com toda sua paciência e amizade, me apoiou nos momentos mais difíceis, sempre me incentivando com suas palavras gentis. Muito obrigada!

À Tarciana e Fernanda, pela inestimável e valiosa amizade, pela cumplicidade, apoio, companheirismo, carinho e paciência - duas amigas imprescindíveis. Muito obrigada!

A todas colegas e amigas do CDCT, pelo agradável ambiente de trabalho, pelo espírito de equipe, em especial: à Elis, pela convivência, amizade e carinho – amiga sempre presente! À Candi, pelas valiosas dicas e brilhantes “sacadas”, aprendidas comigo, é claro!!! À Regina e à Mirela, amigas admiráveis, por serem sempre tão solícitas, dedicadas e responsáveis - exemplos a serem seguidos! À Deinha, pelo auxílio e ensinamentos, ainda na época das membranas, quanto tudo

começou... obrigada pela amizade, ajuda constante e por ter aceitado fazer parte da minha banca! Muito obrigada!

À Nicole, por ser uma aluna tão responsável e dedicada, fundamental na parte final da realização desse trabalho. Deixa-me muito orgulhosa sempre! Muito obrigada!

À Carol, pelo apoio incondicional e constante. Muito obrigada!

À Sandrinha, que nos recebe toda manhã, com um sorriso no rosto. Obrigada!

A todos os meus amigos, que entenderam minhas ausências e sempre estiveram presentes, me aconselhando e incentivando, com carinho e afeto. Muito obrigada!

Aos meus familiares, que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais. Obrigada por vocês existirem!

À minha mãe, que sempre me incentivou, sempre apoiou e, o melhor de tudo, sempre me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa! Muito muito obrigada por tudo!!

A todos, que de uma forma ou outra, auxiliaram e estiveram presentes na realização desse trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 A Hepatite C.....	14
1.2 Aspectos históricos	15
1.3 O Vírus da Hepatite C	15
1.4 A diversidade genética do HCV e seus genótipos	17
1.4.1 Genótipos do HCV no Rio Grande do Sul.....	20
1.5 Epidemiologia.....	21
1.6 Transmissão	24
1.7 Diagnóstico Laboratorial.....	25
1.7.1 Testes Sorológicos	26
1.7.2 Testes Moleculares Qualitativos	27
1.7.3 Testes Moleculares Quantitativos.....	29
1.7.4 Genotipagem.....	30
1.8 Tratamento.....	32
1.9 Hepatite C Oculta.....	34
2.JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVO	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. MANUSCRITO: High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil_.....	37
5. DISCUSSÃO	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
Apêndice 1 - Manuscrito publicado: High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil.....	74

Apêndice 2 - Curriculum Vitae do Autor.....	80
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

5'-NCR	Região 5' Não Codificante
ALT	Alanina Aminotransferase
pb	pares de bases
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxinucleosídeos trifosfatados
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EIA	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
HCV	Vírus da Hepatite C
INF	Interferon α
INF-PEG	Interferon α Peguilado
IRES	Sítio de entrada ribossomal
kb	Kilobases
MS	Ministério da Saúde
NCR	Região não codificante
NS	Não estrutural
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RBV	Ribavirina
RVP	Resposta Viroológica Precoce
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
SES	Secretaria Estadual de Saúde
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma do Vírus da Hepatite C.....	16
Figura 2. Mapa da distribuição mundial dos genótipos do HCV.....	18
Figura 3. Mapa da distribuição mundial do marcador anti-HCV.....	22
Figura 4. Fluxograma de investigação laboratorial da Hepatite C.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos das freqüências dos genótipos do HCV no Brasil.....	19
Tabela 2. Prevalência mundial dos infectados pelo HCV	22
Tabela 3. Prevalência do marcador anti-HCV em pré-doadores de sangue no Brasil, segundo regiões geográficas.....	23
Tabela 4. Prevalência do marcador anti-HCV em hemodialisados no Brasil, segundo as regiões geográficas.....	24

RESUMO

O diagnóstico laboratorial do Vírus da Hepatite C (HCV) pode ser realizado através de análises sorológicas ou por técnicas de biologia molecular. Os testes moleculares são divididos em qualitativos, quantitativos e de genotipagem. Esses são utilizados para confirmação diagnóstica, escolha da terapia antiviral e monitoramento do tratamento. Diversos testes moleculares comerciais estão disponíveis no mercado, no entanto, limitações como o custo elevado, alta complexidade e falta de validação são impeditivos para sua ampla utilização no país. Em razão das dificuldades citadas, novos métodos moleculares têm sido propostos como alternativa. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo o aprimoramento de um método *in house* para extração e purificação do RNA de HCV, bem como sua detecção qualitativa e genotipagem, utilizando hibridização em microplacas do produto de PCR biotilado, seguido de detecção colorimétrica. A região 5'-NCR do HCV foi escolhida para a amplificação. Para avaliar a eficiência do método colorimétrico de hibridização reversa (MCHR) proposto, os resultados foram comparados com os métodos de referência para detecção qualitativa e genotipagem do HCV. Entre as 85 amostras de plasma analisadas, a sensibilidade e especificidade do MCHR para detecção do RNA viral, quando comparado com *Cobas Amplicor HCV Assay v2.0*, foram de 100% (95% IC; 92,75% - 100%) e de 97,2% (95% IC; 85,48% - 100%), respectivamente. Os valores preditivo positivo e preditivo negativo foram de 98% (95% IC; 89,36% - 99,95%) e de 100% (95% IC; 90,01% - 100%), respectivamente. O *Kappa* encontrado foi de 0,976 ($p < 0,001$), mostrando alto grau de concordância entre os dois métodos de detecção qualitativa. Para genotipagem do HCV, pôde-se observar 97,22% (35/36) de concordância entre o MCHR e o seqüenciamento de DNA. O *Kappa* encontrado foi de 0,976 ($p < 0,001$), mostrando alto grau de concordância entre os dois métodos de genotipagem. Sendo assim, o método proposto apresentou bons resultados de sensibilidade e especificidade, com alto grau de concordância com os métodos de referência, tanto para detecção qualitativa, como para genotipagem do HCV.

“ABSTRACT”

The tests for HCV diagnosis are divided into serological and molecular assays. The molecular assays are used to confirm viremia, choice of antiviral therapy and monitor the response to antiviral therapy. A variety of commercial molecular assays have been developed, however, limitations such as the high cost, high complexity and lack of validation impede its widespread use, especially in developing countries. Because of the difficulties cited above, new molecular biology techniques have been proposed as alternatives. Thus, this study aimed at the improvement of an in house method for extraction and purification of RNA from HCV as well as its qualitative detection and genotyping, using hybridization in microplates of biotin-labeled PCR products, followed by colorimetric detection. The region of HCV 5'-NCR was chosen for the amplification. To evaluate the efficiency of colorimetric microwell hybridization assay (CMHA), the results obtained were compared with the reference methods. Among the 85 plasma samples analyzed, the sensitivity and specificity of CMHA for viral RNA detection, when compared with Cobas Amplicor HCV assay v2.0, were 100% (95% CI, 92.75% - 100%) and 97.2% (95% CI, 85.48 % -100%), respectively. The positive predictive and negative predictive values were 98% (95% CI, 89.36% - 99.95%) and 100% (95% CI, 90.01% -100%), respectively. The calculated Kappa was 0.976 ($p < 0001$), showing high correlation between the two methods. Similarly, it was observed 97.22% (35/36) of agreement between the DNA sequencing data and MCHR, for HCV genotyping. The Kappa values was 0.976 ($p < 0001$), showing high correlation between the two methods. The proposed method showed good sensitivity and specificity, with a high degree of concordance between the reference methods for both qualitative detection and for genotyping of HCV.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hepatite C

A hepatite C, causada pelo Vírus da Hepatite C (HCV), é uma doença infecciosa que se tornou um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Os dados que apontam 170 milhões de infectados no planeta, sendo 4,5 milhões deles no Brasil, refletem apenas estimativas (WHO, 2000; BRASIL, 2003).

A transmissão do HCV ocorre, principalmente, por via parenteral. Geralmente, o HCV causa infecções clinicamente silenciosas, caracterizadas por uma lenta progressão que leva ao dano hepático. Manifestações clínicas costumam surgir somente 10 a 40 anos após a infecção. Estudos indicam que cerca de 15 a 40% das pessoas infectadas se curam na fase aguda, entretanto, 60 a 85% desses, têm RNA viral detectável por mais de seis meses, sendo assim considerados portadores crônicos (NIH, 2002). Os pacientes infectados permanecem virêmicos e, portanto, transmissores por esse longo período de tempo. Níveis elevados da enzima alanina aminotransferase (ALT) e presença de anticorpos anti-HCV não são suficientes para a definição do diagnóstico de hepatite C, por serem considerados métodos indiretos. O teste molecular qualitativo é considerado “padrão ouro” entre as metodologias usadas no diagnóstico da hepatite C por ser um método direto, onde pequenas quantidades de RNA viral são detectadas no plasma (NHI, 2002; AASL, 2004).

O diagnóstico molecular é utilizado para confirmação diagnóstica, escolha da terapia antiviral e monitoramento do tratamento. No entanto, limitações como o custo elevado e a falta de validação dos testes comerciais disponíveis são um impeditivo para sua ampla utilização no país.

1.2 Aspectos Históricos

A suspeita da existência do HCV surgiu nos anos 70, quando alguns estudos relataram vários casos de hepatite pós-transfusional, sem a detecção dos marcadores virais para as já conhecidas hepatites A e B. Assim sendo, os autores inferiram a possibilidade da existência de outro vírus causador de hepatite do tipo não-A, não B (PRINCE *et al.*, 1974; ALTER *et al.*, 1975).

Em 1989, após mais de uma década de pesquisas intensas, o vírus da HCV emergiu da obscuridade (CHOO *et al.*, 1989). Esse foi o primeiro vírus descoberto através de técnicas de biologia molecular. A partir dessa descoberta, foi possível o desenvolvimento dos primeiros testes capazes de detectar anticorpos contra o HCV (KUO *et al.*, 1989). Com a subsequente implantação desses testes em bancos de sangue, os casos da até então denominada hepatite não-A, não-B diminuíram acentuadamente (DONAHUE *et al.*, 1992).

1.3 O Vírus da Hepatite C

A caracterização da seqüência de ácido nucléico revelou que a organização genômica do HCV era similar à dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (MILLER & PURCELL, 1990). O genoma do HCV é constituído por uma molécula de RNA fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 9.500 nucleotídeos, que contém três regiões distintas: uma única longa fase de leitura aberta (ORF - *Open Reading Frame*), flanqueada por duas regiões não codificantes. A ORF é traduzida em uma única poliproteína precursora que é, posteriormente, processada e clivada em diversas proteínas funcionais pela ação de proteinases virais e do hospedeiro, dando origem às proteínas estruturais (capsídeo, envelope) e não-estruturais (NS) (CHOO *et al.*, 1991) (Figura 1).

No genoma do vírus existem duas regiões não codificantes localizadas nas extremidades 5' e 3', sendo consideradas importantes sítios controle da

transcrição e da tradução. A região 5' não traduzida (5'-NCR) do HCV, com aproximadamente 341 nucleotídeos, possui estrutura secundária complexa, incluindo um sítio de entrada ribossomal (IRES), que regula a tradução. Essa região mostra alto grau de conservação entre os diferentes isolados, apresentando geralmente mais de 90% de similaridade entre as diferentes seqüências (BUKH *et al.*, 1992). No entanto, apesar de ser extremamente conservada, tal região contém polimorfismos específicos associados a cada um dos genótipos e subtipos virais (SMITH *et al.*, 1995; STUYVER *et al.*, 1995).

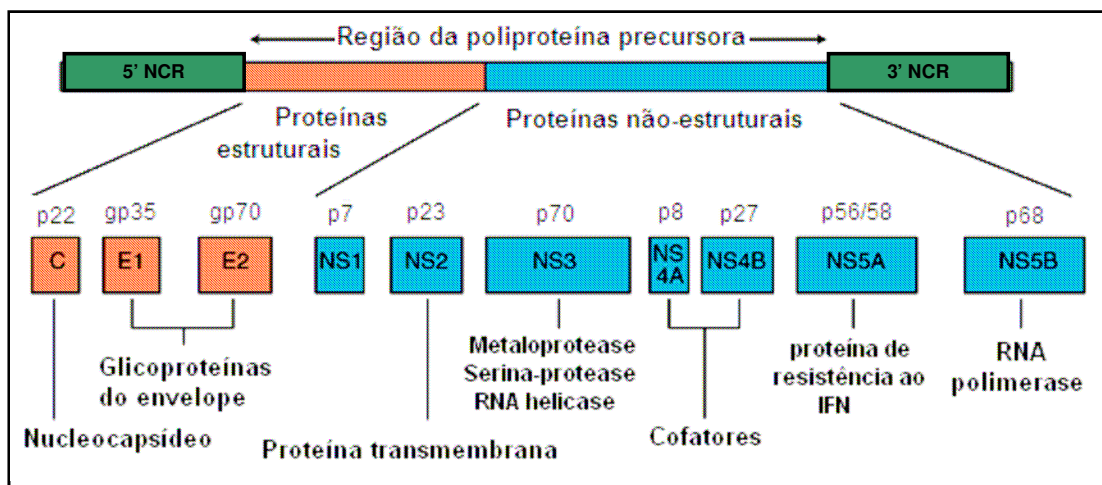


Figura 1. Genoma do HCV. As caixas de cor verde mostram as regiões: Região 5' não traduzida (5'-NCR) e Região 3' não traduzida (3'-NCR). Na cor laranja são destacadas as regiões que codificam proteínas estruturais. Na cor azul são regiões que codificam proteínas não estruturais (ANZOLA *et al.*, 2003).

A região 3'-NCR contém uma região variável, uma cauda de ribonucleotídeos poli-U, seguida por uma região de 98 - 100 nucleotídeos altamente conservada que, possivelmente, são importantes seqüências sinalizadoras que determinam o início da síntese do RNA viral (FRIEBE & BARTENSCHLAGER, 2002).

1.4 A diversidade genética do HCV e seus genótipos

Assim como outros vírus de RNA, o HCV tem uma grande heterogeneidade genética. Isso se deve à baixa fidelidade da enzima RNA polimerase viral na síntese de RNA (OGATA *et al.*, 1991). Essa enzima não possui um mecanismo de correção e reparo (*proofreading*) durante o processo de replicação viral, favorecendo a formação de populações virais com pequenas diferenças no seu genoma, denominadas “quasispécies”. A presença dessas variantes pode ser detectada em um mesmo indivíduo infectado e, parece ser fundamental para o estabelecimento da infecção crônica e para o escape do vírus ao reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro (DUARTE *et al.*, 1994).

A variabilidade se dá em todo o genoma do HCV, no entanto, as regiões 5'-NCR e 3'-NCR são as mais conservadas (SIMMONDS, 1999). Os genes que codificam glicoproteínas do envelope, E1 e E2, são os mais variáveis. Mudanças nas seqüências de aminoácidos dessas proteínas podem alterar as propriedades antigênicas dos mesmos e, assim, permitir que o HCV não seja reconhecido pelos anticorpos neutralizantes produzidos pelo hospedeiro (SIMMONDS, 1999).

Comparações entre seqüências de nucleotídeos de diferentes isolados do HCV têm levado à descrição de vários tipos virais, cuja heterogeneidade genética pode chegar a 33%, analisando todo o genoma (OKAMOTO *et al.*, 1992). Um sistema consenso de nomenclatura foi proposto por SIMMONDS *et al.* (1994). De acordo com esse sistema, o HCV foi classificado, com base na similaridade entre as seqüências nucleotídicas, em seis grupos, definidos como genótipos. Esses foram designados por números arábicos de 1 a 6. Além disso, mais de 100 subtipos já foram identificados e são classificados através de letras minúsculas do alfabeto. Os genótipos podem diferir de 30 a 35% entre suas seqüências nucleotídicas, enquanto que entre os subtipos essas diferenças podem variar de 15 a 20% (SIMMONDS *et al.*, 1994).

A distribuição dos genótipos e subtipos do HCV apresenta significativa variação geográfica e na freqüência em que são observados. Assim, os genótipos 1, 2 e 3 distribuem-se pelo mundo (ZEIN, 2000); o genótipo 4 é

encontrado, principalmente, na África Central, Egito e no Zaire; o 5 na África do Sul e o 6 na Ásia (MCOMISH *et al.*, 1994; MELLOR *et al.*, 1995; NGUYEN *et al.*, 2005; NAINAN *et al.*, 2006) (Figura 2).

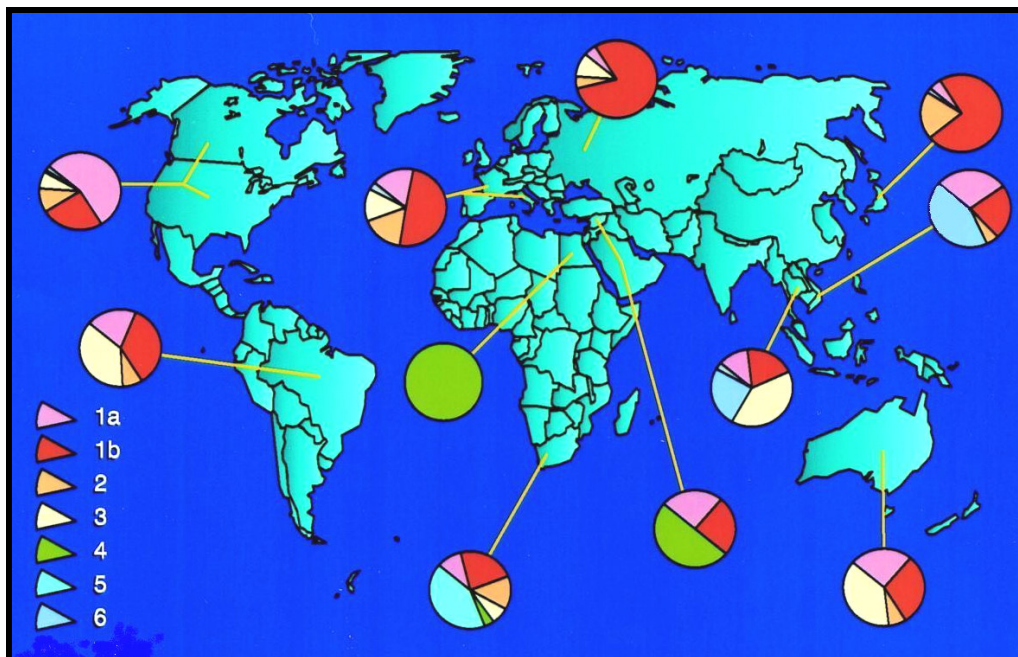


Figura 2. Distribuição mundial dos genótipos do HCV (Fonte: Zein, 2000 - com modificações).

O Brasil é um país de dimensão continental com uma população de origens étnicas diferentes. Assim, uma grande variação nas freqüências dos genótipos do HCV é observada em nosso país (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Um estudo realizado em São Paulo investigou a prevalência e distribuição dos genótipos do HCV em diferentes populações (doadores de sangue, hemodialisados, transplantados e portadores crônicos do HCV). A freqüência encontrada foi a seguinte: genótipo 1, 63%, genótipo 2, 4,3%, genótipo 3, 31,3% e genótipo 4, 0,3% (BASSIT *et al.*, 1999).

Outro trabalho mais recente analisou 1.688 pacientes de diversas regiões geográficas do Brasil. O genótipo 1 foi encontrado em 64,9% dos pacientes; genótipo 2 em 4,6%; genótipo 3 em 30,2%; genótipo 4 em 0,2% e genótipo 5 em 0,1% (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Quando analisadas as diversas regiões do país, os estudos têm demonstrado considerável variação

na distribuição de genótipos, mas de forma geral, observa-se maior prevalência do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2 (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos das freqüências dos genótipos do HCV no Brasil, publicadas até 2008.

Autor/ano	Local	Nº	Grupo de indivíduos	Técnica genotipagem	Prevalências genótipos 1, 2, 3
KRUG <i>et al.</i> , 1996	Porto Alegre	100	HCV +	RFLP	1 (55%), 2 (8%), 3 (37%)
BASSIT <i>et al.</i> , 1999	SP	348	HCV +	Inno-Lipa	1 (63%), 2 (4,3%), 3 (31,3%)
OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1999	Belo Horizonte	44	Hemofílicos	RFLP	1 (84,1%), 3 (13,6%)
PARANÁ <i>et al.</i> , 2000	Bahia	232	HCV +	Inno-Lipa	1 (63%), 2 (6%), 3 (26%)
BUSEK <i>et al.</i> , 2002	Belo Horizonte	83	Renais Crônicos	RFLP	1 (66,3%), 2 (24,1%), 3 (7,2%)
CAMPIOTTO <i>et al.</i> , 2005	São Paulo	840	HCV +	Seqüenciamento Região 5'-NCR	1 (63%), 2 (5%), 3 (32%)
	Rio de Janeiro	234			1 (79%), 2 (5%), 3 (16%)
	Pernambuco	122			1 (60%), 2 (2%), 3 (37%)
	Paraná	156			1 (52%), 2 (6%), 3 (42%)
SILVA <i>et al.</i> , 2005	São Paulo	89	Doadores de sangue	Inno-Lipa	1 (45%), 2 (5,7%), 3 (40%)
SILVA <i>et al.</i> , 2007	Rio Grande do Sul	627	HCV +	RFLP	1 (53,9%), 2 (5,4%), 3 (40,7%)
	Santa Catarina	917			1 (51%), 2 (2,9%), 3 (46,1%)
BEZERRA <i>et al.</i> , 2008	Ceará	95	HCV +	RFLP	1 (47,4%), 2 (8,4%), 3 (34,7%)
MENDES-CORREA <i>et al.</i> , 2008	São Paulo	100	HIV +	Sequenciamento 5'-NCR	1 (68,7%), 2 (4%), 3 (26,3%)

Recentemente na cidade de São Paulo, foi realizado um estudo avaliando a distribuição dos genótipos do HCV em pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). O genótipo 1 foi observado em 68,7% dos pacientes, genótipo 2 em 4%, genótipo 3 em 26,3%, e genótipo 4 em 1% (MENDES-CORREA *et al.*, 2008). É importante citar que alguns trabalhos brasileiros relataram a ocorrência de genótipos incomuns, como é o caso do genótipo 4 e 5, numa frequência extremamente baixa (BASSIT *et al.*, 1999; LEVI *et al.*, 2002; MENDES-CORREA *et al.*, 2008).

O tratamento padrão para pacientes cronicamente infectados com HCV baseia-se no uso do interferon-peguilado (INF-PEG) em combinação com a ribavirina (RBV). A identificação do genótipo viral é recomendada antes do tratamento, pois tal informação é importante para delinear a duração do tratamento e a medicação a ser usada (NIH, 2002; AASLD, 2004). Pacientes infectados com genótipos 2 ou 3 têm melhor prognóstico, pois respondem melhor à terapia que pacientes infectados com genótipos 1 ou 4, (HADZIYANNIS *et al.*, 2004; SHIFFMAN, 2007).

1.4.1 Genótipos do HCV presentes no Estado do Rio Grande do Sul

Em um estudo prévio, realizado entre 1995 e 1996 no Rio Grande do Sul, 100 amostras de plasma de pacientes positivos para a presença do RNA do HCV foram genotipadas por RFLP. Três genótipos principais foram detectados, o mais prevalente foi o genótipo 1 (55%), seguido pelos genótipos 3 (37%) e 2 (8%) (KRUG *et al.*, 1996).

Com o intuito de atualizar os dados epidemiológicos da Região Sul do país, 11 anos depois, SILVA *et al.* (2007) investigaram a distribuição dos genótipos do HCV em 1544 pacientes do Rio Grande do Sul (RS) e de Santa Catarina (SC). Os dados do RS mostraram que os genótipos circulantes foram 1, 2 e 3, com frequências de 53,9%, 5,4% e 40,7%, respectivamente. Em relação à SC, o genótipo 1 também foi o mais prevalente com 51%, seguido do genótipo 2 com 2,9% e do genótipo 3 com 46,1%. Os dados corroboram com

os observados por KRUG *et al.* (1996), mostrando que não houve mudanças substanciais na última década.

A alta frequência do genótipo 3 do HCV observado no RS e em SC é relevante e mostra que os pacientes dessa região do País têm um melhor prognóstico em comparação aos pacientes de outros estados. Esses pacientes, geralmente, além de responderem melhor à terapia que os infectados com genótipo 1, necessitam de metade do tempo de tratamento, proporcionando uma redução de custos as Secretarias Estaduais de Saúde (SES), que são as responsáveis pela liberação da medicação antiviral (SILVA *et al.*, 2007).

1.5 Epidemiologia

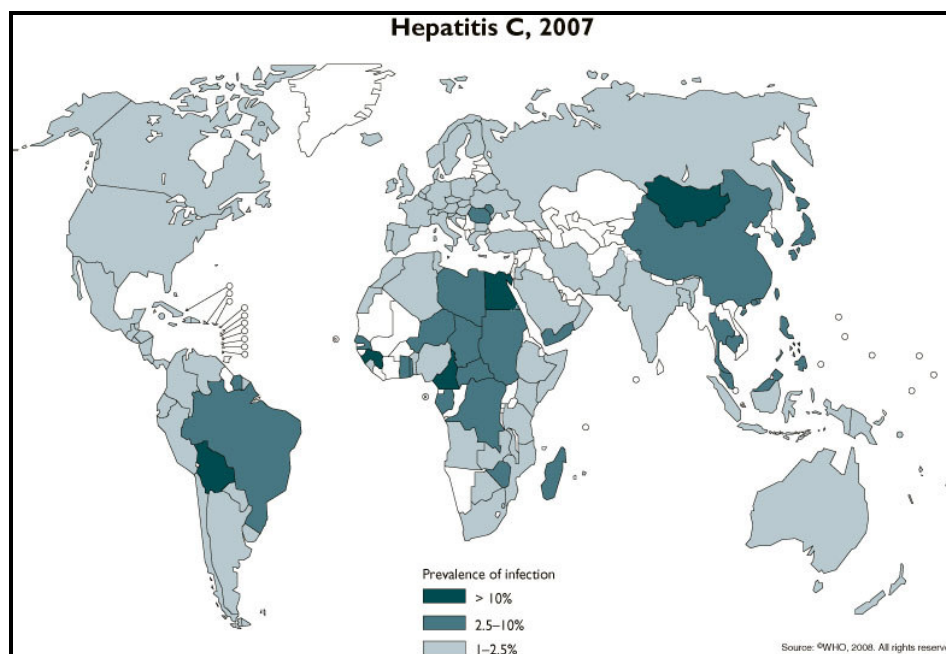
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 170 milhões pessoas estejam infectadas com o HCV no mundo, com cerca de três a quatro milhões de novas infecções a cada ano. A prevalência da infecção pelo HCV em algumas regiões da África, Mediterrâneo Oriental, Sudeste da Ásia e do Pacífico Oeste é elevada em comparação com alguns países da América do Norte e Europa (Tabela 2; Figura 3) (WHO, 2000).

É importante salientar que a maioria desses resultados corresponde a dados de prevalência de anticorpos anti-HCV coletados em testes de triagem em doadores de sangue. Portanto, tais informações podem não refletir a prevalência da população, uma vez que doadores de sangue pertencem a um grupo seletivo de indivíduos que são avaliados clinicamente e triados para fatores de riscos associados a várias doenças infecciosas (ALTER *et al.*, 1999).

Tabela 2. Prevalência mundial do marcador anti-HCV.

Regiões	População Total (milhões)	Prevalência da hepatite C (%)	População infectada (milhões)	Nº países sem dados
África	602	5,3	31,9	12
Américas	785	1,7	13,1	7
Mediterrâneo Oriental	466	4,6	21,3	7
Europa	858	1,03	8,9	19
Sudeste da Ásia	1500	2,15	32,3	3
Pacífico Ocidental	1600	3,9	62,2	11
Total	5811	3,1	169,7	57

Fonte: WHO, 1999.

**Figura 3.** Prevalência mundial da hepatite C (WHO, 2007)

No Brasil, os números referentes a pacientes infectados com o HCV são escassos e também correspondem a dados coletados em exames de triagem

de doadores de sangue da rede de hemocentros e apontam para um índice de positividade de 1,2%. No entanto, a estimativa de incidência geral aponta para, aproximadamente, o dobro desse percentual (BRASIL, 2003).

Na tabela 3 está indicada a prevalência do marcador anti-HCV em pré-doadores de sangue, segundo regiões geográficas, em inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia para analisar a epidemiologia do HCV no Brasil. Considerando as diferentes regiões do Brasil, a maior taxa de prevalência entre os doadores de sangue foi encontrada na Região Norte e a menor, na Região Sul. Dos 1.173.406 pré-doadores de sangue avaliados, 14.527 (1,23%) foram positivos para o marcador sorológico anti-HCV. (FONSECA *et al.*, 1999).

Tabela 3. Prevalência do marcador anti-HCV em pré-doadores de sangue no Brasil segundo regiões geográficas.

Regiões	Nº Amostras	Anti-HCV (+)	%
Norte	183.195	3.891	2,12
Centro-Oeste	41.371	432	1,04
Nordeste	191.720	2.29	1,19
Sudeste	380.054	5.452	1,43
Sul	377.066	2.462	0,65
Total	1.173.406	14.527	1,23

A tabela 4 mostra a prevalência do marcador anti-HCV em hemodialisados no Brasil segundo as regiões geográficas. Quando observada a prevalência do marcador anti-HCV em hemodialisados, a região Norte do Brasil aparece novamente com a maior taxa de prevalência, enquanto que a região Nordeste aparece com a menor (FONSECA *et al.*, 1999).

Tabela 4. Prevalência do marcador anti-HCV em hemodialisados no Brasil segundo as regiões geográficas.

Regiões	Nº Amostras	Anti-HCV (+)	%
Norte	378	172	45,50
Centro-Oeste	590	180	30,51
Nordeste	395	94	23,80
Sudeste	314	111	35,35
Sul	401	175	43,64
Total	2.078	797	38,35

1.6 Transmissão

A infecção pelo HCV é disseminada, fundamentalmente, pela exposição parenteral ao sangue de pessoas infectadas. A transmissão pode ocorrer por transfusão de sangue e hemoderivados, utilização de seringas e agulhas contaminadas e transplantes de órgãos. A transfusão de sangue contaminado foi a principal forma de transmissão da hepatite C até início dos anos 90. No entanto, sua incidência foi consideravelmente reduzida quando em diversos países do mundo foi iniciada a triagem sorológica em bancos de sangue (EASL, 1999; WHO, 1999).

No Brasil, em 1993, foi estabelecida a obrigatoriedade da realização dos testes sorológicos para investigação dos anticorpos anti-HCV por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) nos bancos de sangue. Com a sistemática aplicada, atualmente o índice de transmissão desse vírus por transfusão sanguínea diminuiu no país (STRAUSS, 2001).

A transmissão sexual é pouco freqüente (menos de 3% em parceiros estáveis) e ocorre, principalmente, em pessoas com múltiplos parceiros e com práticas sexuais de risco. A coexistência de alguma doença sexualmente transmissível (DST) constitui-se em um importante facilitador da transmissão. A

presença de lesões no trato genital, comum durante os episódios de DST, pode facilitar a transmissão do HCV (SIMMONDS, 2004). Em um estudo recente realizado na Síria, mais de 600 pacientes infectados foram testados, juntamente com seus cônjuges, para a presença do HCV. Os pesquisadores observaram apenas um caso onde o cônjuge também era infectado, porém não com o mesmo genótipo do seu parceiro, confirmando, assim, que a transmissão sexual em casais monogâmicos é incomum (ANTAKI *et al.*, 2008).

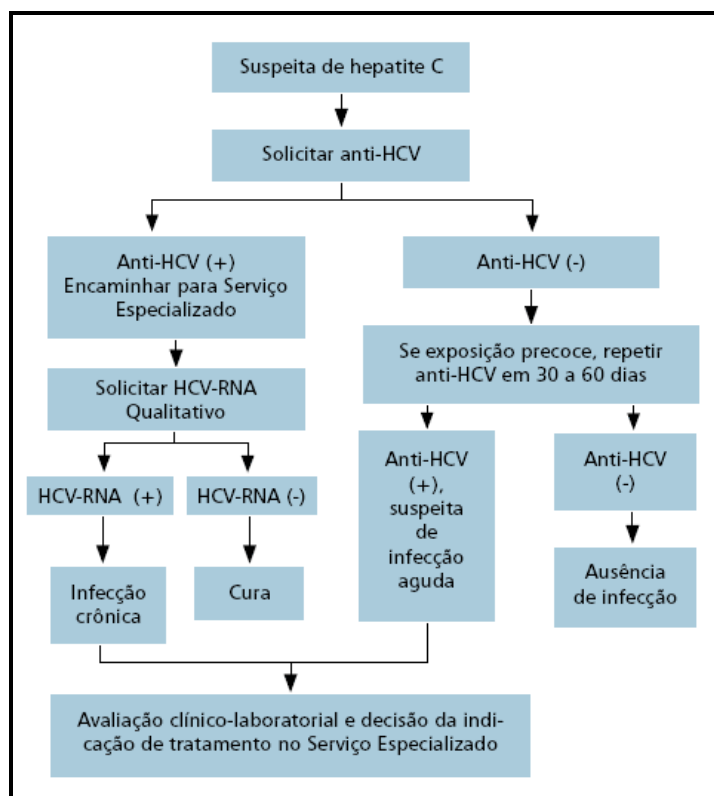
A transmissão vertical do HCV é rara. Entretanto, já se demonstrou que gestantes com carga viral elevada do HCV ou co-infectadas pelo HIV, apresentam maior risco de transmitir a doença para os recém-nascidos (BRASIL, 2005).

Segundo Ministério da Saúde (MS) são consideradas populações de risco: a) indivíduos que receberam transfusão de sangue ou hemoderivados antes de 1993, b) usuários de drogas injetáveis ou de cocaína inalada que compartilham equipamentos de uso e c) pessoas com tatuagens, *piercing* ou que apresentem outra forma de exposição cutânea (BRASIL, 2005).

1.7 Diagnóstico Laboratorial

Normalmente, o diagnóstico laboratorial do HCV envolve uma etapa de triagem sorológica, realizada por ensaios imunoenzimáticos, e uma etapa confirmatória, através do emprego de métodos moleculares qualitativos para a detecção do RNA viral (Figura 4).

Os testes moleculares quantitativos são utilizados no acompanhamento terapêutico de pacientes para quantificação da viremia, enquanto que a genotipagem molecular é indicada para subsidiar a definição do plano terapêutico (NIH, 2002; AASLD, 2004).

Figura 4. Fluxograma de investigação laboratorial do HCV.

Fonte: Brasil, 2005

1.7.1 Testes Sorológicos

A detecção de anticorpos anti-HCV em soro ou plasma é baseada na utilização de ensaios imunoenzimáticos (EIA). O mais utilizado é o teste de ELISA que detecta anticorpos específicos contra diversos epítopos do vírus. A especificidade dos EIAs de terceira geração é maior que 99% (COLIN, 2001). Sua sensibilidade é mais difícil de determinar, dada a falta de um método padrão-ouro, mas é excelente em indivíduos imunocompetentes infectados por HCV. Os EIAs podem ser totalmente automatizados e estão bem adaptados ao grande volume de ensaios das rotinas laboratoriais (ALTER *et al.*, 2003)

Os *immunoblots*, utilizados anteriormente para resolver casos indeterminados devido sua grande especificidade, hoje estão obsoletos, dado o

bom desempenho dos EIAs de terceira geração e das técnicas moleculares de detecção qualitativa do HCV (PAWLOTSKY *et al.*, 1998; ALTER *et al.*, 2003; SCOTT & GRETCH, 2007).

Os testes de ELISA são considerados bons métodos de triagem, porém apresentam limitações. Esses testes não diferenciam uma infecção ativa de uma infecção já resolvida, pois o marcador anti-HCV, mesmo em pacientes curados, pode permanecer positivo por muitos anos (BISCEGLIE & BACON, 1999). Os anticorpos detectados não conferem imunidade, apenas são marcadores de contato prévio com HCV.

Apesar da substancial melhoria em sensibilidade e em especificidade dos testes comerciais, falsos resultados positivos ainda ocorrem, especialmente, em populações de baixo risco como doadores de sangue (PAWLOTSKY, 1996; HYAMS *et al.*, 2001).

Outra problemática se refere ao fato de que a sensibilidade desses testes pode se tornar baixa em pacientes hemodialisados e imunocomprometidos, pois esses pacientes, além de apresentarem soroc conversão tardia, podem apresentar títulos de anti-HCV abaixo do nível detectável, resultando em sorologia falso negativa (PAWLOTSKY, 1999; LAKSHMI & REDDY, 2007).

A janela imunológica, período compreendido entre a exposição ao HCV e o aparecimento do marcador sorológico anti-HCV, também é uma das limitações desses testes. O período pode variar de duas a 20 semanas, com uma média de 8 semanas, diminuindo, consideravelmente, a utilidade desse teste para diagnósticos de infecção aguda pelo HCV (GRETCH, 1997).

1.7.2 Testes Moleculares Qualitativos

O diagnóstico sorológico apresenta limitações e os mesmos são incapazes de diferenciar uma infecção crônica de uma infecção já resolvida. O diagnóstico molecular qualitativo tem sido considerado “padrão ouro” entre os métodos de identificação do HCV existentes, por ser um método rápido e sensível de detecção da replicação e infecciosidade viral, onde pequenas

quantidades do material genético do vírus podem ser detectadas, a partir de uma ou duas semanas após a infecção (ERENSOY, 2001; NIH, 2002; AASLD, 2004).

As vantagens dos testes moleculares incluem: a) diagnóstico precoce na infecção viral aguda em indivíduos que ainda não desenvolveram anticorpos anti-HCV, b) discriminação de pacientes com infecção crônica, daqueles que conseguiram eliminar o vírus, c) diagnóstico da infecção em neonatos de mães portadoras do vírus (GERMER *et al.*, 2001), d) resolução do diagnóstico em casos com resultados sorológicos indeterminados, e) monitoramento de pacientes beneficiados com o tratamento antiviral e f) identificação do HCV em indivíduos com comprometimento imunológico (transplantados, hemodialisados, HIV positivos) (PAWLOTSKY, 1999).

A detecção qualitativa baseia-se, geralmente, no princípio da amplificação de uma seqüência alvo de ácidos nucléicos, usando as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR em tempo real (*real-time* PCR) ou amplificação mediada por transcrição (TMA) (PAWLOTSKY, 2002). Por ser altamente conservada, a região 5' NCR do vírus é preferencialmente escolhida como alvo *primers* e sondas específicas utilizadas em testes *in house* e comerciais (GERMER & ZEIN, 2001).

Na técnica de RT-PCR, o RNA viral extraído é retro-transcrito em um único DNA complementar (cDNA) que é, posteriormente, processado em uma reação cíclica enzimática, levando à geração de um grande número de cópias. Cópias de DNA dupla fita do genoma do HCV são sintetizados em testes baseados na PCR, enquanto que cópias de RNA fita simples são geradas no TMA. A detecção de produtos amplificados é alcançada através da hibridização dos mesmos com sondas específicas após a PCR ou TMA (PAWLOTSKY, 2002).

Na PCR em tempo real, cada ciclo de amplificação leva à emissão de um sinal fluorescente, sendo que o número de sinais por ciclo é proporcional à quantidade de RNA do HCV presente inicialmente na amostra clínica (MARTELL *et al.*, 1999; KOMURIAN *et al.*, 2001). Os ensaios para detecção qualitativa devem ter sensibilidade mínima de 50 UI/mL, segundo recomendações internacionais (NHI, 2002), além de sensibilidades iguais para

a detecção de todos os genótipos do HCV. O limite inferior de detecção dos testes qualitativos, como o *RT-PCR Amplicor® v2.0 HCV*, ou da sua versão semi-automatizado *Cobas Amplicor® v2.0 HCV®* (Roche Molecular Systems, Califórnia) é de 50 UI/ml, enquanto que a do teste baseado na *TMA Versant® HCV RNA Qualitative Assay* (Siemens, Nova York) é de 10 UI/mL. As técnicas baseadas em PCR em tempo real, além de detectarem qualitativamente o RNA viral, também são capazes de quantificar o mesmo. O teste *Cobas Ampliprep®-Cobas Taqman (CAP-CTM) HCV Test* (Roche Molecular Systems) tem limite de detecção de 15 UI/mL e o teste *Abbott RealTime™ VHC Assay* (Abbott Diagnostic) têm sensibilidades que podem variar de 12 a 30 UI/mL, de acordo com a quantidade de sangue testada, quando usados unicamente como teste qualitativo (SCOTT & GRETCH, 2007).

1.7.3. Testes Moleculares Quantitativos

O teste que determina o número de cópias virais circulantes é conhecido como carga viral ou teste molecular quantitativo. A carga viral de HCV é necessária na fase de pré-tratamento e no monitoramento do tratamento com interferon-peguilado ou não, associado à ribavirina (PAWLOTSKY, 1999; ALBETI & BEVENGNÙ, 2003).

Os níveis de RNA viral pré-tratamento foram descritos como determinantes do tempo de duração do mesmo. A concentração plasmática do vírus é medida em Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL) (NIH, 2002). Estudos têm demonstrado que pacientes com “baixa” carga viral (800.000 UI/mL) respondem de forma positiva à terapia, se comparados com pacientes com carga viral alta (EASL, 1999). A quantificação do RNA do HCV é utilizada, portanto, como ferramenta para o monitoramento da resposta ao tratamento. A diminuição da carga viral durante a fase inicial de infecção (duas a doze semanas) pode ser utilizada para prever a eficácia do tratamento em longo prazo e identificar precocemente a ausência de resposta (ALBETI & BEVENGNÙ, 2003).

Nos últimos anos foram desenvolvidos vários testes quantitativos comerciais. Entre estes se destacam os seguintes: RT-PCR competitivo, PCR em tempo real e bDNA (*branched-DNA*). Alguns ensaios padronizados estão disponíveis comercialmente. Três deles são baseados na PCR competitiva: *Amplicor HCV Monitor® Test, v2.0* e, sua versão semi-automatizada, *Cobas Amplicor HCV Monitor Test, v2.0* (Roche Molecular Systems), além do *LCX Quantitative HCV RNA Assay* (Abbott Laboratories). Suas faixas de detecção variam de 600 a 850.000.000 UI/ml (<http://molecular.roche.com/diagnostics/virology.html>).

Baseado na tecnologia bDNA encontra-se disponível no mercado o kit *Versant® HCV RNA 3,0 Assay* (Siemens) e dois testes baseados na PCR em tempo real, o *Cobas TaqMan HCV Test v2.0*, que pode ser acoplada com a extração automatizada, resultando no *Cobas Ampliprep/COBAS TaqMan HCV Test* (Roche Molecular Systems), com faixas de detecção que variam de 25 a 390.000.000 UI/ml. Baseado na tecnologia de PCR em tempo real, encontra-se comercialmente disponível o *Abbott RealTime™ HCV Assay* (Abbott Diagnostics), que usa o sistema Abbott m2000RT, e também pode ser acoplado com um processo automatizado na extração (*M2000 Real-Time PCR System*) (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2007). As abordagens mais promissoras estão na utilização de testes totalmente automatizados de PCR em tempo real (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2007).

1.7.4 Genotipagem

A identificação do genótipo do HCV constitui uma ferramenta fundamental para subsidiar a definição do plano terapêutico do paciente portador de hepatite C. O genótipo viral deverá ser determinado antes do início do tratamento (HADZIYANNIS *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que pacientes infectados com os genótipos 1 e 4 têm taxas de respostas virológicas sustentadas (RVS) menores que os pacientes infectados com os genótipos 2 e 3, quando tratados com interferon peguilado e ribavirina (MANNNS *et al.*, 2001; HADZIYANNIS *et al.*, 2004; ZEUZEM *et al.*, 2004).

A investigação do genótipo, por comparação entre as seqüências de DNA de HCV, tem importância também na investigação da transmissão nosocomial esporádica ou intrafamiliar (SIMMONDS, 2004; ANTAKI *et al.*, 2008; PLANCOULAIN *et al.*, 2008).

Diversos métodos são utilizados para determinar o genótipo do HCV. De forma geral, podemos dividir os mesmos em métodos sorológicos e moleculares. Os métodos sorológicos são baseados na detecção de anticorpos genótipo-específicos. A sua implementação é simples, sendo que vários kits comerciais estão disponíveis, mas apresentam limitações relacionadas a sensibilidade e a especificidade (ZEIN, 2000; ERENZOY, 2001).

Os métodos moleculares para genotipagem do HCV mais utilizados são: hibridização com sondas tipo-específicas em membranas de nitrocelulose (STUYVER *et al.*, 1993; STUYVER *et al.*, 1995), amplificação com iniciadores específicos (HOLLAND *et al.*, 1996; FURIONE *et al.*, 1999), determinação do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragments Length Polymorphism*) (MCOMISH *et al.*, 1999; ERENZOY, 2001; SILVA *et al.*, 2007) ou seqüenciamento direto de parte do genoma do HCV, este último, considerado teste “padrão ouro” no diagnóstico do HCV (BUKH *et al.*, 1995; SIMMONDS, 1995).

O método de referência para determinação do genótipo do HCV é o seqüenciamento de DNA, onde as regiões alvo são, preferencialmente, as regiões NS5B ou E1 do genoma HCV (SIMMONDS, 1999; SIMMONDS *et al.*, 2005).

Alguns kits comerciais de genotipagem do HCV estão disponíveis no mercado (SCOT & GRETCH, 2007). Dentre eles, alguns utilizam a análise direta da seqüência 5'-NCR (*Trugene® 5'NC HCV Genotyping Kit, Bayer HealthCare*) ou hibridização reversa com sondas específicas para cada genótipo, localizadas também na região 5'-NCR (*INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, Bélgica*; ou *Versant® HCV Genotyping Assay*) (STUYVER *et al.*, 1993; STUYVER *et al.*, 1996; ZHENG *et al.*, 2003).

A determinação errada do genótipo, utilizando técnicas de hibridização reversa, é rara, no entanto, o mesmo não acontece quando se trata de subtipagem. Em 10% a 25% dos casos, os subtipos podem ser mal

identificados. Estes erros não têm conseqüências clínicas, uma vez que somente o genótipo viral é levado em consideração na escolha terapêutica (SMITH *et al.*, 1995; ZHENYU & WECK, 2001).

1.8 Tratamento

Internacionalmente, o padrão de tratamento para pacientes cronicamente infectados com HCV baseia-se no uso do interferon-peguilado (INF-PEG) em combinação com a ribavirina (RBV). Como já citado anteriormente, o genótipo viral deverá ser sistematicamente determinado antes do início do tratamento, uma vez que o mesmo determina o tipo de interferon a ser usado, a dose de ribavirina, a duração do tratamento, além de predizer as chances de resposta terapêutica (HADZIYANNIS *et al.*, 2004).

Em pacientes infectados com os genótipos 1, 4, 5 ou 6, o tratamento idealmente estabelecido é aquele que emprega INF-PEG, juntamente com ribavirina (dose 1 a 1,2 g/dia), por um período de 48 semanas. Em pacientes infectados com genótipo 2 ou 3 é preconizado INF-PEG, juntamente com 0,8 g/dia de RBV, por 24 semanas (NIH, 2002; AASLD, 2004). Em pacientes infectados com o genótipo 1, é de suma importância a avaliação da resposta virológica precoce (RVP) na décima segunda semana de tratamento. Nos pacientes em que não houver negatização do RNA do HCV ou queda de 2 log na carga viral em comparação com a carga viral pré-tratamento, o tratamento deve ser interrompido. É imprescindível, para fins de comparação da queda da carga viral, que os testes ao longo do tratamento sejam realizados com a mesma metodologia. Para aqueles pacientes em que houve queda da carga viral, mas não houve negatização do RNA viral, sugere-se a determinação qualitativa do RNA na 24^a semana de tratamento e se, ainda positiva, o tratamento deve ser interrompido (NIH, 2002; AASLD, 2004).

Ao final do tratamento, os pacientes são classificados como respondedores, se o RNA viral não for detectado por RT-PCR, ou como não respondedores, se o RT-PCR for positivo para a presença do RNA viral. A

resposta virológica é avaliada novamente após seis meses e uma resposta virológica sustentada (RVS) é definida pela ausência do RNA do HCV no soro ou plasma. Essa avaliação é realizada através de um ensaio com limite de detecção inferior a 50 UI /mL, 24 semanas após o término do tratamento (NIH, 2002; AASLD, 2004). Com os esquemas terapêuticos atuais, é possível alcançar taxas de RVS que variam de 40 a 55% entre os pacientes infectados com genótipo 1, e de 75 a 80% em pacientes infectados com genótipo 2 ou 3 (SHIFFMAN, 2007).

Em junho de 2000 foi publicado um protocolo nacional, regulamentando o tratamento da hepatite C crônica no Brasil e garantindo à população o direito a esse tratamento. O Ministério da Saúde do Brasil vem distribuindo uma combinação de medicamentos através das Secretarias Estaduais de Saúde (SES). Atualmente, os exames moleculares de detecção e genotipagem do HCV são exigidos pelas SES para o fornecimento gratuito desses medicamentos (BRASIL, 2000).

Em setembro de 2007, numa tentativa de adequação aos protocolos clínicos internacionais de tratamento da hepatite C, a Secretaria de Vigilância em Saúde apresentou o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C” (BRASIL, 2007). Segundo o protocolo citado, somente pacientes com teste de detecção molecular positivo para a presença do HCV, biópsia hepática, onde tenha sido evidenciada atividade necro-inflamatória moderada a intensa (maior ou igual a A2 pela classificação Metavir) e presença de fibrose moderada a intensa (maior ou igual a F2 pelas classificações Metavir ou Sociedade Brasileira de Patologia), devem ser tratados. Fundamentalmente, esse protocolo só se difere dos preconizados internacionalmente, no que diz respeito ao tratamento de pacientes infectados com os genótipos 2 e 3. O mesmo indica interferon convencional, enquanto que os consensos internacionais indicam o tratamento com interferon-peguilado.

Diversos estudos têm sido conduzidos utilizando novos medicamentos, a fim de se obter melhores respostas pós-tratamento. Dentre eles, os inibidores de proteases têm se destacado por seus resultados promissores (AASLD, 2008).

1.9 Hepatite C Oculta

O tecido hepático é o maior sítio de replicação viral no organismo. Pelo fato da hepatite C ser uma doença sistêmica, outros locais podem ser infectados e tornam-se sítios de replicação viral externos ao fígado. Como locais extra-hepáticos de replicação viral foram propostos: linfócitos, cérebro, líquido, pâncreas, tireóide, adrenal, medula óssea e o baço.

A RVS é definida pela ausência de viremia 24 semanas após o término do tratamento. No entanto, estudos recentes têm relatado a persistente detecção do RNA viral no fígado e/ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) em pacientes até então considerados clinicamente "curados" (CASTILLO *et al.*, 2006; CAVALHEIRO *et al.*, 2007; MAYLIN *et al.*, 2008). Tal situação é denominada infecção oculta pelo vírus da hepatite C (CASTILLO *et al.*, 2004).

BALAN *et al.* (2008) investigaram a persistência de RNA viral no soro e em PBMCs de 25 pacientes com RVS, após tratamento com PEG-INF e RBV, 56 meses após o término da terapia. O RNA viral foi detectado em culturas de células mononucleares de sangue periférico de cinco pacientes (20%). Nessas amostras de soro não foi detectado o RNA viral. Sendo assim, os autores concluem que a relevância clínica deste achado não é claro e que estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar tal suspeita. Contudo, é possível que a persistência viral e, especificamente, a presença RNA do HCV em PBMCs possa levar à reativação em circunstâncias especiais, tais como a imunossupressão (LEE *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

O HCV, geralmente, causa infecções crônicas clinicamente silenciosas. A maioria dos pacientes infectados desconhece seu estado de portador, constituindo um elo importante na cadeia de transmissão desse vírus. Sendo assim, diagnosticar e tratar tal doença são medidas fundamentais para ações de planejamento na área epidemiológica a nível governamental.

O diagnóstico laboratorial do HCV pode ser realizado através de análises sorológicas e técnicas de biologia molecular. O diagnóstico molecular é utilizado para a confirmação diagnóstica, escolha da terapia antiviral e monitoramento do tratamento. No entanto, limitações como o custo elevado, complexidade e falta de validação em nosso país dos testes comerciais disponíveis tem impedido a ampla utilização dos mesmos no país. Em razão das dificuldades citadas, novas técnicas de biologia molecular têm sido propostas como alternativa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Face às limitações relacionadas ao custo elevado, complexidade e falta de validação dos testes moleculares disponíveis no mercado, este trabalho teve como objetivo o aprimoramento de uma metodologia *in house* para extração e purificação do RNA de HCV, bem como sua detecção qualitativa e genotipagem, utilizando hibridização em microplacas do produto de PCR biotinizado, seguido de detecção colorimétrica.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Definir as regiões alvo para construção das sondas posteriormente usadas no método colorimétrico de hibridização reversa (MCHR);
- ✓ Aprimorar a metodologia *in house* de extração e de purificação do RNA do HCV;
- ✓ Desenvolver um método de hibridização reversa para detecção colorimétrica dos produtos amplificados obtidos através da RT-PCR para detecção qualitativa e genotipagem do HCV;
- ✓ Avaliar a eficiência do método colorimétrico de detecção qualitativa do HCV, comparando os resultados do mesmo com os obtidos com os métodos de referência.
- ✓ Avaliar a eficiência do método colorimétrico de genotipagem do HCV, comparando os resultados do mesmo com os obtidos com o método de referência.

4. MANUSCRITO

***Colorimetric microwell plate reverse hybridization assay for
detection and genotyping of hepatitis C virus***

(Redigido nos moldes do periódico Journal of Virological Methods)

Detection and Genotyping of Hepatitis C Virus by a RT- PCR Colorimetric Microwell Plate Hybridization Assay

Cintia Costi ^{1,2}; Claudia Maria Dornelles da Silva ^{1,3}; Nicole Nascimento Da Fré ¹; Tarciana Grandi ^{1,2}; Fernanda Irma Hamester ¹; Arnaldo Zaha ²; Maria Lúcia Rosa Rossetti ^{1,2,3} *

¹ Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação Diagnóstico Genético e Molecular; Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

*Corresponding author: Maria Lúcia Rosa Rossetti, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS; Av. Ipiranga 5400, 3º andar, CEP 90610-000 - Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: 55 51 3352 0336; E-mail: mrossett@terra.com.br

Abstract

This study aimed at the improvement of an in house method for extraction and purification of RNA from HCV as well as its detection and genotyping, using hybridization of the amplified product in microplates, followed by colorimetric detection. The region of HCV 5'-NCR was chosen for the amplification. To evaluate the efficiency of colorimetric microwell hybridization assay (CMHA), the results obtained were compared with the reference

methods. Among the 85 plasma samples analyzed, the sensitivity and specificity of CMHA for viral RNA detection were 100% (95% CI, 92.75% - 100%) and 97.2% (95% CI, 85.48 % -100%), respectively, when compared with Cobas Amplicor HCV assay v2.0. The positive predictive and negative predictive values were 98% (95% CI, 89.36% - 99.95%) and 100% (95% CI, 90.01% -100%), respectively. The calculated Kappa was 0.976 ($p < 0001$), showing high correlation between the two methodologies. Similarly, it was observed 97.22% (35/36) of agreement between the DNA sequencing data and MCHR for HCV genotyping. The Kappa values was 0.976 ($p < 0001$), showing high correlation between the two methodologies. The proposed methodology showed good sensitivity and specificity, with a high degree of concordance between the reference methodologies for both detection and for genotyping of HCV.

1. Introduction

In recent years, molecular biology has probably had its greatest clinical impact with regard to liver disease on the diagnosis of viral hepatitis C. In 1989, investigators at Chiron Corporation identified a RNA virus that was responsible for most cases of non-A, non-B hepatitis, the Hepatitis C virus (HCV) (Choo *et al.*, 1989). The identification, cloning and sequencing of this virus has lead to a new era in diagnosis of chronic viral hepatitis. Since then, HCV infection has reached epidemic proportions and become a major global health issue, with mote than 170 million infected individuals worldwide (WHO, 1999).

Diagnostic tests for HCV can be divided into serological assays, which detect antibody to HCV and molecular assays, which detect and/or quantify HCV RNA genomes (Chevaliez & Pawlotsky, 2007; Scott & Gretch, 2007). The main screening assay for detecting antibodies to HCV is the enzyme immunoassay (EIA). EIA testing is highly sensitive, but is associated with a false positive rate if used in a low prevalence population (Gretch *et al.*, 1992; Halfon *et al.*, 1992; Hyams *et al.*, 2001; Pawlotsky *et al.*, 1996; Zein *et al.*,

1997). False negatives are rare and are confined to immunosuppressed host, including patients on chronic haemodialysis (Lakshmi and Reddy, 2007; Pawlotsky, 1999; Pawlotsky, 2002).

Because of the limitations of serological assays, direct detection of HCV RNA by molecular assays has become an essential tool in the diagnosis of hepatitis C infection and in the selection of patients for antiviral therapy. The advantages of direct detection of RNA HCV include the early diagnosis of acute infection, the diagnosis of infection in patients unable to mount an antibody response (immunosuppressed patient, immunocompromised patient and chronically ill patient such as those with chronic renal disease) (Lakshmi and Reddy, 2007; Pawlotsky, 1999). Furthermore, this test is the only one that confirms an active infection by HCV.

Together with quantitative tests, genotypes tests are valuable tools in the management of patients infected with HCV. Genotype tests are important clinically because they predict most accurately the chance of antiviral response, dictate the duration of therapy, and determine the dosage of ribavirin. Genotype is the strongest predictor of response to interferon and ribavirin. Patients who had genotype 2 or 3 were 3 to 6 times more likely to achieve sustained virological response (Fried *et al.*, 2002; Manns *et al.*, 2001).

Several methods for HCV genotyping exist, but the “gold standard” is direct sequencing of amplified PCR products followed by phylogenetic analysis from clinical material (Bukh *et al.*, 1995; Simmonds, 1995). Some HCV detection and genotyping kits are commercially available worldwide, however, most of these techniques are time consuming, labor-intensive, expensive, confined to research or reference laboratories and not feasible for routine genotyping (Nolte *et al.*, 2003; White *et al.*, 2000).

Simple, faster and less expensive methods are required in a routine diagnostic virology laboratory, particularly in developing countries where hepatitis C is a serious public health problem.

2. Objective

In the present study we describe the improvement of a method that uses silica extraction of RNA HCV, according to the protocol described by Boom *et al.* (1990) with modifications and a method for its detection and genotyping using a RT-PCR colorimetric microwell plate hybridization assay (CMHA).

To evaluate the efficiency of detection method, the results obtained were compared with those obtained by commercial Cobas Amplicor HCV Assay 2.0 (Roche Molecular Systems, California) and with a RNA extraction commercial kit *NucleoSpin® RNA Virus* (Macherrey-Nagel, Germany) followed by RT-PCR. To evaluate the efficiency of this genotyping assay, the results obtained were compared with those obtained by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and DNA sequence analysis.

3. Material and Methods

3.1 Samples

The 86 plasma specimens analyzed in this study were obtained from patients tested positive for HCV antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clinical specimens were obtained from the sample collection of the Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), collected in the period 2001-2002. This project was approved by the Ethical Committee of Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

In an effort to minimize sample degradation from multiple-thaw cycles, all samples were separated from whole blood within 5 hours of collection, aliquot and stored at -70°C prior testing.

3.2 Detection of HCV RNA with the Cobas Amplikor HCV Assay 2.0

The qualitative assay was carried out according to the manufacture's instructions.

3.3 RNA extraction commercial kit NucleoSpin® RNA Virus and detection by in house one-step RT- PCR

HCV RNA was extracted from 150 µL of plasm with Nucleospin RNA virus Kit (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacture's instructions. After extraction, 40 U *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, CA) was added. HCV RNA was reverse transcribed to cDNA and amplified by a single tube RT-PCR, using Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, CA). Primers HCV1 and HCV2 were used in the reactions to amplify a sequence of 259 bp within the conserved 5'-NCR of HCV genome as described previously (Krug *et al.*, 1996). The high degree of conservation of this region has made it target of choice for PCR based detection assay (Bukh *et al.*, 1992)

RT-PCR was performed using 10 µL isolated RNA, 30 pmol primer HCV1 and HCV2 in a final volume of 50 µL. After RT at 45 °C for 30 min, the sample was submitted to PCR for 55 cycles consisting of 94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, 72 °C for 30 sec, followed by a final elongation of 5 min at 72 °C. Previously characterized plasm containing or not HCV RNA was used in each experiment as positive and negative controls, respectively. RT-PCR products were detected by ethidium bromide staining under UV light after electrophoresis on 1.5 % agarose gel.

3.4 Genotyping methods

The HCV positive samples were genotyped by RFLP (McOmish *et al.*, 1994; Krug *et al.*, 1996) and DNA sequencing, according to SILVA *et al.* (2007) with some modifications. Briefly, PCR products were submitted to cycle sequencing reactions, using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA). The reaction mixture contained 2 μ L BigDye, 3.4 pmol primer, 8 μ L 5X Sequencing Buffer, 200 ng PCR products in a final volume of 20 μ L. After an extension step at 96 °C for 1 min, PCR was 40 cycles consisting of 96 °C for 15 sec, 55 °C for 15 sec, 60 °C for 4 min. The PCR products were directly sequenced using ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA).

3.5 Silica extraction of RNA HCV, detection and genotyping using RT-PCR colorimetric microwell plate hybridization assay (CMHA).

The HCV RNA was extracted by a modified version of the technique described by Boom *et al.* (1990). Briefly, for each sample, 200 μ L of plasm were added to pre-warmed tube containing 900 μ L of a Lysis Buffer (8M guanidinium isothiocyanate, 0.1 M Tris HCl [pH 6.4], 0.2 M de EDTA [pH 8.0] and Triton X-100). The content was mixed by vortexing for 30 seconds and 2.5 μ L of silica suspension were added to each tube and again vortexed, and then allowed to incubate at room temperature for 10 min. After 1 min centrifugation at 14.000 rpm, the supernatant was carefully removed from each tube. The silica pellets were washed twice with a buffer containing 8 M guanidinium isothiocyanate, 0.1 M Tris HCl [pH 6.4], twice with 1 mL 70% ethanol (Merck, Germany), and, finally, once with acetone (Merck, Germany). Following the final wash, the tubes were placed without caps in a heating block and incubated at 56°C for 2 min to dry the silica pellet. To elute the RNA from the silica pellets, 50 μ L of DEPC-treated water and 40 U *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, California) were added to each tube. The silica pellets were resuspended by vortexing the tubes for 15 seconds and the tubes were then incubated for 10 min at 56°C. After 3 min centrifugation at 13.000 rpm, 47 μ L the supernatant was collected in other tube and stored at -70 °C for further

experimentation.

HCV RNA was reverse transcribed to cDNA and amplified by a single tube, RT-PCR using Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, CA). The RT-PCR was performed with biotinylated primers HCV2ABio (Bio -TCG CAA GC(AG) CCC TAT CAG GCA G) and HCV2SBio (Bio – GGA ACT (AT)CT GTC TTC ACG C(AG)G A) derived from HCV1 and HCV2 described previously. Sequence degeneracy was included to allow annealing to different HCV genotypes. RT-PCR was performed using 10 µL isolated RNA, 15 pmol primer HCV2ABio and HCV2SBio in a final volume of 50 µL. After RT at 45 °C for 30 min, sample was submitted to PCR for 55 cycles consisting of 94 °C for 30 sec, 64 °C for 30 sec, 72 °C for 30 sec, followed by a final elongation of 5 min at 72 °C.

The detection and genotyping of amplified fragments was performed using microwell plates (Nunc Immobilizer™ Amino Surface, Nunc, Denmark). Four probes aminated were designed from the know 5' NCR sequences of HCV isolates (Silva *et al.*, 2007; Stuyver *et al.*, 1993; Stuyver *et al.*, 1996) using the Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems). One probe was used for detection and three probes were used for HCV genotyping (**Table 1**). Each 0.1 µg of the DNAs probe (SG, SG2, SG3) was dissolved in 100 µL immobilization buffer (100 mM of Na₂CO₃ pH 9.6), except that the G1 probe was added 0.2 µg per well, and then dispensed into a micro-titer well, sealed with specific adhesive and incubated overnight at 2-8°C.

The wells were aspirated and washed three times with a PBST solution (Nunc Immobilizer™ Amino Instruction Protocol, 2005). The amplified material was boiled to denature the DNA product and the tubes were chilled on ice. To each well, 100 µL of hybridization buffer (SSC 5X, 0.5% BSA, 0.1% Tween 20) and 9.5 µL of the amplified product were added and the plate was incubated at 50°C for 45 min. The wells were washed three times with SSC 0.5X and 0.1% Tween 20, soaked for 15 min at 50°C with a pre-heated solution, and washed three times again with the same solution. Then, 100 µl of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase were added and incubated for 30 min at 37°C. The wells were washed three times with Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM and 0.1% Tween 20, soaked for 5 min at room temperature and washed three

times again with the same solution. Then, 100 μL of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) were added. After 15 min at room temperature, 100 μL of a 0.1 M H_2SO_4 solution were used to stop the color development. The results were read in an ELISA reader at 450 nm with a 620 nm re-filter (Nunc Tech Note, 1999a, Nunc Tech Note, 1999b). The amplification negative control was the white used for results calculation.

A standard panel of plasma samples (OptiQuant HCV RNA; AcroMetrix, CA) containing different concentrations of HCV RNA genotype 1b was used to evaluate the detection limit of the CMHA.

Table 1. Probes used in CMHA

Probe Name	Sequence	Use
SG	5'- Amine-TTTTTTTTTTGGGAGAGCCATAGTGGTC -3'	HCV detection
SG1	5'- Amine-TTTTTTTTTTAATTGCCAGGACGACC -3'	HCV genotype 1 specific
SG2	5'- Amine-TTTTTTTTTTCGTTGGGTTGCGAAA -3'	HCV genotype 2 specific
SG3	5'- Amine-TTTTTTTTTTGATCACTAGCCGAGTAGTTGG-3'	HCV genotype 3 specific

3.6 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 12.0 statistical program (SPSS Ins. Chicago, IL, USA). Agreement between the colorimetric microwell plate hybridization assay (CMHA) and gold standard for detection and genotyping was evaluated using *kappa* score. *P*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

4. Results

To evaluate the efficiency of a CMHA, the results obtained were compared with the reference methods.

The values of cut-off and gray zone for the detection probes, genotype 1, 2 and 3 were based on RT-PCR negative samples and are presented in table 2.

Table 2. Values of cut-off and gray zone for the probes used in CMHA.

Probe name	Cut-off (nm)	Gray zone (nm)
SG	0.069	0.062 – 0.076
SG1	0.044	0.040 – 0.048
SG2	0.044	0.040 – 0.048
SG3	0.242	0.220 – 0.270

We measured the analytical sensitivity of the CMHA with the WHO International Standard and the detection limit was 50 IU/ml HCV RNA.

Of the 86 samples included in this study, 49 of them were considered negative for the presence of viral RNA, 36 were positive and 1 had the reading in gray zone using Cobas Amplicor HCV Assay 2.0. The positive samples were genotyped by sequencing and by RFLP.

Of the 49 samples testing negative for the CMHA, all results were confirmed by commercial Cobas Amplicor HCV 2.0 Assay and the method of extraction by columns *NucleoSpin® RNA Virus*. Of the 36 positive for Cobas Amplicor HCV 2.0 Assay, 35 were confirmed by the results of our CMHA and the method of extraction by columns. The sample result to the conflict, negative for the CMHA was also negative for the test using columns. A high concordance of 97.22% (35/36) was found when comparing Cobas Amplicor with CMHA. The sample with an undetermined outcome (gray zone) was positive for the presence of viral RNA by CMHA, but negative for the extraction method by columns (**Table 3**).

After the analysis, the sensitivity and specificity of CMHA compared with Cobas Amplicor Assay as a gold standard were 97.2% and 100%, respectively and the positive predictive value and negative predictive were 100% and 98%,

respectively. The Kappa was 0.976, considered a high degree of agreement and $p < 0.001$.

Table 3. Comparison of HCV detection results generated by column extraction, Cobas Amplicor and CMHA.

	Columns		CMHA	
	positive	negative	positive	negative
Cobas Amplicor POSITIVE (36)	35	1	35	1
Cobas Amplicor NEGATIVE (49)	0	49	0	49

The sample with an undetermined outcome (gray zone) was positive for the presence of viral RNA by CMHA, but negative for the extraction method by columns.

The 36 positive samples were genotyped by DNA sequencing, CMHA and RFLP. Thirty-four samples have total agreement between the three techniques. Only one sample, was identified as genotype 1 by sequencing and RFLP, and had its result in the gray zone for genotype 1 by CMHA. It should be assumed as a problem of sensitivity of the test, possibly due to low viral load of the sample in question. One sample, identified to be of genotype 3 by RFLP, but of genotype 2 by the test CMHA and DNA sequencing (**Table 4**).

Again, a high concordance of 97.22% (35/36) was found when comparing DNA sequence, with CMHA. After the analysis, the Kappa was 0.976, considered a high degree of agreement and $p < 0.001$.

Table 4. Comparison of data of CMHA and RFLP with sequence results

DNA sequencing	CMHA			RFLP		
	Gen 1	Gen 2	Gen 3	Gen 1	Gen 2	Gen 3
Gen 1 (11)	10*			11		
Gen 2 (6)		6			5	
Gen 3 (19)			19			20

* one sample, identified to be of genotype 1 by sequencing and RFLP, but had its result in the gray zone for genotype 1 by CMHA.

5. Discussion

Around 170 millions persons in the world are thought to be infected with HCV (WHO, 1999), being recognized as a major public health problem worldwide, responsible for chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Lauer and Walker, 2001; Pujol *et al.*, 2005). From a public health perspective, the implementation of molecular tests as an integral part of the diagnostic and therapeutic management of infections with HCV should be imperative. Direct detection of viral RNA by molecular assays is the only one that confirms the active infection for the HCV, while genotype tests are important clinically because they predict most accurately the chance of antiviral response, dictating the duration of therapy, and determining the dosage of ribavirin.

It is recognized that the cost of diagnostic reagents represents a barrier to the implementation of international recommendations for molecular testing in many developing world regions (WHO, 1999). Due to limited financial resources and lack of quality control regulations, it is difficult for most clinical laboratories in these areas to implement standardized in-house or commercial molecular tests. The system for molecular testing provided by CMHA offers attractive

advantages for clinical laboratories, because does not require expensive genetic analyzer for genotyping.

We measured the analytical sensitivity of the CMHA with the WHO International Standard and the detection limit was 50 IU/ml HCV RNA shown. The analytical sensitivity of our testing laboratory is in line with the international recommendations (NHI Consensus Statement, 2002).

For this study, we selected samples containing HCV genotypes that reflected the prevalence in Rio Grande do Sul, Southern most State of Brazil, where genotypes 1 and 3 are most commonly found (Krug *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2007).

Our preliminary data shows that CMHA is able to detect HCV genotypes. Overall, the results showed an excellent concordance with the DNA sequencing data. The detection and genotyping with CMHA were very sensitive and specific.

The methodology developed in this study detected colors in the liquid phase, allowing the reading of the results in a spectrophotometer, not depending on the visual interpretation of data, minimizing the possibility of error in interpretation of results. The similarity of this phase of the methodology with the ELISA technique, commonly used in laboratories for medical tests, is a factor that facilitates the application of this technique in laboratories for routine, because it does not require expensive equipment as a DNA sequencer.

In conclusion, we have show that results are promising and highlight its potential to be used in the detection and genotyping of HCV. However, we consider that a larger number of clinical specimens should be analyzed.

6. References

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Van Dillen, P.M.E.W., Van Der Noorda, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.

Bukh, J., Purcell, R.H., Miller, R.H., 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region hepatitis C virus. *Proceed. Nat. Acad. Scienc. USA* 89, 4942-4946.

Bukh, J., Miller, R., Purcell, R., 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* 15, 41-63.

Chevaliez, S., Pawlotsky, J.M., 2007. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 13(17), 2461-2466.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., 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.

Follet, E.A., Dow, B.C., McOmish, F., Smith, C., Marinos, G., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J., 1991. HCV confirmatory testing of blood donors [letter]. *Lancet* 338(8773), 1024.

Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F.L., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J., 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347, 975-982.

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

Halfon, P., Rousseau, S., Tamalet, C., Antoni, M., Gerolami, V., Levy, M., Bourliere, M., Planells, R., Cartouzou, G., 1992. Indeterminate second-

generation hepatitis C recombinant immunoblot test: detection of hepatitis C virus infection by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 166(2), 449.

Hyams, K.C., Riddle, J., Rubertone, M., Trump, D., Alter, M.J., Cruess, D.F., Han, X., Nainam, O.V., Seeff, L.B., Mazzuchi, J.F., Bailey, S., 2001. Prevalence and incidence of hepatitis C virus infection in the US military: a seroepidemiologic survey of 21000 troops. *American Journal of Epidemiology* 153, 764-770.

Krug, L.P., Lunge, V.R., Ikuta, N., Fonseca, A.S.K., Cheinquer, H., Ozaki, L.S., Barros, S.G.S., 1996. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res* 29, 1629-1632.

Lakshmi, V., Reddy, A.K., Dakshinamurty, K.V., 2007. Evaluation of commercially available third-generation anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assay in patients on haemodialysis. *Indian Journal of Medical Microbiology* 25:140-142.

Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K., 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.

McOmish, F., Yap, L., Dow, B.C., Follett, E.A.C., Seed, C., Keller, A.J., Cobain, T.J., Krusius, T., Kolho, E., Naukkarinen, R., Lin, C., Lai, C., Leong, S., Medgyesi, G.A., Hejjas, M., Kiyokawa, H., Fukada, K., Cuyper, T., Saeed, A.A., Al-Rasheed, A.M., Lin, M., Simmonds, P., 1994. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J. Clin. Microbiol.* 32(4), 884-92.

NIH - National Institute of Health, Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C 2002. *Hepatology* 36 (Suppl. I), S3-20.

Nolte, F.S., Green, A.M., Fiebelkorn, K.R., Caliendo, A.M., Sturchio, C., Grunwald, A., Healy, M., 2003. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1558-1564.

Nunc, 1999a. NucleoLink Procedure for PCR-ELISA, Tech Note, Vol. 5 No. 37.

Nunc, 1999b. Versatile PCR Assays Base on Hybridization in Microwell Plates, Tech Note, Vol. 5, No. 33.

Nunc, 2005. Immobilizer Amino Instruction Protocol, No. 77102 ver 1.1 – YNI 03.05

Pawlotsky, J.M., Bastie, A., Pellet, C., Remire, J., Darthuy, F., Wolfe, L., Sayada, C., Duval, J., Dhumeaux, D., 1996. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 80-83.

Pawlotsky, J.M., 1999. Diagnostic test for hepatitis C. *Journal of Hepatology* 31(Suppl 1), 71-79.

Pawlotsky, J.M., 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36, S65-73.

Scotch, J.D., Gretch, D.R., 2007. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. *The Journal of the American Medical Association*, 297, 724-732.

Silva, C.M.D., Costi, C., Krug, L.P., Ramos, A.B., Grandi, T., Gandolfi, V.L., Menezes, M.E., Ocampos, M., Niel, C., Rossetti, M.L.R., 2007. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 867-870.

Simmonds, P., 1995. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21, 570–583.

Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A., Duhamel, M., Vanderborght, B., Van Heuverswyn, H., Maertens, G., 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 74, 1093-1102.

Stuyver, L., Wyseur, A., van Arnhem, W., Hernandez, F., Maertens, G., 1996. Second generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2259-2266.

White, P., Zhai, A., Carter, I., Zhao, Y., Rawlinson, W., 2000. Simplified hepatitis C virus genotyping by heteroduplex mobility analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38(2), 477-482.

WHO Consultation, 1999. Global surveillance and control of hepatitis C. *J. Viral. Hepat.* 6:35-47.

Zein, N.N., Germer, J.J., Wendt, N.K., Schimek, C.M., Thorvilson, J.N., Mitchell, P.S., Persing, D.H., 1997. Indeterminate results of the second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of high-level c22-3 reactivity and influence of HCV genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 311-312.

5. DISCUSSÃO

O HCV é um inimigo silencioso que atinge a população mundial, causando sérios problemas no fígado como: hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. Com todas essas conseqüências devastadoras a hepatite C é considerada a grande pandemia do novo milênio e tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública no mundo.

Como a maioria das pessoas infectadas pelo HCV desconhece o seu estado de portador e constitui um elo importante na cadeia de transmissão desse vírus, todas as medidas que visam diagnosticar e tratar a Hepatite C tornam-se fundamentais para evitar sua disseminação. No entanto, é reconhecido que o custo dos testes comerciais disponíveis para o diagnóstico molecular do HCV representa uma barreira para sua implementação em muitos países do mundo, particularmente em países considerados “em desenvolvimento” (WHO, 1999). Sendo assim, fica clara a necessidade de métodos mais simples, rápidos e menos dispendiosos para serem utilizados na rotina.

A primeira parte deste trabalho constituiu-se da investigação da prevalência dos genótipos do HCV no RS e SC (Silva *et al.*, 2007 – apêndice 1). Uma freqüência alta e incomum do genótipo 3 foi observada, corroborando com os dados da literatura (KRUG *et al.*, 1996). Dados de seqüenciamento de 68 isolados do RS foram utilizados para construção das sondas de DNA que, posteriormente, foram utilizadas no método colorimétrico de hibridização reversa proposto.

A segunda parte deste trabalho constituiu-se, fundamentalmente, do aprimoramento de um protocolo *in house* para extração e purificação de RNA do HCV, bem como sua detecção e genotipagem, utilizando hibridização do produto amplificado em micropalcos, seguido de detecção colorimétrica (COSTI *et al.*, 2008, manuscrito em preparação, em anexo).

Para a realização da RT-PCR, inicialmente, é necessário extrair o RNA viral presente nas amostras clínicas. A extração para obtenção de um RNA de boa qualidade é um passo crucial para o desenvolvimento de qualquer técnica molecular. Para isolamento e purificação dos ácidos nucléicos é necessário

separá-los dos outros constituintes celulares, pois esses podem atuar como inibidores das reações enzimáticas (VERHOFSTEDE *et al.*, 1996; ARNAL *et al.*, 1999). Também é fundamental, durante o processo de extração, manter a integridade do RNA, visto que as informações contidas na sua seqüência são essenciais (MCCLERNON *et al.*, 2007).

Vários kits de extração estão disponíveis no mercado, no entanto, limitações como custo elevado têm estimulado diversos grupos de pesquisa a desenvolverem metodologias *in house* para extração de ácidos nucleicos (CHEUNG *et al.*, 1994; HOEK *et al.*, 1995; SHAFER *et al.*, 1997; ROSS *et al.*, 2001). Neste estudo, optou-se, então, por uma extração realizada sem auxílio de kits comerciais, e sim com reagentes preparados no próprio laboratório. A metodologia de extração baseou-se no protocolo descrito por BOOM *et al.* (1990) com algumas modificações.

Esta metodologia baseia-se na propriedade do RNA ligar-se às partículas de sílica na presença de agentes caotrópicos, como o isotiocianato de guanidina. Além de ser uma metodologia rápida e simples, possui a vantagem de um baixo custo. Calcula-se um gasto aproximado em reagentes de R\$ 1,00 para cada amostra, enquanto que nas extrações que utilizam kits comerciais este custo é de, aproximadamente, R\$ 50,00 por amostra.

O RNA obtido foi submetido à técnica de *RT-PCR*. A transcrição reversa do RNA para formação do cDNA e a PCR ocorreram no mesmo tubo, caracterizando apenas uma etapa de manipulação (*one step RT-PCR*), possibilitando a minimização dos riscos de contaminação. Para esse procedimento foi utilizado o kit *SuperScript™ One-Step RT-PCR com Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, USA). Cabe citar, também, que com o uso de tal enzima foi possível um aumento da sensibilidade da técnica, pois a reação de amplificação se dá em 55 ciclos.

Os *primers* utilizados na RT-PCR amplificam parte da região 5' NCR do HCV. Essa região é alvo da maioria dos testes moleculares de detecção qualitativa do RNA do HCV, pois se caracteriza como a mais conservada do genoma viral (SIMMONDS *et al.*, 2005). Tal região também é de particular interesse para os testes de genotipagem, pois além de ser extremamente conservada, contém mutações raras específicas, internas às regiões utilizadas

para a construção dos *primers*, que caracterizam a maioria dos genótipos do HCV (BUKH *et al.*, 1992).

Os resultados da técnica de RT-PCR podem ser influenciados por fatores como a contaminação com produtos de DNA previamente obtidos ou perda de eficiência, tanto no processo de extração como na ação das enzimas responsáveis pela transcrição reversa e amplificação do DNA. Para evitar resultados inadequados, nosso estudo enfatizou inúmeros cuidados com relação aos processos de extração e amplificação do DNA. Para verificar as possíveis contaminações que poderiam ter ocorrido durante estes procedimentos, foram incluídos controles negativos de extração e amplificação, os quais foram processados com as amostras clínicas. E para verificar a eficiência dos procedimentos, foram incluídos controles positivos de extração e de amplificação.

O procedimento escolhido para a detecção do produto amplificado também influencia o resultado dos testes moleculares qualitativos. Os métodos de detecção mais utilizados nas metodologias *in house* envolvem a eletroforese em gel de agarose, utilizando brometo de etídio, ou visualização dos produtos amplificados através de sondas. Têm sido descritos métodos em que o produto amplificado é detectado através de sistemas, tais como cor, fluorescência, quimioluminescência (DOGLIO *et al.*, 1999; GUICHÓN *et al.*, 2004; GERMER *et al.*, 2005). A metodologia considerada como referência para genotipagem do HCV, como já citado anteriormente, baseia-se no seqüenciamento de parte do genoma viral, seguida da análise filogenética das seqüências (BUKH *et al.*, 1995; SIMMONDS, 1995). No entanto, tal método é laborioso, requer experiência dos técnicos e se torna oneroso pela necessidade de dispositivos adicionais como analisador genético (ERENSOY, 2001; ANDERSON *et al.*, 2003).

A metodologia para detecção e genotipagem do HCV desenvolvida neste estudo foi a detecção colorimétrica do produto amplificado em fase líquida. Esse tipo de metodologia permite que a leitura dos resultados seja feita em espectrofotômetro, não dependendo da interpretação visual do técnico de laboratório, o que minimiza a possibilidade de erro de interpretação de resultados. A semelhança desta fase da metodologia com a técnica de ELISA,

comumente utilizada em laboratórios de análises clínicas, é um fator que facilita a aplicação desta técnica em laboratórios de rotina, pois além de não exigir equipamentos específicos, também não necessita de pessoal especializado para sua execução.

O limite mínimo de detecção encontrado usando a MCHR no presente estudo foi de 50 UI/mL. O resultado encontrado está de acordo com o limite mínimo recomendado internacionalmente (NHI, 2002) e com os testes comerciais utilizados atualmente.

Para avaliar a metodologia proposta (MCHR) os resultados desta foram comparados com os obtidos utilizando as metodologias de referência para detecção qualitativa e genotipagem do HCV. Para detecção qualitativa, os resultados obtidos utilizando o teste comercial Cobas Amplicor e extração por colunas comerciais foram comparados com a MCHR.

Das 49 amostras negativas para o Cobas Amplicor, todas foram consideradas negativas para a MCHA e extração por colunas, mostrando uma concordância de 100% entre as técnicas utilizadas. Das 36 amostras consideradas positivas para a presença do RNA viral para o COBAS Amplicor, 35 foram positivas tanto para MCHR como para extração por colunas. A MCHR mostrou uma alta concordância (97,22%) com o Cobas Amplicor. Observou-se apenas um resultado discordante. Tal resultado, possivelmente, se deva à baixa carga viral ou a inibidores presentes na amostra. Uma amostra com resultado indeterminado para o Cobas Amplicor foi considerada negativa para a extração em colunas e positiva para a MCHR. A amostra foi novamente testada usando a MCHR e o resultado positivo se repetiu. Tal resultado se confirmou com o seqüenciamento, mostrando que a amostra era positiva para a presença do HCV genótipo 1 (dados não mostrados).

Entre as 85 amostras analisadas, a sensibilidade e especificidade da MCHR para detecção do RNA viral foram de 100% (95% IC; 92,75%-100%) e 97,2% (95% IC; 85,48%-100%), respectivamente, quando comparado com Cobas Amplicor. Da mesma forma os valores preditivo positivo e preditivo negativo foram de 98% (95% IC; 89,36%-99,95%) e 100% (95% IC; 90,01%-100%), respectivamente. O *Kappa* encontrado foi de 0,976 ($p < 0,001$) mostrando alto grau de concordância entre as duas metodologias.

As 36 amostras positivas foram genotipadas pela MCHR e os resultados obtidos foram comparados com o seqüenciamento de DNA - metodologia considerada padrão ouro - e com o RFLP. Trinta e quatro amostras apresentaram resultados concordantes entre as três metodologias. Apenas dois resultados discordantes foram observados. Uma amostra foi identificada como sendo genótipo 1 por seqüenciamento e RFLP, mas teve resultado na zona cinza para genótipo 1 por MCHR. Cabe salientar que a amostra em questão foi positiva para a sonda de detecção, mas indeterminada para a sonda genótipo 1, mostrando que existe uma diferença de sensibilidade entre essas sondas. Outra amostra foi identificada como genótipo 3 por RFLP, mas como genótipo 2 por MCHR, resultado esse confirmado pelo seqüenciamento. Dados da literatura citam que discrepâncias entre os resultados de genotipagem podem ser, em parte, devido à diminuição da eficácia quando se utilizam métodos indiretos, que podem detectar apenas mutações em locais específicos dentro do genoma viral, como RFLP e hibridização reversa (ZEIN, 2000; ERENZOY, 2001). Apesar de ser uma técnica indireta, a MCHR mostrou uma alta concordância (97,22%) com o seqüenciamento de DNA. O *Kappa* encontrado foi de 0,976 ($p < 0,001$) mostrando alto grau de concordância entre as duas metodologias.

A metodologia proposta apresentou bons resultados de sensibilidade e especificidade, com alto grau de concordância com as metodologias consideradas de referência, tanto para detecção, como para genotipagem do HCV. No entanto, um número maior de amostras deve ser testado a fim de se estabelecer o real potencial da metodologia proposta no diagnóstico da Hepatite C.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLD. American Association for the Study of Liver Diseases. Strader, D. B.; Wright, T.; Thomas, D. L. & Seeff, L. B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, 39(4): 1147-1171, 2004.

AASLD: 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases Abstracts LB16 and 243, 2008.

ALBETI, A. & BEVENGNÙ, L. Management of Hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 38: 104-108, 2003.

ALTER, H. J.; HOLLAND, P. V.; MORROW, A. G.; PURCELL, R. H.; FEINSTONE, S.M.; MORITSUGU, Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*, 2 (7940): 838-841, 1975.

ALTER, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; NAINAN, O.V.; MCQUILLAN, G.M.; GAO, F.; MOYER, L.A.; KASLOW, R.A.; MARGOLIS, H.S. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *The New England Journal of Medicine*, 341: 556-562, 1999.

ALTER, M.J.; KUHNERT, W.L.; FINELLI, L. Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of antibody to hepatitis C Virus. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 52:1-15, 2003.

ANDERSON, J.C.; SIMONETTI, J.; FISHER, D.G.; WILLIAMS, J.; YAMAMURA, Y.; RODRIGUEZ N.; SULLIVAN, D.G.; GRETCH, D.R.; MCMAHON, B.; WILLIAMS, K.J. Comparison of different HCV viral load and genotyping assays. *Journal of Clinical Virology*, 28(1): 27-37, 2003.

ANZOLA, M. & BURGOS, J. J. Hepatocelular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5:1-16, 2003.

ANTAKI, N.; HADDAD, M.; KEBBEWAR, K.; ABDELWAHAB, J.; HAMED, O.; AARAJ, R.; ALHAJ, N.; HAFFAR, S.; ASSIL, M.; FTAYEH, M.; ASSAAD, F.; DOGHMAN, D.; ALI, T.; NASSERELDDINE, M.; ALI, A.; ANTAKI, F. The Syrian Working Group for the Study of Viral Hepatitis. The unexpected discovery of a focus of hepatitis C virus genotype 5 in a Syrian province. *Epidemiology and Infection*, 17: 1-6, 2008.

ARNAL, C.; FERRÉ-AUBINEAU, V.; BESSE, B.; MIGNOTTE, B.; SCHWARTZBROD, L.; BILLAUDEL, S. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. *Journal of Virological Methods*, 77:17-26, 1999.

BASSIT, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; DA SILVA, L.C.; TAKEI, K.; VILLAÇA P.; DAVID-NETO, E.; CHAMONE, D.; SAEZ-ALQUEZAR, A. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: Rare subtype found. *Hepatology*, 29(3): 994-995, 1999.

BEZERRA, C.S.; LIMA, J.M.C.; VILAR, J.L.; MOREIRA, J.L.B.; FROTA, C.C. Viral Hepatitis C in a leading Brazilian hospital: epidemiological factors and genotyping. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4): 656-661, 2007.

BISCEGLIE, A.M.D. & BACON, B.R. The unmet challenges of Hepatitis C. *Scientific American*, 281(4): 80-85, 1999.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; VAN DILLEN, P. M.E.W.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 495-503, 1990.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria 639. Anexo I: Protocolo Clínico e diretrizes Terapêuticas da hepatite viral crônica tipo C. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 34, 2000.

BRASIL. Boletim Informativo N°4, Hepatites, setembro de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites Virais: o Brasil está atento, 2ª ed. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria 34. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p 60-63, 2007.

BUKH, J.; PURCELL, R. H. & MILLER, R. H. Sequence analysis of the 5' noncoding region hepatitis C virus. *Proceedings National. Academy of Sciences of United States of America*, 89: 4942-4946, 1992.

BUKH, J.; MILLER, R.; PURCELL, R. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in Liver Disease*, 15: 41-63, 1995.

BUSEK, S.U.; BABÁ, E.H.; TAVARES, F.H.A.; PIMENTA, L.; SALOMÃO, A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, G.C. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 775-778, 2002.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D. ; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.; BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(1): 41-49, 2005.

CASTILLO, I.; PARDO, M.; BATOLOMÉ, J.; ORTIZ-MOVILLA, N.; RODRIGUEZ-INIGO, E.; LUCAS, S.; SALAS, C.; JIMENEZ-HERFFERMAN, J.; PÉREZ-MOTA, A.; GRAUS, J.; LOPEZ-ALCOROCHO, J.; CARRENO, V. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *Journal of Infectious Diseases*, 189: 7-14, 2004.

CASTILLO, I.; RODRIGUEZ-INIGO, E.; LOPEZ-ALCOROCHO, J. M.; PARDO, M.; BARTOLOMÉ, J.; CARREÑO, V. Hepatitis C virus replicates in the liver of patients who have a sustained response to antiviral treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 1277-1283, 2006.

CAVALHEIRO, N.P.; FILGUEIRAS, T.C.; MELO, C.E.; MORIMITSU, S.R.; ARAÚJO, E.S.A; TENGAN, F.M.; BARONE, A.A. Detection of HCV by PCR in serum and PBMC of patients with hepatitis C after treatment. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11: 471-474, 2007.

CHEVALIEZ, S. & PAWLOTSKY, J.M. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 13(17): 2461-2466, 2007.

CHEUNG, R.C.; MATSUL, S.M.; GREENBERG, H.B. Rapid and Sensitive Method for Detection of Hepatitis C Virus RNA by Using Silica Particles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2593-2597, 1994.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902): 359-362, 1989.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P.J. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. *Proceedings National. Academy of Sciences of United States of America*, 88: 2451-2455, 1991.

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

DOGLIO, A.; LAFFONT, C.; CAROLI-BOSC, F.X.; ROCHET, P.; LEFEBVRE J. C. Second Generation of the Automated Cobas Amplicor HCV Assay Improves Sensitivity of Hepatitis C Virus RNA Detection and Yields Results That Are More Clinically Relevant. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5): 1567-1569, 1999.

DONAHUE, J.G.; MUÑOZ, A.; NESS, P.M.; BROWN, D.E. JR.; YAWN, D.H.; MCALLISTER, H.A. JR.; REITZ, B.A.; NELSON, K.E. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 327: 369-373, 1992.

DUARTE, E.A.; NOVELLA, I.S.; WEAVER, S.C.; DOMINGO, E.; WAIN, H.S.; CLARKE, D.K.; MOYA, A.; ELENA, F.S.; TORRE, J.C.; HOLLAND, J.J. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infectious Agents and Disease*, 3: 201-214, 1994.

EASL - European Association for Study of Liver - International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *Journal of Hepatology*, 30:956-61, 1999.

ERENSOY, S. Diagnosis oh hepatitis C infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology*, 21: 271-281, 2001.

FEINSTONE, S.M.; KAPIKIANA, A.Z.; PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V. Transfusion associated hepatitis not due to hepatitis A or B. *The New England Journal of Medicine*, 292: 767-770, 1975.

FRIEBE, P. & BARTENSCHLAGER, R. Genetic analysis of sequences in the 3'nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of Virology*, 76:5326-5338, 2002.

FONSECA, J.C. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. *Gastroenterologia Endoscopia Digestiva*, 18(1): 3-8, 1999.

FURIONE, M.; SIMONCINI, L.; GATTI, M. ; BALDANTI, F.; REVELLO, M.G.; GERNA, G. HCV genotyping by three methods: analysis of discordant results based on sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 13: 121-130, 1999.

GALLEGOS-OROZCO, J.F.; RAKELA, J.; ROSATI, M.J.; VARGAS, H.E.; BALAN, V. Persistence of Hepatitis C Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Sustained Viral Responders to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy. *Digestive Diseases and Sciences*, 53: 2564–2568, 2008.

GERMER, J.J. & ZEIN, N.N. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. *Mayo Clinic Proceedings*, 76(9): 911-920, 2001.

GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology*, 26(3): 43S-47S, 1997.

HADZIYANNIS, S.J.; SETTE, H. JR.; MORGAN, T.R.; BALAN, V.; DIAGO, M.; MARCELLIN, P.; RAMADORI, G.; BODENHEIMER, H. JR.; BERNSTEIN, D.; RIZZETTO, M.; ZEUZEM, S.; POCKROS, P.J.; LIN, A.; ACKRILL, A.M. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine*, 140: 346-355, 2004.

HOLLAND, P.V.; BARRERA, J.M.; ERCILLA, G.; YOSHIDA, C.F.; WANG, Y.; OLIM, G.A.; BETLACH, B.; KURAMOTO, K.; OKAMOTO, H. Genotyping

hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China and Macau by a simplified PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10): 2372-2378, 1996.

HYAMS, K.C.; RIDDLE, J.; RUBERTONE M.; TRUMP, D.; ALTER, M.J.; CRUESS D.F.; HAN, X., NAINAM, O.V.; SEEFF, L.B.; MAZZUCHI, J.F.; BAILEY, S. Prevalence and incidence of hepatitis C virus infection in the US military: a seroepidemiologic survey of 21000 troops. *American Journal of Epidemiology*, 153:764-70, 2001.

JEFFREY, J.G.; HARMSEN, W.S.; JAYAWANT, N.M.; MITCHELL, P.S.; YAO, J.D.C. Evaluation of the COBAS TaqMan HCV Test with Automated Sample Processing Using the MagNA Pure LC Instrument. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1): 293-298, 2005.

KOMURIAN-PRADEL, F.; PARANHOS-BACCALA, G.; SODOYER, M.; CHEVALLIER, P.; MANDRAND, B.; LOTTEAU, V.; ANDRE, P. Quantization of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *Journal of Virological Methods*, 95: 111-119, 2001.

KRUG, L.P.; LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; CHEINQUER, H.; OZAKI, L.S.; BARROS, S.G. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 1629-1632, 1996.

KUO, G.; CHOO, Q.L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L.; ALTER, M.J.; STEVENS, C. E.; TEGTMEIER, G.E.; BONINO, F.; COLOMBO, M.; LEE, W.S.; KUO, C.; BERGER, K.; SHUSTER, J.R.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 244(4902): 362-624, 1989.

LAKSHMI, V., REDDY, A.K.; DAKSHINAMURTY, K.V. Evaluation of commercially available third-generation anti-hepatitis C virus enzyme-linked

immunosorbent assay in patients on haemodialysis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25:140-142, 2007.

LEE, W.M.; POLSON, J.E.; CARNEY, D.S.; SAHIN, B.; GALEM, J.R. Reemergence of hepatitis C virus after 8.5 years in a patient with hypogammaglobulinemia: evidence for an occult viral reservoir. *The Journal of Infectious Diseases*, 192: 1088-1092, 2005.

LEVI, J.E.; TAKAOKA, D.T.; GARRINI, R.H.; FACHINI, R.M.; FOCACCIA, R.; SANTOS, E. B.; MITRE, H.P.; MENDONÇA, J. S.; CAVALHEIRO, N. P.; BARONE, A.A.; WENDEL, S. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2645-2647, 2002.

MARTELL, M.; GOMEZ, J.; ESTEBAN, J.I.; SAULEDA, S.; QUER, J.; CABOT, B.; ESTEBAN, R., GUARDIA, J. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantization of hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 327-332, 1999.

MAYLIN, S.; MARTINOT-PEIGNOUX, M.; MOUCARI, R.; BOYER, N.; RIPAULT, M.P.; CAZALS-HATEM, D.; GIUILY, N.; CASTELNAU, C.; CARDOSO, A.C.; ASSELAH, T.; FÉRAY, C.; NICOLAS-CHANOINE, M.H.; BEDOSSA, P., MARCELLIN, P. Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 135: 821-829, 2008.

MCOMISH, F.; YAP, P.L., DOW, B.C.; FOLLETT, E. A.C., SEED, C., KELLER, A. J., COBAIN, T.J., KRUSIUS, T., KOLHO, E., NAUKKARINEN, R., LIN, C., LAI, C., LEONG, S., MEDGYESI, G.A., HEJJAS, M., KIYOKAWA, H., FUKADA, K., CUYPERS, T., SAEED, A.A., AL-RASHEED, A.M., LIN, M., SIMMONDS, P. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4): 884-892, 1994.

MELLOR, J.; HOLMES, E.C.; JARVIS, L.M.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. The International HCV Collaborative Study Group. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology*, 76: 2493- 2507, 1995.

MENDES-CORREA, M.C.; CAVALHEIRO, N.P.; MELLO, C.; BARONE, A.A., GIANINI, R.J. Genotypic distribution of hepatitis C among hepatitis C and HIV co-infected patients in Brazil. *International Journal of STD & AIDS*, 19: 595-599, 2008.

MANNS, M.P., MCHUTCHISON, J.G., GORDON, S.C., RUSTGI, V.K.; SHIFFMAN, M.; REINDOLLAR, R.; GOODMAN, Z.D.; KOURY, K.; LING, M.; ALBRECHT, J.K. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C a randomized trial. *The Lancet*, 358: 958–965, 2001.

MCCLERNON, D.R.; RAMSEY, E.; CLAIR, M.S. Magnetic Silica Extraction for Low-Viremia Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 572-574, 2007.

MILLER, R.H. & PURCELL, R.H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus infection in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Disease*, 31: 224-226, 1990.

MUKAIDE, M.; TANAKA, Y.; KAKUDA, H.; FUJIWARA, K.; KURBANOV, F.; ORITO, E.; YOSHIOKA, K.; FUJISE, K.; HARADA, S.; KOZAKI, T.; TAKEMURA, K.; HIKIJI, K.; MIZOKAMI, M. New combination test for hepatitis C virus genotype and viral load determination using Amplicor GT HCV MONITOR test v2.0. *World Journal of Gastroenterology*, 11(4): 469-475, 2005.

NAINAN, O.V.; ALTER, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; GAO, F.X.; GUOLIANG, X.; MCQUILLAN, G.; MARGOLIS, H.S. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology*, 131(2): 478-484, 2006.

NGUYEN, M.H. & KEEFE, E.B. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(2): 97-101, 2005.

NIH. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology*, 36(1):S3-S20, 2002.

OGATA, N.; ALTER, H.J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 3392-3396, 1991.

OKAMOTO, H.; KURAI, K.; OKADA, S.I.; YAMAMOTO, K.; LIZUKA, H.; TANAKA, T.; FUKUDA, S.; TSUDA, F.; MISHIRO S. Full-length sequence of hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, 188: 331-341, 1992.

OLIVEIRA, G.C.; CARMO, R.A.; ROCHA, M.O.C.; SILVA, M.O.; LIMA, A.T.; GUIMARAES, C. & CORREA-OLIVEIRA, R. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the State of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion*, 39: 1194-1199, 1999.

PARANÁ, R.; VITVITSKI, L.; BERBY, F.; PORTUGAL, M.; COTRIM, H.P.; CAVALCANTE, A.; LYRA, L., TREPO, C. HCV Infection in Northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arquivos de Gastroenterologia*, 37(4): 213-216, 2000.

PASSOS, A.D.C. Doenças emergentes e hepatite C. *Cadernos de Saúde Pública*, 15: 226-227, 1999.

- PAWLOTSKY, J. M.; BASTIE, A.; PELLET, C. REMIRE J.; DARTHUY, F.; WOLFE, L.; SAYADA, J.D., DHUMEAUX, D. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 80-83, 1996.
- PAWLOTSKY, J.M.; LONJON,I.; HEZODE, C.; RAYNARD, B.; DARTHUY, F.; REMIRE, J.; SOUSSY, C.J., DHUMEAUX, D. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology*, 27: 1700-1702, 1998.
- PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic test for hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 31(1): 71-79, 1999.
- PAWLOTSKY, J.M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*, 122: 1554-1568, 2002.
- PLANCOULAIN, S.; MOHAMED, M.K.; ARAFA, N.; BAKR, I.; REKACEWICZ, C.; TRÉGOUËT D.A.; OBACH, D.; EL DALY, M.; THIERS, V.; FÉRAY, C.; ABDEL-HAMID, M.; ABEL, L.; FONTANET, A. Dissection of familial correlations in hepatitis C virus (HCV) seroprevalence suggests intrafamilial viral transmission and genetic predisposition to infection. *Gut*, 57: 1268 -1274, 2008.
- PRINCE, A.M.; BROTMAN, B.; GRADY, G.F.; KUHNS, W.J.; HAZZI, C.; LEVINE, R.W., MILLIAN, S.J. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *The Lancet*, 2(7875): 241-246, 1974.
- ROSS, L.; VAVRO, C.L.; KEHNE, S.L.; MCCLERNON, D.R., CLAIR, M. Substitution of a commercially available, RNA extraction procedure in an HIV-1 genotyping system improves sensitivity and allows reduced sample volume *Journal of Virological Methods*, 96(1): 1-4, 2001.

SCOTCH, J.D. & GRETCH, D.R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. *The Journal of the American Medical Association*, 297: 724-732, 2007.

SHAFFER, R.B.; LEVEE, D.J.; WINTERS, M.A.; RICHMOND, K.L.; HUANG, D., MERIGAN, T.C. Comparison of QIAamp HCV Kit Columns, Silica Beads and Phenol-Chloroform for Recovering Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA from Plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, 520-522, 1997.

SHIFFMAN, M.L. Hepatitis C therapy. *World Gastroenterology News*, 12: 18-19, 2007.

SILVA, G.F.; NISHUMURA, N.F.; COELHO, K.I.R., SOARES, E.C. Grading and staging chronic hepatitis C and its relation to genotypes and epidemiological factors in Brazilian blood donors. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9(2): 142-149, 2005.

SILVA, C.M.D.; COSTI, C.; KRUG, L.P.; RAMOS, A.B.; GRANDI, T.; GANDOLFI, V.L.; MENEZES, M.E.; OCAMPOS, M.; NIEL, C., ROSSETTI, M.L.R. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7): 867-870, 2007.

SMITH, D.B.; MELLOR, J.; JARVIS, L.M.; DAVIDSON, F.; KOLBERG, J.; URDEA, M.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. The International HCV Collaborative Study Group. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *Journal of General Virology*, 76: 1749-1761, 1995.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J.; BONINO, F.; BRADLEY, D.W.; BRECHOT, C.; BROUWER, J.T.; CHAN, S.W.; CHAYAMA, K.; CHEN, D.S.;

CHOO, Q.L.; COLOMBO, M.; CUYPERS, H.T.M.; DATE, T.; DUSHEIKO, G. M.; ESTEBAN, J.I.; FAY, O.; HADZIYANNIS, S.J.; HAN, J.; HATZAKIS, A.; HOLMES, E.C.; HOTTA, H.; HOUGHTON, M.; IRVINE, B.; KOHARA, M.; KOLBERG, J.A.; KUO, G.; LAU, J. Y.N.; LELIE, P.N.; MAERTENS, G.; MCOMISH, F.; MIYAMURA, T.; MIZOKAMI, M.; NOMOTO, A.; PRINCE, A.M.; REESINK, H.W.; RICE, C.; ROGGENDORF, M.; SCHALM, S.W.; SHIKATA, T.; SHIMOTOHNO, K.; STUYVER, L.; TRÉPO, C.; WEINER, A.; YAP, P.L., URDEA, M.S. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, 19: 1321-1324, 1994.

SIMMONDS, P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, 21: 570-583, 1995.

SIMMONDS, P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 31: 54-60, 1999.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus 15 years on. *Journal of General Virology*, 85(11): 3173-3188, 2004.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELEAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPE, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D. G.; OKAMOTU, H.; PAWLITSKY, J. M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L.J.; THIEL, H.J.; VIAZOV, S.; WEINER, A.J., WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42: 962-973, 2005.

STUYVER, L.; ROSSAU, R.; WYSEUR, A.; DUHAMEL, M.; VANDERBORGHT, B.; HEUVERSWYN, H.V., MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using line probe assay. *Journal of General Virology*, 74:1093-1103, 1993.

STUYVER, L.; WYSEUR, A.; VAN ARNHEM, W.; LUNEL, F.; LAURENT-PUIG, P.; PAWLITSKY, J.M.; KLETER, B.; BASSIT, L.; NKENGASONG, J., VAN DOORN, L.J. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe

assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Research*, 38: 137-157, 1995.

STUYVER, L.; WYSEUR, A.; VAN ARNHEM, W.; HERNANDEZ, F., MAERTENS, G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2259-2266, 1996.

TAKEUCHI, T.; KATSUME, A.; TANAKA, T.; ABE, A.; INOUE, K.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KAWAGUCHI, R.; TANAKA, S., KOHARA, M. Real-time detection system for quantification of HCV genome. *Gastroenterology*, 11(3): 636-642, 1999.

VAN DER HOEK, L.; BOOM, R.; GOUDSMIT, J.; SNIJDERS, F., SOL, C.J. Isolation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA from feces by a simple method and difference between HIV-1 subpopulations in feces and serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 581-588, 1995.

VERHOFSTEDÉ, C.; FRABSEN, K.; MARISSSENS, D.; VERHELST, R.; VAN DER GROEN, G.; LAUWERS, S.; ZISSIS, G., PLUM, J. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *Journal of Virological Methods*, 60: 155-159, 1996.

WHO - World Health Organization *Report* Global surveillance and control of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 6:35-47, 1999.

WHO - World Health Organization. Hepatitis C. Fact Sheet 164, 2000.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2): 223-235, 2000.

ZEUZEM, S.; HULTCRANTZ, R.; BOURLIERE, M.; GOESER, T.; MARCELLIN, P.; SANCHEZ-TAPIAS, J.; SARRAZIN, C.; HARVEY, J.; BRASS, C., ALBRECHT, J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic

hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *Journal of Hepatology*, 40: 993–999, 2004.

ZHENG, X.; PANG, M.; CHAN, A.; ROBERTO, A.; WARNER, D., YEN-LIEBERMAN, B. Direct comparison of hepatitis C virus genotypes tested by INNO-LiPA HCV II and TRUGENE HCV genotyping methods. *Journal of Clinical Virology*, 28: 214-216, 2003.

ZHENYU, C. & WECK, K.E. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3127-3134, 2002.

ZEUZEM, S. Heterogeneous virological response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C who responds less well? *Annals of Internal Medicine*, 140: 370–381, 2004.

Apêndice 1 – Manuscrito publicado

High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil

Mem Inst Oswaldo Cruz, 102(7): 867-870, 2007.

Resumo

O Vírus da Hepatite C (HCV) é classificado em seis genótipos principais, designados por números de 1 a 6. A duração do tratamento padrão para a hepatite C é de 48 semanas para pacientes infectados com o genótipo 1 e de 24 semanas para pacientes infectados com genótipos 2 e 3. Um total de 1544 de pacientes crônicos do Rio Grande do Sul (RS, n= 627) e de Santa Catarina (SC, n=917) foram genotipados através da técnica de RFLP. No RS, 338 (53,9%; IC 95% 50 - 58,7%), 34 (5,4%, IC 95% 3,8 - 7,4%) e 255 (40,7%; IC 95% 36,9 - 44,6%) amostras foram classificadas como genótipos 1, 2 e 3, respectivamente. Em SC, 468 (51%; IC 95% 47,8 – 54,2%), 26 (2,9%, IC 95% 1,9 – 4,1%) e 423 (46,1%; IC 95% 42,9 - 49,3%) amostras foram classificadas como genótipos 1, 2 e 3, respectivamente. Os resultados obtidos com a genotipagem por RFLP de 68 amostras foram confirmados por seqüenciamento de DNA. Conclui-se que aproximadamente metade dos pacientes portadores do HCV do Sul do Brasil são infectados pelos genótipos 2 e 3 e, estes resultados têm importantes implicações terapêuticas, já que podem ser tratados por 24 semanas, ao invés de 48.

Apêndice 2 – Curriculum Vitae do autor resumido

COSTI, C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Cintia Costi

Nascimento: 30/04/1977 - Caxias do Sul/RS - Brasil

CPF: 96054700049

Endereço profissional: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS)

Avenida Ipiranga, 5400 - 3º andar

Jardim Botânico - Porto Alegre, RS – Brasil

CEP: 99610-000.

Telefone profissional: (51) 3352 0336; 3288 4036

E-mail: cintiacosti@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

2006 - ATUAL Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Desenvolvimento de um Método Molecular Colorimétrico para Detecção e Genotipagem do Vírus da Hepatite C.

Orientador: Maria Lúcia Rosa Rossetti

Co-orientador: Arnaldo Zaha

- 2002 - 2004** Aperfeiçoamento em Bioquímica e Análises Clínicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Comparação entre as técnicas de seqüenciamento direto e RFLP na genotipagem do vírus da hepatite C.
Orientador: Cláudia Maria Dornelles da Silva
- 1997 - 2002** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: A Importância da Genotipagem no Diagnóstico Laboratorial do Vírus da hepatite C.
Orientador: Arnaldo Zaha

Cursos

- 2001** Curso de curta duração em Aplicação da Biologia Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001** Curso de curta duração em Diagnóstico Laboratorial das Hepatites Virais.
Sindicato dos Farmacêuticos no Estado de Santa Catarina, SINDIFAR-SC, Brasil
- 2002** Curso de curta duração em Noções de Sistema de Qualidade p Laboratório.
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa Em Saúde, FEPPS, Brasil
- 2002** Extensão universitária em II Curso de Biologia Molecular Aplicada à Medicina.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de

-
- Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2003** Extensão universitária em Novas Fronteiras da Genética.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2003** Discussão Sobre Pesquisa Utilizando Células Tronco.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2003** Curso de curta duração em Hepatitis Viruses.
Sociedade Brasileira de Virologia, SBV*, Brasil
- 2004** Curso de curta duração em Terapia Celular e Manipulação Genética.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2005** Curso de curta duração em Treinamento Carga Viral na Plataforma de PCR Real Time 7500.
Applied Biosystems, AB*, Brasil
- 2006** Curso de curta duração em Real Time PCR - Princípios Básicos e Aplicações.
Applied Biosystems, AB*, Brasil
- 2007** Curso de curta duração em Treinamento no analisador genético ABI 3130 xL.
Applied Biosystems do Brasil, São Paulo, Brasil
- 2007** Curso de curta duração em Treinamento em Identificação Humana na plataforma ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.
Applied Biosystems, AB*, Brasil

3. ESTÁGIOS

UFRGS – Instituto de Química

- 2000 - 2001** Bolsista Iniciação Científica CNPq
Orientador: Cynthia Zukosky Remor
Projeto: Síntese de Compostos Heterocíclicos a partir de Sulfinilquinonas
- 1999 – 1999** Iniciação Científica Voluntária
Orientador: Valter Stefani
Projeto: Síntese de Naftoquinonas Substituídas para Obtenção de Novos Compostos Heterocíclicos

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa Em Saúde – FEPPS

- 2001 - 2003** Bolsista iniciação Científica FAPERGS
Orientador: Cláudia Maria Dornelles da Silva
Projeto: Padronização e aplicação de genotipagem em estudo epidemiológico da hepatite C.
- 2000 - 2001** Iniciação científica voluntária
Responsável: Cláudia Maria Dornelles da Silva
Projeto: Padronização de técnicas de genotipagem do vírus da hepatite C.

4. PRÊMIOS:

- 2002** Melhor trabalho da sessão de Biotecnologia do VI Salão de Iniciação Científica do Instituto de Cradiologia/FUC intitulado: “Detecção de DNA do

Vírus da Hepatite B em doadores de sangue negativos para o marcador HBsAg.”

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

04/2004 - atual Realização de serviços técnicos especializados nas áreas de genética e biologia molecular, atuando principalmente no desenvolvimento de novos métodos moleculares de diagnóstico, epidemiologia dos Virus das Hepatites C e B e investigação de paternidade.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. Chula, Fernanda Goulart Lanes, Rodenbusch, Rodrigo, Schumacher, Simone, Grandi, Tarciana, Michelon, Candice Tosi, Gastaldo, André Zoratto, **COSTI, C.**, Carvalho, Bianca, da Silva, Cláudia Maria Dornelles

15 STR loci frequencies with mutation rates in the population from Rio Grande do Sul, Southern Brazil., *Forensic Science International: Genetics*, v.3, p.e35 - e38, 2009.

2. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, KRUG, Luciano Percival, RAMOS, Ana Beatriz, GRANDI, Tarciana, GANDOLFI, V. L., MENEZES, M. E., OCAMPOS, M., NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v.102, p.867 - 870, 2007.

3. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, MICHELON, Candice, ORAVEC, Rejane, RAMOS, Ana Beatriz, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *Journal of Infection.*, v.51, p.24 - 29, 2005.

4. SILVA, Cláudia Maria Dornelles; Rodenbusch, R.; Schumacher, S.; MICHELON, Candice Tosi; GRANDI, Tarciana; Gastaldo, André Zoratto; **COSTI, C** . Population genetic data for 11 STR loci, including SE33, in Southern Brazil. *Legal Medicine* (Tokyo), 2009 (**no prelo**).

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. FRE, N. N., **COSTI, C**, GRANDI, Tarciana, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Desenvolvimento de uma metodologia para detecção e genotipagem do vírus da hepatite C (HCV) através de hibridização em microplacas. In: **XX Salão de iniciação científica UFRGS**, 2008. p.392

2. Hamester, F. I., **COSTI, C.**, GRANDI, Tarciana, SILVA, Cláudia Maria Dornelles

Estudo comparativo de três métodos de extração de RNA para detecção do vírus da hepatite C. In: **53° Congresso Brasileiro de Genética**, 2007, Águas de Lindóia.. p.70 – 70

3. **COSTI, C.**, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, GRANDI, Tarciana, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Aplicação da Técnica de PCR em Tempo Real para Determinação da Carga Viral em Pacientes Infectados com o Vírus da Hepatite C, **3° Jornada Científica FEPPS**, 2006. v.1. p.05 -

4. ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, **COSTI, C.**, GRANDI, Tarciana, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, POSSUELO, Lia Gonçalves, ZAHA, Arnaldo

Avaliação da Co-infecção pelo Virus da Hepatite C em Pacientes Infectados por

Mycobacterium tuberculosis., Porto Alegre. **3° Jornada Científica. FEPPS**, 2006. v.01. p.17 -

5. GRANDI, Tarciana, **COSTI, C.**, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, ALMEIDA, Sabrina, ANDRADE, Ardalá Breda
Determinação da carga viral do Vírus da Hepatite C em pacientes coinfectados pelo Vírus da imunodeficiência Humana. Porto Alegre. **3° Jornada Científica da FEPPS.** , 2006. p.18 -

6. **COSTI, C.**, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, GRANDI, Tarciana, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Desenvolvimento de um Teste Colorimétrico para o Diagnóstico e Genotipagem do Vírus da hepatite C. In: **VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, 2006, Porto Alegre. 2006. v.21.

7. GRANDI, Tarciana, **COSTI, C.**, KRUG, Luciano Percival, RAMOS, Ana Beatriz, NIEL, Christian, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da
Distribution of HCV Genotypes in Southern Brazil In: **World Congress of Pharmacy and Pharamceutical Sciences**, 2006, Salvador. 2006. v.1. p.99 -

8. SILVA, Cláudia Maria Dornelles, **COSTI, C.**, GRANDI, Tarciana, KRUG, Luciano Percival, NIEL, Christian, MEDEIROS, Rubia Marília, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Estudo da Prevalência dos Genótipos do HCV no Rio Grande do Sul. In: **52° Congresso Brasileiro de Genética e 12° Congresso de La Asociación Latinoamericana de Genética**, 2006, Foz do Iguaçu. v.01. p.874 -

9. EMMEL, Luis Fernando, **COSTI, C.**, KRUG, Luciano Percival, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da
Frequência dos Genótipos do Vírus da Hepatite C em uma População do Rio Grande do Sul, período 2000-2002. In: **XXIII Congresso Brasileiro de**

Microbiologia, 2005, Santos. p.325

10. **COSTI, C.**, KRUG, Luciano Percival, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, SILVA, Cláudia Maria Dornelles

Comparação de Métodos para Detecção e Genotipagem do Vírus da Hepatite C In: **38° Congresso Brasileiro de Patologia clínica/ Medicina Laboratorial**, 2004. p.122.

11. SILVA, Cláudia Maria Dornelles, **COSTI, C.**, MICHELON, Candice Tosi, ORAVEC, Rejane, RAMOS, Ana Beatriz, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Detecção de Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite b entre Doadores de Sangue Anti-HBc Positivos no Sul do Brasil In: **38° Congresso Brasileiro de Patologia clínica/ Medicina Laboratorial**, 2004, p.126.

12. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, KRUG, Luciano Percival, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Comparação de Técnicas de Genotipagem no Diagnóstico do Vírus da Hepatite C In: 2ª Jornada Científica FEPPS, 2004, Porto Alegre. **2ª Jornada Científica FEPPS.** , 2004. v.1. p.03

13. **COSTI, C.**, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Desenvolvimento de um Teste Colorimétrico para o Diagnóstico e Genotipagem do Vírus da Hepatite C. In: **2ª Jornada Científica FEPPS**, 2004. p.15

14. **COSTI, C.**, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, SILVA, Cláudia Maria Dornelles
Aplicação da RT-PCR no Diagnóstico da Hepatite C. In: **XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica**, 2003, Porto Alegre. 2003. p.483

15. **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORAVEC, Rejane, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Detecção de DNA do Vírus da Hepatite B em Plasma de Doadores de Sangue

Negativos para o Marcador HBsAg. 2002,. **I Semana de Estudos Avançados em Cardiologia e VI Salão de Iniciação Científica.** p.229

16. **COSTI, C.**, VIDAL, M, ROCHA, V, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da

Detecção de DNA do Vírus da Hepatite C em Pacientes com Tuberculose: Análises Preliminares de Parâmetros Sorológicos e Viroológicos **XIII Salão de Iniciação Científica e X Feira de Iniciação Científica.** , 2002.

17. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORACEC, R, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Determinação da Prevalência do DNA do Vírus da Hepatite B em Bolsas de Sangue HBsAg Negativas e Anti-HBc Positivas. **I Jornada de Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).** , 2002.

18. **COSTI, C.**, ZAHA, Arnaldo, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Diagnóstico Molecular por RT-PCR e Genotipagem do Vírus da Hepatite C em Pacientes positivos para o marcador Anti-HCV. **XIV Salão de Iniciação Científica e XI Feira de Iniciação Científica UFRGS.** , 2002.

19. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Padronização de Técnicas Moleculares para o Diagnóstico do Vírus da Hepatite C. **I Jornada de Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).** , 2002.

20. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, ZAHA, Arnaldo, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Padronização de Técnicas Moleculares para o Diagnóstico do Vírus da Hepatite C. **2º Jornada da Organização dos Centros de Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.** , 2002.

21. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, COSTA, Cleusa, ORAVEC, Rejane, **COSTI, C.**, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Aplicação da Técnica de PCR no Diagnóstico da Infecção Oculta do Vírus da Hepatite B em Doadores de sangue. In: **I Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária**, 2002, São Paulo.
22. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORAVEC, Rejane, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Detecção de Infecção oculta do Vírus da Hepatite B por PCR e Genotipagem em Doadores de Sangue **48o Congresso Nacional de Genética - Águas de Lindóia.** , 2002.
23. **COSTI, C.**, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Detecção do Vírus da Hepatite C por RT-PCR em Pacientes com Anti-HCV Positivo. **XII Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul.** , 2002.
24. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORAVEC, R, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Diagnóstico Molecular do Vírus da Hepatite B em Doadores de Sangue HBsAg negativos **2º Jornada da Organização dos Centros de Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.** , 2002.
25. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORAVEC, Rejane, NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Hepatitis B virus DNA in brazilian donors positive exclusively for antibodies to hepatitis B core antigen. Lisboa. **Third European Congress on Tropical Medicine and International Health.** , 2002.
26. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORAVEC, Rejane, FERRARI, V., SILVA, D., NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa
Detection of hepatitis B virus DNA plasma from anti-HBc positive, HBsAg

negative brazilian blood donors, 2001, Caldas Novas. **XII National Meeting of Virology and 4th Mercosul Meeting of Virology.** , 2001.

27. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, ROCHA, V, VIDAL, M, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Detection of hepatitis C virus in patients coinfecting with tuberculosis. Caldas Novas. **XII National Meeting of Virology and 4th Mercosul Meeting of Virology.** , 2001.

28. SILVA, Cláudia Maria Dornelles, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORACEC, R, FERRARI, V., SILVA, D., NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Diagnóstico laboratorial do vírus da hepatite B em doadores de sangue com anti-HBc positivo e HBsAg negativo. **X Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, VIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos e II Encontro De Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul,** 2001. v.1. p. 95 - 95

29. **COSTI, C.**, SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, ROCHA, V, VIDAL, M, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Diagnóstico Laboratorial do vírus da Hepatite C em Pacientes com Tuberculose. **X Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, VIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos e II Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul.** , 2001. v.1. p. 95 - 95

30. SILVA, Cláudia Maria Dornelles da, **COSTI, C.**, COSTA, Cleusa, ORAVEC, Rejane, FERRARI, V., SILVA, D., NIEL, Christian, ROSSETTI, Maria Lúcia Rosa

Investigation of Hepatitis B Virus DNA Blood Donors With Positive Anti-HBc negative HBsAg In: **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia,** 2001, Foz do Iguaçu. v.1. p.423 - 423

31. **COSTI, C.**, DASSOLER, S. C., REMOR, C. Z.

Síntese de Benzofuranos por Reações de Sulfinilquinonas com Acetais de

Cetena-Adições de Tipo Michel In: **VIII Jornadas de Jovens Pesquisadores do Grupo Montevideo**, 2000, São Carlos, p.148 .

32. **COSTI, C.**, REMOR, C. Z.

Síntese de Compostos Heterocíclicos a partir de Sulfinilquinonas ,Porto Alegre, **XII Salão de Iniciação Científica e IX Feira de Iniciação Científica UFRGS**. 2000. p.38 - 38

33. CIVA, M., **COSTI, C.**, STEFANI, V.

Síntese de Naftoquinonas Substituídas para Obtenção de Novos Compostos Heterocíclicos In: **XI Salão de Iniciação Científica UFRGS**. Porto Alegre, 1999. p.17 – 17.