

A importância da tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos para a detecção do vírus da hepatite C em bancos de sangue

Aurélia Gonçalves de OLIVEIRA¹

Rodrigo da Silva SANTOS²

Leonardo Barcelos de PAULA³

Angela Adamski da Silva REIS⁴

¹Departamento de Biologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás).

²Departamento de Genética – Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP).

³Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP).

⁴Professora Doutora e Orientadora. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás (UFG).

E-mail: angeladamski@gmail.com (Reis, AAS)

RESUMO: O HCV, agente causador da hepatite C, é um vírus pertencente ao gênero *Hepacivirus*, da família Flaviviridae, apresentando um genoma constituído por uma hélice simples de RNA. A transmissão do HCV ocorre por via parenteral, como: transfusão de sangue e hemoderivados, hemofílicos, usuários de drogas injetáveis ou inaláveis, material cortante ou perfurante podem ser veículo transmissor. A possibilidade de transmissão sexual é ainda uma questão aberta e a transmissão vertical também é baixa, sendo que, no entanto, a mesma pode aumentar se o paciente tiver forte viremia e/ou co-infecção com o HIV. O diagnóstico da hepatite C é baseado em testes sorológicos como ELISA e RIBA e em técnicas de biologia molecular. O ELISA detecta o anticorpo contra o vírus anti-HCV, caso o resultado seja indeterminado é necessário utilizar testes confirmatórios como o RIBA. Para confirmação diagnóstica, usa-se a PCR qualitativa RNA-HCV, e testes quantitativos são utilizados para avaliar a carga-viral, sendo que os mesmos também são utilizados para monitorar a resposta terapêutica. A tecnologia de amplificação dos ácidos nucléicos (NAT) resulta em uma mudança de métodos laboratoriais convencionais, pois, a identificação é rápida no período de janela imunológica, aproximadamente 50 a 60 dias após a contaminação, resultando entre 10 a 11 dias. A necessidade de incorporação do NAT nos bancos de sangue é devido a sua habilidade de reduzir o período de janela imunológica entre a infecção e a descoberta da doença, aumentando assim a segurança transfusional.

Palavras-chave: Hepatite C, Tecnologia de Amplificação dos Ácidos Nucléicos, Diagnóstico Molecular.

The importance of nucleic acid amplification technology for detection of hepatitis c virus in blood banks

ABSTRACT: The HCV, agent of hepatitis C, a virus belonging to the genus *Hepacivirus* of the Flaviviridae family, having a genome comprising a single strand of RNA. HCV transmission occurs via parenteral, such as blood transfusion and blood products, hemophiliacs, intravenous drug users or inhaled, material cutting or piercing can be a vehicle transmitter. The possibility of sexual transmission is still an open question and the transmission is also low, being, however, it may be increased if the patient has strong viremia and/or co-infection with HIV. The diagnosis of hepatitis C is based on serological tests such as ELISA and RIBA and molecular biology techniques. The ELISA detects antibodies against the virus anti-HCV, if the result is indeterminate confirmatory tests must be used such as RIBA. To confirm the diagnosis, we use a qualitative PCR RNA-HCV, and quantitative tests are used to evaluate viral-load, and they are also used to monitor therapeutic response. The nucleic acid amplification technique (NAT) results in a change of conventional laboratory methods, therefore, is quick to identify the “immune gap” period, approximately 50 to 60 days after contamination resulting from 10 to 11 days. The need for incorporation of NAT in blood banks is due to its ability to reduce the immune window period between infection and disease was discovered, thereby increasing transfusion safety.

Keywords: Hepatitis C, Nucleic Acid Amplification Technique, Molecular Diagnostics.

1. Introdução

A hemoterapia, no Brasil e no mundo, caracterizou-se pelo desenvolvimento e adoção de novas tecnologias, objetivando minimizar os riscos transfusionais, especialmente quanto à prevenção da disseminação de agentes infecto-contagiosos. A indicação adequada do uso do sangue e componentes, atendendo preceitos da hemoterapia seletiva, vem propiciando uma maior otimização das unidades coletadas e redução quantitativa na exposição dos receptores. O Ministério da Saúde (MS) determina que, para cada doação efetivada, sejam realizados testes sorológicos para os seguintes patógenos: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) 1 e 2, Vírus Linfotrópico – T Humano I e II (HTLV I e II), *Tripanossoma cruzi*, *Treponema palladium*, *Plasmodium* em áreas endêmicas de malária, Citomegalovírus (CMV), Vírus da Hepatite B (HBV) e Vírus da Hepatite C (HCV) (Carrazzone *et al.*, 2004).

Dentre as hepatites virais, a de maior destaque é a hepatite C (HCV), que constitui grave problema de saúde pública em diferentes partes do mundo, porque se associam a elevado grau de cronicidade, em torno de 85% dos casos e podendo evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. O quadro da hepatite C vem sendo cada vez mais preocupante em nível mundial, inclusive no Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam

3 milhões de pessoas infectadas no Brasil, sendo que 140 mil delas estão na capital paulista (Biancarelli, 2004; Valente *et al.*, 2005).

O HCV é pertence ao gênero *Hepacivirus*, da família *Flaviviridae*, sendo seu genoma constituído por uma hélice simples de RNA. Possui aproximadamente 4.800pb, com uma única região de leitura que produz uma proteína de cerca de 3.000 aminoácidos. No nucleocapsídeo, distinguem-se as proteínas estruturais: core, E1 e E2 e as não estruturais – NS – (1 a 5), sendo essas últimas responsáveis pela replicação viral (Strauss, 2001).

A transmissão do HCV ocorre por via parenteral e hemoderivados, sendo o vírus encontrado principalmente no sangue total, papa de hemácias, plaquetas, plasma e especialmente, nos concentrados de fatores de coagulação. A possibilidade de transmissão sexual é ainda discutida. A gravidez não está contra indicada nas mulheres infectadas, pois a transmissão vertical é baixa, inferior a 6%. O risco de transmissão aumenta nos pacientes com forte viremia e/a co-infecção com o HIV (Conte, 2000a; Passos, 2003 e Valente *et al.*, 2005).

O HIV e o HCV compartilham o mesmo mecanismo de transmissão em relação à via parenteral. A semelhança epidemiológica explica a alta frequência da co-infecção pelos dois vírus, sendo mais

comum em pacientes com história de uso de drogas injetáveis e transfusões (Di *et al.*, 2001).

Existe uma grande variabilidade na sequência genômica do HCV. A análise filogenética das sequências genômicas permitiu a caracterização de 6 genótipos (1 a 6) que são subdivididos em grupos A até F. No Brasil, os mais frequentes são os genótipos 1, 2 e 3. Sabe-se que, dentre esses, o genótipo 1 caracteriza-se pela maior resistência ao tratamento antiviral. Dentro de um mesmo genótipo e subtipo pode-se ainda ter variações do HCV, que são denominadas *quasispecies* (Strauss, 2001). As *quasispecies* são um conjunto de moléculas muito semelhantes, que apresentam muitas características gerais em comum, mas, por outro lado, heterogêneas, devido a diferenças na sequência nucleotídica. Assim, desempenham importante papel no desenvolvimento da infecção viral, permitindo a seleção de variantes mais resistentes, sob a pressão da resposta imunológica do hospedeiro (Corrêa, 2006). O período de incubação do vírus é de 6 a 7 semanas (Al-Quaiz *et al.*, 2004). Na última década, foi descrito uma proteína CD81, que se ligaria à fração E2 (envelope do vírus), funcionando como um receptor e co-receptor, encontrado tanto em hepatócitos como em linfócitos periféricos. Assim, a neutralização do HCV poderia se fazer por intermédio desse receptor (Strauss, 2001). Porém, seu

mecanismo exato de replicação ainda não está bem elucidado, devido à grande dificuldade de se estudar o vírus (Moradpour *et al.*, 2004).

A determinação da história natural da hepatite C é de difícil avaliação devido a vários fatores: escassez de estudos prospectivos, frequente imprecisão dos dados sobre a época da contaminação, curso longo e assintomático da doença. Além desses, existem os fatores que influenciam os estudos, tanto ambientais como etilismo crônico e co-infecções virais (diferentes genótipos e cargas virais), ou fatores do hospedeiro, dentre eles os fatores imunológicos (Al-Quaiz *et al.*, 2004). Apesar de sua enorme relevância, é uma doença que recebe pouco destaque pelos órgãos vinculados a Saúde Pública. Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV ainda não foram esclarecidos. Entretanto, na última década, houve avanços significativos no entendimento de sua epidemiologia, vias de transmissão, patogênese, diagnóstico e terapêutica (Strauss, 2001).

A doença é assintomática na maioria dos casos. O tempo de incubação da hepatite C mostra-se bastante variável, de 1 a 13 meses, com média de 8 meses. Logo após a contaminação, o melhor marcador e único disponível até o presente é a determinação do RNA-HCV por técnicas moleculares, pois, os anticorpos surgem apenas 4 a 20 semanas após o contágio (Strauss, 2001). A patologia apresenta a forma aguda que antecede a forma

crônica, a sintomatologia pode apresentar mal-estar, vômitos, náuseas, icterícia e dores musculares. No entanto, a maioria dos portadores só percebe que estão doentes anos após a infecção, quando apresentam um caso grave de cronificação. A inexistência de vacina e o reduzido impacto do tratamento apontam para a prevenção como a única alternativa para deter o avanço da doença, melhorar o diagnóstico, os quais representam papel fundamental para se atingir o controle do HCV (SBPC, 2006 e Varella, 2006).

Sendo assim, diante desse grave problema de saúde pública, o objetivo dessa revisão da literatura é abordar aspectos gerais da infecção, a partir da contaminação, diagnósticos, tratamento, prevenção e os avanços da biologia molecular na área do diagnóstico, tornando assim, os testes mais eficientes, reduzindo o período da janela imunológica.

2. Epidemiologia

O percentual de pacientes cronicamente infectados que evoluem para cirrose após 20 anos do contágio varia em diversos estudos, sendo que os de base populacional resultaram em taxas de 4 a 10%, enquanto nos realizados em clínicas especializadas em doenças hepáticas a incidência encontrada é de cerca de 20%, sendo que provavelmente a taxa correta situe-

se entre 10 e 15%. Entretanto, pouco se sabe a respeito da evolução da infecção crônica pelo HCV em períodos mais longos do que duas décadas. Uma vez com cirrose, cerca de 1 a 4% dos pacientes por ano desenvolvem carcinoma hepatocelular (Alves *et al.*, 2003).

No Brasil, não há dados precisos sobre a prevalência do HCV. Há relatos em diversas áreas que sugerem que, em média, na população a prevalência esteja entre 1 a 2% (Ferreira & Silveira, 2004). Até 1998, registravam-se aproximadamente 180 milhões de pessoas portadoras do vírus da hepatite C no mundo, sendo que nos anos de 2000 a 2003, esses dados foram superados. Estimam-se em 200 milhões os portadores de HCV, ou cerca de 3% da população mundial esteja infectada por esse vírus (Terrez-Speziale, 2003, Wesley & Alter, 2000). Aproximadamente 80 a 85% dos casos podem evoluir à cronicidade ocupando atualmente o primeiro lugar entre as causas de transplante hepático (Gaze, 2006).

No Brasil, foram notificados até 2001, cerca de 20.000 casos, tornando-se impossível negar a emergência de mais uma epidemia de gravidade inquestionável (Gaze, 2006). A distribuição da doença é mundial, sendo que a ocorrência varia de região para região, assim dificultando o estudo real da prevalência de hepatite C. A mais baixa prevalência dessa infecção, de 0,01 a 0,1% é encontrada no Reino Unido e na Escandinávia. No Oeste Europeu, Estados Unidos, parte das Américas

Central e do Sul, Austrália e certas regiões da África, incluindo África do Sul, a prevalência varia de 0,2 a 0,5%. A prevalência de 1 a 5% tem sido observada no Brasil, Leste Europeu, Mediterrâneo, Índia, partes da África e Ásia. A mais alta prevalência tem sido descrita no Egito 17 a 26% (Corrêa, 2006).

Segundo informações do relatório da Sociedade Brasileira de Hepatologia, os estudos de prevalência em candidatos a doação de sangue, por meio do teste de triagem anti-HCV, demonstram variações entre as regiões brasileiras. A menor prevalência foi observada na região Sul (0,65%), enquanto prevalências moderadas foram encontradas nas regiões Centro-Oeste (1,04%), Nordeste (1,19%) e Sudeste (1,43%). A alta prevalência (1,6 a 3,5%) foi reportada na região Norte. Assim, estima-se uma prevalência moderada para as principais regiões brasileiras, observando-se alta prevalência somente em alguns Estados, como o Pará (2,0%) e o Rio de Janeiro (2,6%). Contudo, uma prevalência muito alta foi relatada no Acre 5,9%, a maior entre todos os Estados brasileiros (Teixeira & Velasco, 2005).

3. Resposta Imunológica da Infecção pelo HCV

O papel que o sistema imune exerce na infecção pelo HCV, desencadeia intenso

interesse e controvérsia quanto aos estudos nos últimos anos, o qual foi revisado em detalhes nos últimos cinco anos (Henderson, 2003). A importância relativa da resposta humoral e celular, em todos os níveis do sistema imunológico foi o foco de investigação durante a última década. Sugere-se uma variedade de fatores, alguns relacionados com a genética de defesa do hospedeiro, fatores ambientais e a própria biologia do vírus (Henderson, 2003).

Após a infecção, diversos mecanismos da resposta imune são desencadeados com o intuito de controlá-la. A infecção de uma célula hospedeira permite a replicação viral intensa, favorecendo o aparecimento de viremia e subsequente ativação do sistema imune do hospedeiro. Um dos mecanismos imunológicos desencadeados consiste na produção de interferon (IFN) alfa (α) e beta (β) e gama (γ), que atuam na ativação de mecanismos protetores da infecção de células adjacentes, além de substâncias com ação anti-viral direta, como a proteína quinase, que inibe a síntese de proteínas, e a 2'5' oligoadenilato sintetase envolvida na degradação do genoma viral. Dois dias após a infecção, mecanismos da imunidade inata já podem ser evidenciados no organismo hospedeiro, incluindo a atividade de células fagocíticas e a ativação de linfócitos '*natural killer*' (NK), sendo que a ausência ou redução da atividade desses linfócitos pode levar à maior susceptibilidade à infecção viral. À

medida que a infecção viral progride, essas respostas imunes específicas são ativadas, com o aparecimento de linfócitos T auxiliares (LTa-CD4+). Os anticorpos produzidos contra proteínas virais podem apresentar especificidades variadas, porém aqueles contra glicoproteínas do envelope ou capsídeo viral ou da membrana da célula infectada são os mais importantes no controle da infecção (Martins Filho, 2005).

Pacientes imunocompetentes que adquirem a infecção por HCV, geralmente produzem uma variedade de anticorpos dirigida contra as regiões estruturais e não-estruturais do vírus, diminuindo gradualmente com o passar do tempo. Em infecções crônicas a resposta humoral do hospedeiro coloca pressão significativa no vírus, resultando no aparecimento de gerações de *quasispecies*. O aparecimento de números crescentes de *quasispecies*, permitindo que o vírus presumivelmente escape da imunidade humoral e celular do hospedeiro, prediz infecção crônica. Porém, outros estudos em pacientes (embora com população relativamente pequena) concluem que a evolução de *quasispecies* de HCV simplesmente não se refere à resposta imunológica (Henderson, 2003).

Na resposta imune adaptativa, os LTa-CD4+ são fundamentais na atuação da imunidade celular contra patógenos intracelulares. Essas células reconhecem os peptídeos virais antigênicos ligados às

moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II na membrana das células apresentadoras de antígenos. Os LTa-CD4+ também desempenham papel fundamental na ativação dos linfócitos T citotóxicos, responsáveis pela eliminação das células infectadas por vírus e, em conjunto, produzem citocinas que podem inibir a replicação viral. As respostas dos LTa-CD4+ aos diferentes antígenos virais, incluindo o do core, estão associados a uma evolução benigna da infecção pelo vírus da hepatite C (Martins Filho, 2005).

Embora o desenvolvimento preciso sobre a resposta imunológica para HCV não esteja totalmente elucidado. Permanece um assunto de controvérsia significativa, pois, indivíduos infectados desenvolvem respostas equilibradas, agressivas, alguns conseguem eliminar a infecção e outros não, podendo evoluir para cirrose ou hepatocarcinoma (Henderson, 2003).

4. Transmissão

A transmissão do HCV ainda não está muito clara para a comunidade científica, mas sabe-se que se dá principalmente pelo contato direto com sangue contaminado, por meio de transfusão, compartilhamento de agulhas e uso de objetos cirúrgicos não esterilizados. Inicialmente as principais vítimas foram

hemofílicos, pacientes renais crônicos que faziam hemodiálise e pessoas que receberam transfusões de sangue antes de 1992. Adicionalmente, os usuários de drogas injetáveis passaram a ser os mais afetados (Pearlman, 2004 & Poynard, 2004).

Outras vias de contaminação são os procedimentos médicos, odontológicos, de acupunturista ou de tatuagem. Portanto, qualquer material cortante ou perfurante pode ser veículo transmissor do vírus de uma pessoa para outra, como o alicate da manicure, a lâmina de barbear ou mesmo a escova de dente, compartilhada por cônjuges ou filhos (Strauss, 2001). As taxas de soro prevalência entre as populações de risco variam entre 0,18 a 0,8% em doadores de sangue, 9% em pacientes de diálise, 50% em usuários de drogas intravenosas e 70% em hemofílicos (Orgenics, 2011). Segundo a Portaria Nº 79 do Documento Oficial da União (DOU) 03/02/2003, todo sangue coletado no Brasil deverá ser testado por meio de técnicas de biologia molecular para diminuir a transmissão transfusional do HCV. Esses testes são caracterizados como testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) (Poli, 2003).

5. Diagnóstico Sorológico e Molecular

O método sorológico, que utiliza pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C, é o mais frequentemente empregado para identificar a infecção, presente e passada. Existem dois tipos de testes sorológicos: os que adotam a técnica Enzima Imunoensaio (ELISA), de alta sensibilidade, usadas no rastreamento da infecção; e os que utilizam a técnica de immunoblot (RIBA), de maior especificidade, nomeados por isso de suplementares ou confirmatórias. Em relação às técnicas de biologia molecular, podemos destacar vários testes. Um deles possibilita a detecção do RNA do vírus C, sendo útil para estabelecer o diagnóstico de infecção em situações específicas, como na fase inicial da infecção, em pacientes imunossuprimidos ou com baixa probabilidade de estarem infectados (Brandão, 2001).

Isoladamente, o teste positivo significa apenas que o paciente foi infectado. A única maneira de saber se a infecção é passada (cura espontânea) ou atual (aguda ou crônica) é a realização da PCR qualitativo para o HCV. Confirmada a cronicidade, é fundamental a biópsia hepática e a genotipagem. A biópsia define o tamanho e a extensão da lesão, o prognóstico e a indicação de tratamento (somente se houver fibrose hepática). As

lesões mínimas não devem ser tratadas porque podem piorar em 15% dos casos, devido ao desequilíbrio iatrogênico do binômio infecção-resposta imune. Pacientes com contra-indicação para a realização de biópsia hepática, são os hemofílicos ou plaquetopênicos, podendo ser incluídos no tratamento mesmo sem a evidência histológica de lesão hepática. A genotipagem é necessária para definir a duração do tratamento (Focaccia *et al.*, 2005).

6. Testes Sorológicos

O teste sorológico para diagnóstico de hepatite C, rotineiramente utilizado desde o início dos anos 90, é o teste ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), que adquiriu maior sensibilidade e especificidade ao passar de testes de primeira para segunda e terceira gerações, ELISA II ou III. Embora extremamente útil para o diagnóstico das hepatites crônicas, especialmente nos pacientes com alterações de transaminases e epidemiologia sugestiva de HCV, o teste de ELISA costuma apresentar resultado negativo nos primeiros meses após a contaminação, dificultando o diagnóstico etiológico nas fases iniciais da hepatite aguda pelo HCV ou mesmo falseando um resultado negativo em doadores de sangue contaminados. Por outro lado, persiste a possibilidade de resultado

falsamente positivo em doadores de sangue ou qualquer grupo de indivíduos com poucas chances de contaminação pelo HCV (Strauss, 2001).

Assim sendo, nos casos ou grupos com altas chances de infecção pelo HCV, a reatividade do teste pelo ELISA possui valor de diagnóstico definitivo. Na dúvida, porém, é possível requisitar testes confirmatórios ao método de ELISA, como o RIBA (Strauss, 2001). No RIBA, as misturas complexas são analisadas em géis de separação analítica e então as moléculas são transferidas para membranas (blots) para identificação de antígenos individuais por anti-soro específico. A realização desses testes revela-se particularmente útil no descarte de falsos-positivos em populações de baixo risco (Roitt *et al.*, 2002).

O teste para detecção do HCV deve ser realizado por todas as pessoas que receberam transfusão de sangue, de hemocomponentes ou de pessoas que realizaram um transplante de órgãos, principalmente se o fato ocorreu antes de 1992, pois o teste anti-HCV só passou a ser exigido para doadores após essa época. Outro grupo que tem grandes possibilidades de ter sofrido contaminação, é o dos pacientes que fazem ou fizeram hemodiálise. Também deve realizar o teste, pessoas que apresentam os sinais ou sintomas da doença, familiares de portadores de hepatite C e hemofílicos (SBPC, 2006).

As técnicas de biologia molecular, embora menos acessíveis e mais complexas, ganharam espaço e se firmaram como necessárias para confirmação diagnóstica. A PCR é uma das técnicas moleculares mais utilizadas. Para confirmação diagnóstica da hepatite C, aconselha-se a determinação qualitativa do RNA-HCV. As determinações quantitativas (carga viral) mostram-se importantes antes do início do tratamento, juntamente com a determinação do genótipo, para definir-se a duração do tratamento. Elas também são utilizadas para monitorar a resposta terapêutica ou para o acompanhamento de casos não tratados (Strauss, 2001).

7. Testes Moleculares

Os testes moleculares podem ser qualitativo, quantitativo e genotipagem (Flores, 2005). Os testes qualitativos informam a presença ou não do RNA viral, sendo considerado um teste sensível para a identificação do RNA do HCV pela reação em cadeia de polimerase com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR), que catalisa a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir da região 5' do RNA viral. Posteriormente, a PCR é utilizada para amplificar o cDNA, produzindo quantidades suficientes para serem detectadas em gel de agarose. O limite teórico de detecção, por

PCR, em condições ótimas, é de aproximadamente 1000 cópias do genoma/mL, mas existem variações da técnica, sendo as mais sensíveis, capaz de detectar até 100 cópias do genoma/mL de soro. A RT-PCR é uma técnica laboriosa que requer cuidados extremos para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Como os protocolos não são padronizados, os resultados variam entre os laboratórios (Brandão, 2001).

O nível de RNA do HCV (ou a carga viral) no soro ou no plasma reflete as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro. Foram desenvolvidas basicamente duas técnicas de biologia molecular para o teste quantitativo do HCV: uma utiliza a tecnologia da PCR e a outra, a do DNA ramificado (*branched DNA*). Esta última se baseia na amplificação de um sinal, e não do DNA alvo, como ocorre na PCR (Gretch, 1995).

Dentre as técnicas moleculares, a mais promissora para amplificação e quantificação de HCV é a técnica que utiliza o sistema de detecção em tempo real. A metodologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) permite que os produtos de amplificação sejam quantificados na fase exponencial da reação, quando a quantidade de produto é proporcional à quantidade de DNA-molde presente no início da reação (Ginzinger, 2002). Durante a qRT-PCR, o acúmulo de amplicons é detectado em tempo

real, para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou *primers* (Barbeau, 2004).

Essa metodologia tornou a quantificação de mRNA mais simples e precisa (Gabert *et al.*, 2003). A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação. Várias metodologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado. Os dois sistemas mais usados são o SYBER Green e o TaqMan (Applied Biosystems) (Novais & Alves, 2004). A PCR quantitativa além de detectar o HCV a partir de 1.000 cópias RNA/mL também é utilizado para avaliar a eficácia do tratamento (Flores, 2005).

Com base em sua heterogeneidade genética extensa, o HCV é dividido em 6 genótipos principais e pelo menos 80 subtipos. Os genótipos são distribuídos geograficamente. O genótipo predominante em pacientes com infecção de HCV crônica é o tipo 1. O método de escolha para genotipagem do HCV é o sequenciamento de regiões de seu genoma. Habitualmente, são avaliadas para este fim uma das seguintes regiões do RNA do HCV: região 5' não-codificante, E1 ou NS5B. Embora efetivo para a maioria dos casos, este método não

permite a identificação do subtipo em casos mais complexos e em pacientes com infecção por mais de um subtipo de HCV. Por estas razões, o método de sequenciamento, embora de maior complexidade, é o método escolhido para subtipagem do HCV.

8. Tecnologia de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAT)

Com o objetivo de promover o controle em níveis de segurança para o sangue e derivados, tem sido preconizada a pesquisa do RNA do HCV por meio do NAT. A OMS estabeleceu o primeiro padrão de referência para esses testes. Apesar de a técnica indicar aumento de segurança no uso de derivados de sangue, há registro de transmissão do HCV através da transfusão de concentrado de plaquetas feito a partir de sangue com teste de amplificação negativo (Brandão, 2001; Flores, 2005).

A utilização do NAT resulta em uma modificação nos métodos laboratoriais, principalmente pela identificação rápida diminuindo assim o período de janela imunológica, permitindo a descoberta da infecção do HCV entre 10 a 11 dias após a contaminação (Giachetti *et al.*, 2002; Speers, 2006). O NAT tornou-se uma importante ferramenta na pesquisa, por detectar a presença do vírus circulante e não a resposta do anticorpo para o vírus. É um teste de alta

sensibilidade e totalmente independente por confirmar infecções em sorologia de casos indeterminados. A necessidade de incorporação do NAT nos bancos de sangue é devida a sua habilidade de reduzir o período de janela imunológica entre a infecção e a descoberta (Giachett *et al.*, 2002; Green, 2005). Uma variedade de testes para qualificação e quantificação de RNA-HCV baseado em NAT estão sendo comercializados (Barbeau *et al.*, 2004).

A Portaria nº262/2002 do MS, de 5 de fevereiro de 2002, tornou obrigatório a inclusão dos testes NAT, em todas as amostras de sangue de doador. Com a implantação do NAT diminui-se o risco de transmissão HCV, por transfusões de hemocomponentes, aumentando a segurança transfusional (Nascimento, 2011). O teste ELISA é o principal exame realizado no país, pois detecta o paciente soro positivo para HCV por meio da pesquisa de anticorpos que combatem o vírus, mas o organismo leva algum tempo para produzi-los. Assim, a NAT estabelece eficácia no diagnóstico, reduzindo o período da janela imunológica do HCV de 89 dias para 12 ou 13 dias (Terrez-Speziale, 2003).

Essas técnicas começaram a ser utilizadas na rotina para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com HCV. Adicionalmente, iniciou-se a prática de várias técnicas da NAT: na área de triagem das doações de sangue, para detecção da infecção

no período que precede o desenvolvimento de anticorpos, durante a fase inicial da mesma, assim, detectando diretamente a presença de ácidos ribonucléicos no núcleo do vírus (Nascimento, 2011).

A cidade de Goiânia-Goiás-Brasil é uma das poucas capitais do país onde o teste já é realizado na rede particular. Para o Sistema Único de Saúde (SUS), está sendo desenvolvida uma metodologia nacional, que irá baratear os custos da NAT. Essa tecnologia foi desenvolvida há mais de treze anos e hoje é comum em países da Europa, Japão, Estados Unidos e Austrália (O Popular-GO, 2012).

9. Tratamento

O tratamento da hepatite C objetiva deter a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral, e está indicado para todos pacientes com forma aguda ou crônica da doença, que apresentam infecções ativas, detectada por RNA viral por meio de teste de PCR no sangue e lesões histológicas (Focaccia *et al.*, 2005 & Strauss, 2001). Os medicamentos disponíveis nos mais diversos esquemas em termos de doses, duração ou associações conseguem atingir os objetivos prepostos em menos da metade dos pacientes tratados. Sendo o Interferon (IFN) e a Ribavirina (RBV) os medicamentos distribuídos pelo SUS (Strauss, 2001).

Os interferons pertencem à superfamília das citocinas. Modulam a atividade de muitos componentes do sistema imunológico, aumentando a capacidade do organismo de combater agentes infecciosos. Já foram desenvolvidos novos interferons, chamados peguilados (PEG-IFN) (Acras *et al.*, 2004).

A ribavirina é um análogo de nucleotídeo purínico, com efeito virostático contra largo espectro de vírus. Seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos mas sugere-se que levem à inibição da RNA polimerase RNA-dependente e esgotamento do *pool* de guaninas (Acras *et al.*, 2004). O uso da terapia é aplicado de acordo com os genótipos do HCV. Nos genótipos 1, 4 e 5, é aplicado PEG-IFN- α -2A e/ou PEG-IFN- α -2B: subcutâneo por semana e RBV 1000 mg a 1200 mg/dia, via oral, durante 48 semanas. Os genótipos 2 e 3 é aplicado IFN convencional: subcutâneo por três dias por semana e RBV 800mg à 1000 mg/dia, via oral, durante 24 semanas (Focaccia *et al.*, 2005).

Os efeitos colaterais ao uso do IFN e RBV são severas, como a sensação gripal, febre intensa, fadiga intensa, anemia de padrão hemolítico, dores musculares e articulações, astenia intensa, cefaléia, distúrbios digestivos como náuseas e vômitos. Sintomas neuropsicológicos como a irritabilidade, desânimo, instabilidade emocional, depressão, entre outros (Conte, 2000b; Strauss, 2001).

10. Discussão

Brandão *et al.* (2001), discutem a sensibilidade dos métodos sorológicos e moleculares. Os testes sorológicos ELISA e RIBA são de alta sensibilidade e especificidade, porém, as técnicas moleculares são mais específicas, pois, determinam o genótipo do vírus e a carga viral, assim, definindo a duração do tratamento. Na última década houve grandes avanços no diagnóstico da hepatite C. Tendo uma progressiva melhora na sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para detecção de anticorpos contra o HCV, sendo possível identificarem pessoas infectadas com o vírus de maneira rápida. Também se observou notável progresso em relação à disponibilidade de testes industrializados para a detecção do RNA do HCV (Brandão *et al.*, 2001).

Focaccia *et al.* (2005), concluíram que o teste ELISA geração (I, II e III) é de fácil realização, de baixo custo e altamente específico, com uma sensibilidade aproximadamente de 97%. No entanto, Brandão *et al.* (2001), concluíram que, os testes de ELISA não detectam todos os indivíduos infectados com o HCV, devido à falta de padronização na produção de antígenos entre os vários fabricantes dos kits, fazendo com que haja uma variância nos resultados, principalmente em grupos com

baixo risco de infecção. Porém, o RIBA, identifica anticorpos e antígenos individuais e apresenta maior especificidade em relação aos testes para pesquisa do RNA viral, por serem de realização mais simples e de maior reprodutibilidade.

Giachetti *et al.* (2002), concluíram em seu estudo que, a relação estatística de especificidade do ensaio e a sensibilidade obtida pelo teste NAT, demonstra que há excelente discriminação entre as amostras positivas e negativas, sendo que sua especificidade e sensibilidade é maior ou igual a 99,5%, gerando uma segurança para ser utilizada em hemorrede. Sarrazin *et al.* (2006), verificaram que a tecnologia de qRT-PCR tem um grande potencial e é considerada a técnica de escolha para quantificação, pois é, altamente sensível para amplificar o RNA de interesse, sobretudo para HCV.

Diversos testes têm sido introduzidos recentemente pelos serviços de hemoterapia do Reino Unido para melhorar a segurança da transmissão horizontal. Soldan *et al.* (2005) demonstraram, na Europa após a introdução da NAT, que a frequência estimada dos doadores infectados durante o período de 1996 a 2003 foi de 1,66 / 0,80 / 0,14 por milhão para HBV, HCV e HIV respectivamente. Sendo que o risco de transmissão para HCV obteve queda de 95%. O uso atual de testes combinados para HIV de antígeno-anticorpo e NAT reduziu o risco estimado do HIV em 10%. Desde 1996, o

risco da infecção transmitida via transfusão de hemoderivados de HBV, de HCV e de HIV no Reino Unido foi diminuído devido à implantação da NAT, embora a redução absoluta no risco seja pequena. A vigilância de detecção de doadores no período da janela imunológica favorece a segurança na hemoterapia em relação às doenças transmitidas via horizontal, sobretudo para HCV.

11. Considerações Finais

A hepatite C é um problema significativo de saúde pública devido ao grande número de casos, onde atualmente 3% da população mundial estão infectadas pelo vírus. A maioria dos casos é assintomática, dificultando o diagnóstico, e consequentemente, podendo causar nos pacientes a cirrose ou o hepatocarcinoma.

A transmissão é por via parenteral, por meio de sangue e hemoderivados, usuários de drogas intravenosas, pacientes de hemodiálise, materiais cortante ou perfurante contaminados. Assim, em 1992, testes para identificação do anticorpo HCV foi disponibilizado nos bancos de sangue, aumentando a segurança para os receptores de sangue e hemoderivados. O diagnóstico é feito pela pesquisa de anticorpos anti-HCV por ELISA ou RIBA, em pacientes positivos,

a infecção crônica deve ser confirmada com a determinação sérica do RNA-HCV por PCR.

A transmissibilidade do HCV por hemoterápicos deve ser controlada com mais eficácia e seguir normas de biossegurança para os profissionais que manipulam os hemoterápicos. Adicionalmente, é importante implantar programas de qualidade nas hemorredes, abrangendo treinamentos

sistemáticos da equipe técnica e fiscalização constante por parte da vigilância epidemiológica quanto ao cumprimento das portarias do MS. Assim, recomenda-se o uso da NAT em serviços de hemoterapia, pois a mesma conseguirá diminuir os fatores de risco quanto à transmissão e contaminação pelo HCV por transfusões sanguíneas.

Referências Bibliográficas

Acra, RN *et al.* A taxa de resposta sustentada da hepatite C crônica ao tratamento com os diversos interferons-alfa e ribavirina distribuídos pelo governo brasileiro é semelhante à da literatura mundial. **ARQGA/1097**, 41(1): 3-9, 2004.

Afdhal, NH. The natural history of hepatitis C. **Seminars in Liver Disease**, 24(2): 3-8, 2004.

Al-Quaiz, MN *et al.* The natural history of hepatitis C virus infection. **Saudi Medical Journal**, 24(2): 567-570, 2004.

Alves, AV *et al.* Tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C com interferon- α e ribavirina: a experiência da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. **ARQGA/1089**, 40(4): 227-232, 2003.

Applied Biosystems. Taqman on-step RT-PCR, 2002.

Barbeau, JM *et al.* Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(12): 3739-3746, 2004.

Biancarelli, A. 2,4 milhões têm hepatite C sem saber. Folha de São Paulo, Caderno

Saúde, 21 de março. **Arquivos de Gastroenterologia**, 41(1): 3-9, 2004.

Brandão, ABM *et al.* Diagnóstico da hepatite C na prática médica: Revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 9(3): 1-14, 2001.

Busek, S and Oliveira, G. Molecular epidemiology of the hepatitis virus in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 31(1-2): 117-123, 2003.

Carrazzone, CFV *et al.* Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 26(2): 93-98, 2004.

Cavalheiro, NP *et al.* HCV serotypes in Brazilian patients. **International Journal of Infectious Diseases**, 6(3): 228-232, 2002.

Conte, VP. Hepatite crônica por vírus C. Parte 1. Considerais gerais. **ARQGA/942**, 37(3): 187-194, 2000a.

Conte, VP. Hepatite crônica por vírus C. Parte 2. Tratamento. **ARQGA/ 952**, 37(4): 235-242, 2000b.

Corrêa, MCJM. Hepatites por vírus, **In: Tratado de Clínica Médica**. Ed. Rocca. São Paulo, SP., 3:3873-3879, 2006.

Di, M *et al.* The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. **Hepatology**, 34(60):1193-1199, 2001.

Ferreira, CT & Silveira, TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(4): 473-487, 2004.

Flores, PP. 2005. Diagnóstico da infecção pelo vírus C da hepatite. **Revista Residência Médica**.

Focaccia, R *et al.* Hepatite C. **Tratado de infectologia**. Editora Atheneu, 3ª Edição, São Paulo, SP, p. 500, 2005.

Forns, X and Bukh, J. Methods for determining the hepatitis C virus genotype. **Viral Hepatitis Reviews**, 4: 1-19, 1998.

Gabert, J *et al.* Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. **Leukemia**, 17(12): 2318-2357, 2003.

Galizzi Filho, J & Teixeira, R. Aspectos críticos do tratamento atual da hepatite C, Editora Fiocruz. Belo Horizonte, p. 145-152, 2005.

Gaze, R. *et al.* Reflexões éticas acerca dos estudos de soroprevalência de hepatites virais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 52(3): 162-9, 2006.

Giachett, C *et al.* Highly sensitive multiplex assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(7):2408-2419, 2002.

Ginzinger, DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, 30:125-129, 2002.

Green, D M. Improving health care and laboratory medicine: the past, present, and future of molecular diagnostics. **Baylor University Medical Center Proceedings**, 18:125-129, 2005.

Gretch, DR *et al.* Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: Correlations and clinical implications. **Annals of Internal Medicine**, 123(5):321-329, 1995.

Henderson, DK. Managing occupational risks for hepatitis C transmission in the health care setting. **Clinical Microbiology Reviews**, 546-568, 2003.

Martins Filho, OA *et al.* Resposta imune durante a infecção pelo vírus da hepatite C, p. 31-40. In: Hepatite C. Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. Coopmed. Editora Fiocruz. Belo Horizonte, BH, p. 01-192, 2005.

Ministério da Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas – medicamentos excepcionais. Série A. Normas e manuais técnicos, 2002.

Moradpour, D *et al.* Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. **Journal of Virology**, 78(14):7400-7409, 2004.

Nascimento. AMB. O NAT no Laboratório de Biologia Molecular. 2011

Novais, CM and Alves, MP. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia**, 33:10-13, 2004

O Popular-GO (2012). Custo impede acesso a exame mais seguro.

Orgenics 2011. ImmunoComb II HCV. Disponível.

Passos, ADC. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. **Revista Medicina - Ribeirão Preto**, 36:30-36, 2003.

Pearlman, BL. Hepatitis C treatment update. **The American Journal of Medicine**, 117(5): 344-352, 2004.

Poli, MCC *et al.* Importância do PCR para hepatite C na triagem de doadores de sangue. **Revista Associação Médica Brasileira**, 49(3): 225-43, 2003.

Poynard, T. Treatment of hepatitis C virus: The first decade. **Seminars in Liver Disease**, 24(2):19-24, 2004.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. **Imunologia**. 5. Ed. Manole. São Paulo, 2002.

Sarrazin, C *et al.* Comparison of Conventional PCR with Real-Time PCR and Branched DNA-Based Assays for Hepatitis C Virus RNA Quantification and Clinical Significance for Genotypes 1 to 5. **Journal of Clinical Microbiology**, 729-737, 2006.

SBPC-TEXTOS (2006). Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Hepatite C.

Seef, L. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, 36:35-46, 2003.

Soldan, K. *et al.* Estimates of frequency of HBV, HCV and HIV infections donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996-2003. **Eurosurveillance**, 10(2):17-19, 2005.

Speers, DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. **The Clinical Biochemist Reviews**, 27:39-51, 2006.

Strauss, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34(1):69-82, 2001.

Teixeira, R & Velasco, HMA. Epidemiologia e impacto da infecção pelo vírus C na saúde pública. p. 1-12. In: Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. Teixeira, R., O. A. M. Filho, G. C. Oliveira. Coopmed. Editora Fiocruz. Belo Horizonte, BH, p. 01-192, 2005.

Terraz, R. Novo teste de Aids pode diminuir risco de infecção por transfusão. 2006.

Terrez-Speziale, AM. Hepatitis C: história natural y estado actual de su manejo. **Revista Médica de Patologia Clínica**, 50:179-189, 2003.

Trujillo, MKC *et al.* Experimental models for hepatitis C virus (HCV): New opportunities for combating hepatitis C. **Annals of Hepatology**, 3(2):54-62, 2004.

Valente, VB *et al.* Marcadores sorológicos das hepatites B e C em doadores de sangue do hemocentro de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(6):488-492, 2005.

Varella, D. Hepatite C. Disponível em: <http://www.drauziovarella.com.br>. 2006.

Veronesi, R & Focaccia, R. **Tratado de infectologia**. 3ª Edição. Editora Atheneu. São Paulo, SP, 2005.

Wesley, A & Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Seminars in Liver Diseases**, 20:1-16, 2000.