



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

CRISTIANNE SOUSA BEZERRA

**ESTUDO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C
ISOLADO DE PACIENTES ATENDIDOS EM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA,
CEARÁ**

FORTALEZA
2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

ESTUDO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C
ISOLADO DE PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL
DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota

Mestranda: Cristianne Sousa Bezerra

FORTALEZA
2006

B469c Bezerra, Cristianne Sousa
Estudo molecular do vírus da hepatite C isolado de
pacientes atendidos em hospital de referência em Fortaleza,
Ceará / Cristianne Sousa Bezerra. – Fortaleza, 2006.
134 f. : il.
Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.

1.Hepacivirus. 2.Reação em cadeia da polimerase.
3.Epidemiologia molecular. I.Título

CDD 616.3623

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**ESTUDO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C ISOLADO DE PACIENTES
ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ**

CRISTIANNE SOUSA BEZERRA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Fundação Oswaldo Cruz - Salvador - Bahia

Prof. Dr. José Milton de Castro Lima
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Luciano Bezerra Moreira
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Cristiane Cunha Frota (Orientadora)
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Universidade Federal do Ceará

*Aos meus amados pais,
Francisco Assis Bezerra e Maria do Carmo Sousa Bezerra,
pelo amor e apoio incondicionais
em todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota, pelo apoio, incentivo e ensinamentos, pela paciência, confiança e compreensão dispensados a mim durante todos os momentos da realização desse trabalho. Seu exemplo de profissionalismo e humildade muito contribuiu para a minha formação profissional e humana.

À coordenadora do Mestrado de Microbiologia Médica, Profa. Cibele Barreto Mano de Carvalho e a todos os professores do programa, pelos ensinamentos, sugestões e apoio dados durante o curso.

Aos amigos Marlos Gomes Martins, Marco Antônio Pereira de Lima e Janaína Leitão Vilar por estarem sempre dispostos a ouvir e ajudar, bem como por todo o auxílio e incentivo dispensados em todos os momentos, pelos ensinamentos e companheirismo, pelas dúvidas, sugestões e amizade sincera.

Aos amigos do laboratório Luana N. G. Costa Lima, Bráulio Matias de Carvalho, Roxeane Martins Monteiro, Isabela Cardia Neves, Munique Monteiro, Rafael Gomes Leitão e Jones Barbosa; pelo auxílio na execução dos experimentos, pela torcida declarada e pela oportunidade de aprender um pouco mais, ao mesmo tempo em que os ajudava.

A todos os amigos do setor de Microbiologia que muito apoiaram, incentivaram, ouviram, auxiliaram, sugeriram e compreenderam em diversas etapas da realização deste estudo.

Aos funcionários do setor de Microbiologia, Marta Maria de Vasconcelos, José Olavo Morais e Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues pela simpatia, paciência e disposição em ajudar demonstrados.

Ao Dr. José Milton de Castro Lima e à Dra. Elodie Bomfim Hyppolito, bem como a todos os estudantes de medicina, que compreenderam a finalidade deste trabalho e contribuíram de forma fundamental, durante todo o desenvolvimento do estudo.

À Profa. Adilina Silva da Cunha, responsável por toda a análise estatística dos resultados do trabalho.

À minha família, pelas palavras de apoio, confiança e incentivo nos momentos de dúvida, por compreenderem, ouvirem, orgulharem-se, defenderem, colaborarem, enfim, por serem grandes exemplos, meus alicerces, suporte fundamental ao alcance deste objetivo.

A todos os pacientes, que compreenderam a importância desta pesquisa e, prontamente, dispuseram-se a participar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.
(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O vírus da hepatite C é considerado como o principal agente causador de hepatite não-A, não-B e, desde sua descoberta em 1989, tem sido reconhecido como a principal causa de doença crônica do fígado em todo o mundo. O VHC possui um genoma de RNA de sentido positivo e é classificado como um flavivírus. O vírus apresenta considerável variabilidade em sua seqüência e as variantes do VHC podem ser divididas em seis genótipos principais (numerados de 1 a 6) e diversos subtipos. A distribuição dos genótipos varia tanto geograficamente, quanto entre os grupos de risco. Este estudo teve como objetivo analisar a distribuição dos genótipos do VHC entre pacientes atendidos em um hospital de referência em Fortaleza, Ceará. Cento e vinte pacientes com sorologia positiva para anti-VHC ou história clínica sugestiva de infecção pelo vírus foram estudados. O RNA viral foi extraído a partir do soro dos pacientes e a detecção molecular do vírus foi feita por PCR, utilizando iniciadores específicos para a região 5' não-codificadora do genoma viral. A genotipagem foi baseada em técnica de RFLP utilizando as enzimas de restrição *HaeIII*, *RsaI*, *MvaI* e *Hinfl*. Noventa e seis pacientes (80%) foram positivos no teste qualitativo para VHC. A média de idade desses pacientes foi de 44 anos. História clínica de cirurgia foi o fator de risco mais presente, seguido por transfusão sanguínea, DST, uso de drogas, tatuagem, diálise e exposição ocupacional. A relação entre o resultado do teste qualitativo e o uso de drogas apresentou significância estatística, com 96% dos usuários de drogas positivos para VHC. Não houve diferença significativa no resultado do teste qualitativo quando transfusões sanguíneas feitas antes ou depois de 1993 foram analisadas. Manifestações clínicas ou índices de ALT alterados também não foram preditivos de positividade para VHC. O genótipo 1 foi o mais prevalente na população estudada (46,9%), seguido pelos genótipos 3 (34,4%) e 2 (8,3%). O genótipo 4 viral foi detectado em um paciente. Em nove amostras não foi possível a genotipagem do VHC. Esses casos foram denominados indeterminados. Características epidemiológicas como idade, sexo, fatores de risco, índices de ALT e manifestações clínicas foram relacionadas com os diversos genótipos virais. A distribuição dos genótipos virais entre as categorias estudadas ocorreu de forma homogênea na maioria dos casos. Foi observada significância estatística apenas na relação entre genótipo e exposição ocupacional ao VHC, com predominância do genótipo 1 neste grupo de risco. Não foram observadas co-infecções com mais de um genótipo viral.

Palavras-chaves: Vírus da hepatite C, PCR, genotipagem, epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Hepatitis C virus is considered as the main causative agent of non-A non-B hepatitis and has been recognised as the major cause of chronic liver disease worldwide, since its discovery in 1989. It has a positive-sense RNA and belongs to the flavivirus family. The HCV shows considerable sequence variability and its variants can be divided into six main genotypes (numbered from 1 to 6) and several subtypes. The genotypes distribution varies from the geographic area and among risk groups. This study had the main aim to study HCV genotypes distribution in patients from a reference hospital in Fortaleza, Ceara. It was investigated a hundred and twenty patients with anti-HCV positive or clinical history suggesting virus infection. Viral RNA was extracted from patients serum and the virus molecular detection was made by PCR, using specific primers to the 5' non-coding region of viral genome. Genotyping was based in a RFLP technique, using the restriction enzymes *HaeIII*, *RsaI*, *MvaI* and *HinfI*. Ninety six patients (80%) were positive in the qualitative test for HCV. The mean age of these patients was 44 years old. Surgery clinical history was the most frequent risk factor, followed by blood transfusion, sexual transmitted disease, drugs use, tattoos, dialysis, and occupational exposure. The relation between qualitative test result and drug users showed statistical significance, with 96% of drugs users being positive for HCV. There was no significant difference in qualitative test result when we analysed blood transfusions done after or before the year 1993. Clinical symptoms and ALT levels also were not predictive of HCV positive result. Genotype 1 was the most prevalent in the studied population (46,9%), followed by genotype 3 (34,4%) and 2 (8,3%). There was also a molecular characterization of one patient with genotype 4 whereas nine samples were not HCV genotyped and were called as undetermined. The epidemiological characteristics such as age, gender, risk factors, ALT levels and clinical manifestations were related with viral genotypes. The HCV genotypes had a homogeneous distribution, in the majority of cases, among the different categories. A statistical significance was observed only when genotype 1 was related to HCV occupational exposure. Co-infections with more than one viral genotype were not observed.

Keywords: Hepatitis C virus, PCR, genotyping, molecular epidemiology.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE QUADROS	15
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 AS HEPATITES VIRAIS	18
1.2 A HEPATITE C	19
1.2.1 Aspectos Históricos	19
1.2.2 Classificação	20
1.2.3 Morfologia e Estrutura	21
1.2.4 Proteínas Virais	22
1.2.4.1 Proteínas Estruturais	22
A. Núcleo	22
B. Proteínas do Envelope	22
C. Proteína P7	23
1.2.4.2 Proteínas Não-Estruturais	23
A. NS2-3 autoprotease	23
B. Complexo NS3-4A	23
C. NS4B	24
D. NS5A	24
E. NS5B	24
1.2.5 Replicação Viral	24
1.2.6 Classificação Viral em Genótipos	25
1.2.7 Aspectos Clínicos e Patológicos	25
1.2.7.1 Hepatite Aguda	25
1.2.7.2 Hepatite Crônica	26
1.2.7.3 Resposta Imune à Infecção pelo VHC	26
1.2.8 Transmissão	27
1.2.9 Epidemiologia	28
1.2.10 Epidemiologia Molecular	29
1.2.11 Diagnóstico	30

1.2.11.1 Diagnóstico Sorológico	30
1.2.11.2 Diagnóstico por Cultura de Células	31
1.2.11.3 Diagnóstico Qualitativo do VHC	31
1.2.11.4 Genotipagem Viral	32
1.2.11.5 Diagnóstico Quantitativo do VHC	33
1.2.12 Prevenção e Tratamento	34
1.3 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	35
2. OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO	37
3.1.1 Local do Estudo	37
3.1.2 Critérios de Inclusão	37
3.1.3 Critérios de Exclusão	37
3.2 COLETA DE AMOSTRAS E ENTREVISTA	38
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	38
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA	39
3.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA	41
3.6 AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL	42
3.6.1 Primeira PCR	42
3.6.2 Nested PCR	42
3.7 VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DE PCR	43
3.8 RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	44
3.9 ANÁLISE DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO	45
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
4. RESULTADOS	48
4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO	48
4.2 DIAGNÓSTICO QUALITATIVO	49
4.3 GENOTIPAGEM	54
5. DISCUSSÃO	61
5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS	62
5.2 FATORES DE RISCO	65
5.3 MARCADORES SOROLÓGICOS	70

5.4 GENÓTIPOS	72
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	94
ANEXO I – PROTOCOLOS LABORATORIAIS	95
ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO E QUESTIONÁRIO	109
ANEXO III – DECLARAÇÕES	113
ANEXO IV – PUBLICAÇÕES	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do vírus da hepatite C	21
Figura 2	Organização do genoma do VHC, mostrando as regiões não-traduzidas 5' e 3', a “ <i>single open reading frame</i> ” e os seus sítios de clivagem	22
Figura 3	Distribuição do VHC no mundo	28
Figura 4	Distribuição mundial dos genótipos do VHC	29
Figura 5	Distribuição dos genótipos do VHC no Brasil	30
Figura 6	Fluxograma geral da metodologia experimental	39
Figura 7	Cabines de biossegurança contendo os materiais organizados para submissão à luz ultravioleta antes do início dos procedimentos experimentais	40
Figura 8	Seqüência do genoma viral amplificada	44
Figura 9	Tamanho esperado dos fragmentos de nested PCR digeridos com as enzimas <i>HaeIII</i> e <i>RsaI</i>	46
Figura 10	Tamanho esperado dos fragmentos de nested PCR digeridos com as enzimas <i>MvaI</i> e <i>Hinfi</i>	46
Figura 11	Distribuição dos indivíduos da pesquisa segundo o nível de escolaridade	48
Figura 12	Distribuição dos fatores de risco para VHC entre os sexos	49
Figura 13	Gel de agarose 1,2% mostrando bandas de 251 pb	50
Figura 14	Distribuição dos 96 pacientes com qualitativo positivo para VHC segundo a faixa etária	51
Figura 15	Distribuição do resultado do teste qualitativo entre os 25 indivíduos usuários de drogas	51
Figura 16	Relação entre o resultado do teste PCR qualitativo para VHC e os níveis de transaminases	53
Figura 17	Relação entre o resultado do teste qualitativo e a pesquisa de anticorpo anti-VHC do parceiro	54
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose Metaphor 4%, mostrando o padrão das bandas que caracterizam os diversos genótipos do VHC	55
Figura 19	Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4%, evidenciando o padrão de genótipo 1	55

- Figura 20** Distribuição dos pacientes do estudo de acordo com o genótipo e faixa etária 57
- Figura 21** Distribuição dos genótipos tipo 1 e não-1 e tipo 3 e não-3 de acordo com a faixa etária 58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Iniciadores de primeira PCR	42
Quadro 2	Iniciadores da nested PCR	43
Quadro 3	Sítios de corte das enzimas empregadas na genotipagem do VHC	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Marcadores sorológicos pesquisados entre os 120 pacientes estudados	49
Tabela 2	Distribuição entre os sexos do resultado do teste qualitativo para VHC	50
Tabela 3	Relação entre os fatores de risco para infecção pelo VHC e o resultado do teste qualitativo	52
Tabela 4	Distribuição dos genótipos do VHC entre os sexos	56
Tabela 5	Relação entre os fatores de risco para infecção pelo VHC e os genótipos virais	59
Tabela 6	Relação entre sintomatologia e genótipos do VHC	60
Tabela 7	Relação entre níveis de transaminases e genótipos do VHC	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos
DST	Doença sexualmente transmissível
DTT	Ditiotreitol
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNANB	Hepatite não-A não-B
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídeo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Vírus</i>
NS	Não-estrutural
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Par de base
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RM1	Reação de digestão enzimática 1
RM2	Reação de digestão enzimática 2
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa
TAE	Tris-acetato-EDTA
VHA	Vírus da hepatite A
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHD	Vírus da hepatite D
VHE	Vírus da hepatite E

1. INTRODUÇÃO

1.1 AS HEPATITES VIRAIS

A maioria das hepatites virais humanas é causada por cinco tipos de vírus, sendo eles denominados de vírus da hepatite A, B, C, D ou E. As características clínicas da hepatite aguda, causada por estes vírus, são semelhantes, de modo que é necessária a realização de diferentes testes diagnósticos para que se determine o agente etiológico causador da doença (MAST e ALTER, 1993).

A hepatite A é causada pelo vírus da hepatite A (VHA). Caracteriza-se, na maioria das vezes, por uma doença branda de caráter auto-limitado. Não há relatos de infecções crônicas por este vírus e a mortalidade é rara. A ingestão oral é a principal rota de transmissão do VHA, sendo as fezes de pessoas contaminadas consideradas como a principal fonte de infecção, podendo conter mais que 10^8 vírions infecciosos por mL. Caracteriza-se como fonte primária do vírus. A hepatite A é mais freqüente em países em desenvolvimento, devido a baixas condições sócio-econômicas e de higiene (LEDNAR *et al.*, 1985 e VILLAREJOS *et al.*, 1982).

De modo diferente ao VHA, o vírus da hepatite B (VHB) é o maior causador de hepatite aguda e crônica em todo o mundo, estimando-se que haja 300 a 350 milhões de pessoas infectadas por ele. A doença apresenta-se de forma mais severa que a apresentada pelo VHA, podendo evoluir para uma infecção crônica, passível de causar cirrose ou carcinoma hepatocelular. O risco de desenvolvimento de doença crônica varia inversamente à idade do indivíduo ao adquirir a infecção.

O VHB é transmitido por exposição de mucosas a fluidos infecciosos, contudo, apesar de muitos fluidos corporais apresentarem o antígeno de superfície do VHB (HBsAg), apenas soro, sêmen, leite materno e saliva demonstraram ser infecciosos. A transmissão também pode ocorrer por via percutânea, tais como por transfusão sangüínea, compartilhamento de agulhas durante o uso de drogas injetáveis, hemodiálise e acupuntura. As transmissões sexual e vertical são possíveis, desde que haja exposição de membrana mucosa a sangue ou fluidos corporais infecciosos (MCMAHON *et al.*, 1985; BOND *et al.*, 1981; ALTER *et al.*, 1977 e BANCROFT *et al.*, 1977).

O vírus da hepatite D (VHD) é um vírus defectivo, incapaz de ser replicado sem auxílio de outro vírus, ocorrendo sua infecção somente em associação com VHB. Deste modo, pessoas com co-infecção VHB-VHD podem apresentar doença aguda grave e um maior risco de ocorrência de hepatite fulminante que aquelas infectadas somente com VHB. O modo de transmissão dos dois vírus é semelhante, contudo há baixa transmissão sexual e rara

ocorrência de transmissão vertical. A distribuição mundial do VHD encontra-se, na maioria das vezes, associada a áreas onde a prevalência de infecção crônica pelo VHB é alta contudo observa-se alguns países com alta prevalência de VHB onde a ocorrência de infecções por VHD é incomum (CAREDDA *et al.*, 1987; HADLER *et al.*, 1984; RIZZETTO, 1983 e PURCELL e GERIN, 1983).

O vírus da hepatite E é a principal causa de hepatite não-A-não-B (HNANB) de origem entérica em todo o mundo. É transmitido oralmente, através da ingestão de alimentos ou líquidos contaminados. Ocorre, freqüentemente, em grandes surtos e desconhece-se seu reservatório nos períodos entre as epidemias, sendo a ocorrência de surtos associada a países com condições sanitárias inadequadas (BRADLEY *et al.*, 1992; BALAYAN *et al.*, 1983 e KHUROO *et al.*, 1983).

O vírus da hepatite C (VHC) foi descoberto somente em 1989 e mostrou-se como a principal causa de hepatite não-A-não-B de origem parenteral (KUO *et al.*, 1989). Uma de suas mais importantes características clínicas é a alta capacidade de causar doença crônica nos pacientes infectados, podendo evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. Devido a essa particularidade, a hepatite C chega a ser considerada por alguns estudiosos como a “Doença do século XXI”, causando preocupação em toda a comunidade médica e científica.

1.2 A HEPATITE C

1.2.1 Aspectos Históricos

A descoberta do vírus da hepatite C (VHC) ocorreu somente em 1989, após extensa pesquisa desenvolvida para encontrar as causas da hepatite pós-transfusional (CHOO *et al.*, 1989). A suspeita de existência do VHC surgiu nos anos 70, quando foram relatados vários casos de indivíduos infectados com um agente infeccioso diferente dos vírus das hepatites A e B (VHA e VHB), que causava hepatite crônica e era freqüentemente transmitido por sangue e produtos sanguíneos (ALTER *et al.*, 1975 e PRINCE *et al.*, 1974), sendo o diagnóstico de hepatite não-A-não-B feito por exclusão de VHA, VHB e outras causas infecciosas de hepatite.

O progresso das pesquisas também foi atrasado pela dificuldade de cultivo do agente em cultura de células ou órgãos. Todavia, a infecção do VHC em chimpanzés possibilitou sua caracterização, bem como, providenciou estoques do agente infeccioso que foram necessários para a clonagem e análise da seqüência do mesmo. Bradley e colaboradores (1979) e Bradley e Maynard (1986) sugeriram que o agente causador da hepatite não-A não-B era um pequeno vírus envelopado, pois ele apresentava a capacidade de atravessar filtros de 80 nm e era inativado por solventes lipídicos, como clorofórmio.

Os estudos de notação do genoma do VHC tiveram início a partir da extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) originados a partir de ultracentrifugação de plasma de chimpanzé, contendo altos títulos do agente infeccioso (10^6 unidades infecciosas/mL). O ácido nucleico obtido foi transcrito reversamente e o DNA resultante foi clonado no bacteriófago λ gt11 e expresso em *Escherichia coli*, dando origem a uma proteína imunoreativa (denominada 5-1-1) que era específica para o agente da hepatite não-A-não-B, HCV (CHOO *et al.*, 1989). Este clone não mostrava similaridade com nenhuma seqüência genômica humana ou de *Escherichia coli* e produzia uma proteína que era relacionada a soros de pacientes com HNANB, mas que não se relacionava a soros de indivíduos com hepatite por outras etiologias (KUO *et al.*, 1989).

Finalmente, em 1991, Choo e colaboradores conseguiram identificar a seqüência genômica completa do VHC e, a partir de então, foi possível desenhar sondas de hibridização e iniciadores para amplificação do genoma viral por PCR. Ainda em 1991, foram criados clones específicos para VHC que foram utilizados na produção de ensaios para pesquisar anticorpos contra o vírus, permitindo, desta forma, que a triagem de doadores de sangue para hepatite C fosse feita em todo o mundo (CHIBA *et al.*, 1991 e KUO *et al.*, 1989).

1.2.2 Classificação

A classificação do VHC em um determinado grupo constituiu um problema desde sua descoberta, pois o vírus mostra semelhança, em relação à organização genética, com os pestivírus e os flavivírus.

Os genomas dos pestivírus e flavivírus codificam uma poliproteína, contêm uma região 5' não-codificadora, uma *open reading frame* (região aberta de leitura, ORF), uma região 3' não-codificadora e têm tamanho semelhante. Ademais, todos possuem envelope viral formado por uma glicoproteína (E1) e, nos três tipos virais, a clivagem da poliproteína ocorre por uma combinação de proteases do hospedeiro e do vírus (CHAN *et al.*, 1992).

Estudo comparativo entre a seqüência do VHC e a seqüência de outros vírus mostra pouca homologia, exceto na região 5' final do genoma viral, sendo essa região bem similar à dos pestivírus. Entretanto, outras características do VHC (hidropaticidade do polipeptídeo do VHC) o tornam mais próximo do grupo dos flavivírus. Desta forma, o VHC foi classificado em um gênero distinto dentro da família Flaviviridae, sendo considerado extremamente relacionado aos pestivírus e flavivírus (MORADPOUR e BLUM, 2004 e KURSTAK *et al.*, 1995).

1.2.3 Morfologia e Estrutura

Estruturalmente, o vírus da hepatite C é um vírus envelopado cujo genoma é protegido por um nucleocapsídeo interno, sendo o diâmetro da partícula viral de 30 a 60 nm (Figura 1). O capsídeo viral é formado pela proteína C, enquanto que o envelope viral é constituído pelas glicoproteínas E1 e E2 (ROINGEARD *et al.*, 2004 e BRÉCHOT, 1996).

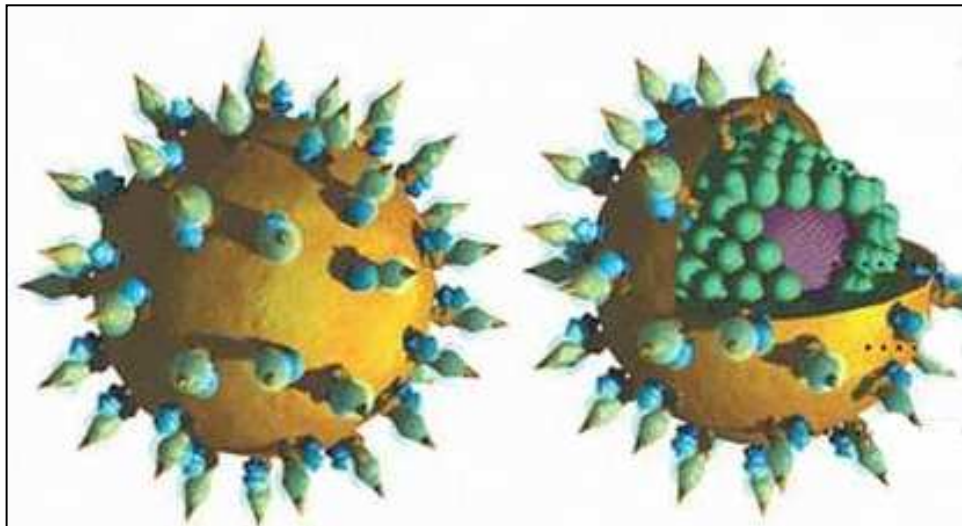


Figura 1: Estrutura do vírus da hepatite C .

Fonte: http://www.prn.org/images/prn_nb_cntnt_images/models/hcv_model.png

O genoma do VHC é constituído por um filamento positivo de RNA com comprimento de cerca de 9,6 kilobases do qual cerca de 96% é traduzido (Figura 2). A região 5' não codificadora tem entre 341 e 344 bases de tamanho, não se assemelhando à dos *Flavivirus*, por ser mais longa e não possuir homologias entre suas seqüências. Essa região é bem conservada entre os isolados do VHC, tendo similaridade de 98 a 99% entre vírus do mesmo tipo e de 92 a 98% entre vírus do mesmo grupo (ROSENBERG, 2001 e MATSUURA e MIYAMURA, 1993). Essa seção do genoma ainda contém um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES), essencial para a tradução *cap*-independente do RNA viral (MORADPOUR e BLUM, 2004).

A região 3' não codificadora é pequena, contendo cerca de 25 a 30 nucleotídeos seguida por uma seqüência variável de resíduos de uracila e por uma seqüência conservada de 98 nucleotídeos, sendo ela essencial para a replicação viral (ROINGEARD *et al.*, 2004 e MORADPOUR e BLUM, 2004).



Figura 2: Organização do genoma do VHC, mostrando as regiões não-traduzidas 5' e 3', a “single open reading frame” e os seus sítios de clivagem. Fonte: Roingeard *et al.*, 2004.

1.2.4 Proteínas Virais

O genoma do VHC codifica no mínimo 9 proteínas, das quais três são estruturais (C, E1 e E2) e seis são não-estruturais (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b). A maioria das informações acerca da função e atividade enzimática das proteínas não-estruturais é obtida por expressão das seqüências de DNA correspondentes às diferentes proteínas ou por observação direta das distribuições celulares e propriedades das proteínas do VHC detectadas no fígado ou plasma *in vivo* (ROINGEARD *et al.*, 2004; MORADPOUR e BLUM, 2004 e DUBUISSON *et al.*, 2002).

1.2.4.1 Proteínas Estruturais

A. Núcleo

A primeira proteína estrutural codificada pela ORF do VHC é a mais básica, chamada de proteína do core ligante-RNA que, provavelmente, forma o nucleocapsídeo viral. O 5' final do core codifica uma seqüência que pode fazer parte da IRES, região de ligação do genoma viral ao ribossomo (ROINGEARD *et al.*, 2004 e ROSENBERG, 2001).

Sabe-se que a proteína do core tem um papel adicional na modulação da resposta do hospedeiro à infecção pelo VHC por agir sobre a expressão gênica. Por fim, Moradpour e Blum (2004) sugerem que esta proteína pode estar envolvida no controle entre a síntese da poliproteína viral e a subsequente replicação do RNA viral.

B. Proteínas do Envelope

As duas proteínas do envelope E1 e E2 são liberadas a partir da poliproteína por clivagem por proteases do hospedeiro. Elas são consideradas componentes importantes do envelope viral, estando envolvidas na ligação a receptores e na fusão do envelope. São manose-glicosiladas, o que sugere que elas são retidas no retículo endoplasmático rugoso ou

no complexo de Golgi (ROINGEARD *et al.*, 2004; MORADPOUR e BLUM, 2004; DUBUISSON *et al.*, 2002 e ROSENBERG, 2001).

Duas moléculas do hospedeiro humano foram descritas como sendo receptores para VHC. São elas: CD81, que interage com E2, e o receptor para LDL (lipoproteína de baixa densidade), que se liga a componentes desconhecidos do envelope viral (ROINGEARD *et al.*, 2004; MORADPOUR e BLUM, 2004; DUBUISSON *et al.*, 2002 e ROSENBERG, 2001).

A glicoproteína E2 contém uma região hipervariável envolvida na evasão da resposta imune do hospedeiro e também parece ser responsável pela inibição da atividade de um tipo de RNase por um mecanismo de inibição complexo e ainda não muito claro (TAYLOR *et al.*, 2001 e FARCI e PURCELL, 2000).

C. Proteína P7

P7 é um polipeptídeo de 63 aminoácidos que é incompletamente clivado a partir de E2. Esse peptídeo tem dois domínios transmembranares conectados por um pequeno segmento hidrofílico. Segundo Moradpour e Blum (2004) P7 teria se apresentado como capaz de formar hexâmeros e possuidor de atividade em canais de íons. Deste modo, P7 pode ter um importante papel na maturação e liberação da partícula viral (ROINGEARD *et al.*, 2004; ROSENBERG, 2001).

1.2.4.2 Proteínas Não-Estruturais

A. NS2-3 autoprotease

Responsável pela clivagem da junção NS2/NS3 da poliproteína viral. A protease é formada pela proteína NS2 e a porção cis N-terminal da proteína NS3. A atividade de protease dessa proteína é essencial para que ocorra a replicação completa do VHC *in vivo*, contudo esta enzima torna-se dispensável para a replicação do VHC *in vitro* (ROINGEARD *et al.*, 2004; MORADPOUR e BLUM, 2004 e DUBUISSON *et al.*, 2002).

B. Complexo NS3-4A

Uma serina protease específica (NS3) localizada na porção N-terminal da NS3 é responsável pelos eventos de clivagem que ocorrem na porção não-estrutural da poliproteína. Ademais, um domínio NTPase/RNA helicase é encontrado nos dois terços da porção C terminal de NS3 (ROINGEARD *et al.*, 2004; MORADPOUR e BLUM, 2004 e DUBUISSON *et al.*, 2002). A helicase é requerida para a replicação viral em chimpanzés. Rosenberg e

colaboradores (2001) propõem que ela funcione removendo regiões de estrutura secundária para que a RNA polimerase RNA-dependente possa fazer a leitura da fita.

O polipeptídeo NS4A funciona como um cofator para a serina protease NS3 e é incorporado como um componente integral no core (ROINGEARD *et al.*, 2004 e DUBUISSON *et al.*, 2002).

C. NS4B

NS4B é a proteína viral do VHC menos caracterizada, entretanto, recentemente, foi sugerido que ela seja responsável por induzir a alteração nas membranas celulares denominada de “teia membranosa” (ROINGEARD *et al.*, 2004; MORADPOUR e BLUM, 2004 e DUBUISSON *et al.*, 2002).

D. NS5A

NS5A é uma fosfoproteína de estrutura e função desconhecida. Tem atraído atenção especial devido ao seu potencial papel na modulação da resposta ao interferon (MORADPOUR e BLUM, 2004; ROINGEARD *et al.*, 2004).

E. NS5B

NS5B é a RNA polimerase RNA-dependente viral, responsável por toda a replicação do material genético viral, sendo este empacotado para dar origem a novos vírions. Ela inicia a replicação preferencialmente pela porção 3’ do genoma viral (MORADPOUR e BLUM, 2004 e DEMARINI *et al.*, 2003).

1.2.5 Replicação Viral

A replicação viral tem sido estudada baseando-se na forma de replicação de outros flavivírus (TOMASSINI *et al.*, 2003) ou no estudo com linhagens de células hepáticas humanas (ROSENBERG, 2001).

Os mecanismos de interação do vírus com a célula hospedeira não estão bem estabelecidos devido à falta de modelos de cultura celular eficientes que possibilitem esse estudo. Acredita-se, que a membrana do VHC é originada a partir da membrana do retículo endoplasmático do hospedeiro e que a proteína E1 funcione como proteína de fusão do envelope com a membrana do hospedeiro durante a infecção. De modo semelhante, a glicoproteína E2 é a responsável pela ligação a receptores celulares do hospedeiro (TELLINGHUISEN e RICE, 2002 e DUBUISSON *et al.*, 2002).

A replicação do vírus dentro da célula ocorre através da ligação de suas proteínas não estruturais à membrana do retículo endoplasmático. Esse mecanismo forma um complexo de replicação que otimiza o processo de produção de novas partículas virais, protegendo-as da degradação intracelular. De acordo com Moradpour e colaboradores (2003), a formação desse complexo de replicação é responsável pela alteração na conformação das membranas do retículo endoplasmático da célula infectada, a qual é denominada “teia membranosa”. A RNA-polimerase-RNA-dependente do VHC mostra-se suficiente para iniciação da transcrição do RNA viral, mesmo sem a formação do complexo de replicação (DEMARINI *et al.*, 2003), no entanto, Moradpour e colaboradores (2004) mostraram que a associação da RNA polimerase viral às membranas é essencial para a replicação do ácido nucléico do vírus. E, finalmente, a liberação das partículas virais recém-formadas ocorre por exocitose, estando os vírions dentro de vesículas produzidas pelo retículo endoplasmático (ROSENBERG, 2001).

1.2.6 Classificação Viral em Genótipos

A replicação do VHC mediada pela RNA-polimerase-RNA-dependente é muito propensa a erro e gera mutações em uma taxa estimada de 10^{-5} por nucleotídeo por replicação. Esta alta taxa de mutação é a principal fonte de diversidade viral (STUMPF e PYBUS, 2002), sendo, portanto, proposto um esquema de classificação do VHC em genótipos e subtipos baseado em análises filogenéticas moleculares de seqüências virais. Os genótipos propostos são seis (1, 2, 3, 4, 5 e 6), sendo cada genótipo filogeneticamente subdividido dentro de um número de subtipos nomeados alfabeticamente, de acordo com a ordem de descoberta. Já foram relatados mais de 50 subtipos, sendo esses normalmente identificados por análise das seqüências dos genes para as proteínas E1 e NS5b (STUMPF e PYBUS, 2002 e SIMMONDS *et al.*, 1993). A heterogeneidade genética do VHC permite, ainda, que este apresente quasispécies (vírus com genomas muito relacionados, mas com pequenas diferenças na seqüência de nucleotídeos) (UEDA *et al.*, 2004).

A determinação do genótipo também é importante para que se possa identificar a fonte da infecção viral. Para tal, o genótipo do paciente é comparado com o genótipo das possíveis fontes de infecção (transmissão sexual, genótipo da mãe, etc.) (SCHRÖTER *et al.*, 2003; BRÉCHOT, 1996).

1.2.7 Aspectos clínicos e patológicos

1.2.7.1 Hepatite Aguda

Freqüentemente, a exposição percutânea ao VHC resulta em uma infecção assintomática (não associada a icterícia) na qual a maioria das pessoas se torna portador

crônico do vírus. Esses achados contrastam com o fato de que poucos adultos infectados com hepatite B se tornam cronicamente infectados. O período, a partir da exposição até o desenvolvimento da hepatite, tem sido medido e avaliado em um grande número de investigações de hepatite pós-transfusional. A maioria dos estudos apresentaram um intervalo de oito semanas até o desenvolvimento de testes de função hepática anormais, entretanto, a viremia pode ser detectada mais cedo (KOHARA, 2000 e PAWLOTSKY *et al.*, 1999).

Somente 5% dos indivíduos com infecção aguda pelo VHC apresentam doença sintomática, contudo, em alguns casos, a doença pode ser grave. A hepatite C é muito raramente associada a casos de falência hepática fulminante (MUTIMER *et al.*, 1995). Clinicamente, a hepatite causada pelo VHC é indistinguível daquela causada por outros vírus da hepatite. O paciente pode apresentar icterícia, todavia a maioria dos sintomas são inespecíficos, como fadiga, anorexia e náusea (KOHARA, 2000).

A viremia pode ser detectada por PCR nos primeiros estágios da hepatite aguda, aperecendo, quase que ao mesmo tempo, os níveis anormais de transaminases (indicadores de função hepática alterada). Em oposição, a soroconversão para o anticorpo pode demorar muitas semanas ou até meses para ocorrer (PAWLOTSKY *et al.*, 1999).

1.2.7.2 Hepatite Crônica

A freqüência de infecção crônica seguida à exposição ao VHC é alta, no entanto, existem dificuldades em estimar um percentual preciso, principalmente devido ao fato da doença apresentar-se, na maioria dos casos, assintomática (KOHARA, 2000).

Muitos indivíduos infectados através de transfusão sangüínea e hemofílicos são expostos repetidamente ao VHC, apresentando alta taxa de infecção persistente associada à doença ativa do fígado. Em contraste, baixos índices de cronicidade e doença progressiva mais lenta são observados em indivíduos com menor exposição ao VHC (MEISEL *et al.*, 1995).

A infecção persistente pelo VHC é freqüentemente associada à hepatite persistente e progressiva. Além disso, indivíduos infectados cronicamente apresentam níveis de transaminases constantes ou flutuantes e são virêmicos. Contudo, tem se encontrado dificuldade em relacionar o nível de viremia do indivíduo à severidade da doença e alguns estudos falham ao tentar fazer essa associação (KOHARA, 2000 e BRECHOT, 1997).

1.2.7.3 Resposta Imune à Infecção pelo VHC

A infecção pelo VHC ativa tanto a resposta imune humoral quanto a celular. A reatividade de anticorpos a algumas proteínas do VHC é detectada na maioria dos indivíduos

infectados; entretanto, a resposta é constantemente variável e fraca. Portanto, uma elevada resposta de produção de anticorpos não necessariamente indica resposta protetora. Em indivíduos que tiveram *clearence* viral, foi observado uma menor resposta de anticorpos quando comparados a indivíduos virêmicos (SALLIE, 2004 e DHALIWAL *et al.*, 1996).

De modo contrário à resposta humoral, uma elevada resposta imune celular ao VHC é encontrada em indivíduos infectados. As respostas proliferativas são mais frequentemente associadas a indivíduos que tinham tido um *clearence*, sugerindo que a resposta imune celular é importante no controle da replicação do vírus *in vivo*. Todavia, linfócitos T citotóxicos são importantes tanto para o controle da infecção pelo VHC quanto na patogênese da doença hepática (SALLIE, 2004 e KOHARA, 2000).

1.2.8 Transmissão

O VHC pode ser transmitido em qualquer situação em que sangue infectado é transferido entre indivíduos. Também está associado à transmissão através de transfusões sanguíneas quando ainda não se fazia pesquisa de anti-VHC nos bancos de sangue (KIM, 2002). Outras formas de transmissão associadas ao vírus são uso de drogas intravenosas, tatuagens e prática de *body-piercing* (HELLARD *et al.*, 2003 e KIM, 2002).

Frequentemente relata-se a associação do VHC ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), pois os dois vírus apresentam vias de transmissão semelhantes. Um estudo realizado no Brasil mostrou que em um grupo de pacientes com HIV, 17,7% são co-infectados pelo VHC (MENDES-CORREA *et al.*, 2001), sendo observado que a carga viral do VHC é maior quando há co-infecção (MATTHEWS-GREER *et al.*, 2001).

A transmissão sexual do VHC ainda não está bem esclarecida, havendo controvérsias quanto a esse aspecto em diversos estudos apresentados (GROSS, 2001; STROFOLINI *et al.*, 2001; WEJSTAL, 1999 e DIAGO *et al.*, 1996). Uma pesquisa mostrou uma baixa prevalência de mulheres infectadas pelos maridos e ainda levanta-se a dúvida se esta infecção teria ocorrido realmente por transmissão sexual ou por exposição aos mesmos fatores de risco (STROFOLINI *et al.*, 2001 e DIAGO *et al.*, 1996).

Outras pesquisas mostraram baixo número de RNA viral em esperma e secreções cérvico-vaginais de pessoas infectadas pelo VHC (BÉLEC *et al.*, 2003 e MESEGUER *et al.*, 2002). Relata-se que a transmissão intrafamiliar por contato sexual, ou não-sexual, se daria por compartilhamento de instrumentos perfuro-cortantes não descartáveis (MESEGUER *et al.*, 2002).

A transmissão vertical é possível durante o momento do parto, pois há riscos de contato sanguíneo entre a mãe infectada e a criança, mas esta taxa de transmissão é

relativamente baixa e está associada a altos níveis virais maternos (BATALLAN *et al.*, 2003). O comportamento do vírus em crianças é descrito como bem menos grave que o comportamento viral observado em adultos, tendendo à cura, sendo as crianças assintomáticas e tendo exames clínicos normais (BOST-BRU, 1999).

1.2.9 Epidemiologia

Estima-se que mais de 170 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo VHC (LAUER, 2001), sendo a prevalência viral bem variável entre as várias partes do mundo (**Figura 3**).

O vírus da hepatite C (VHC) é o principal causador de hepatite não-A não-B transmitida via parenteral. A prevalência mundial de VHC é de 0,2 a 2% em doadores de sangue e de até 80% em usuários de drogas intravenosas (LAUER, 2001).

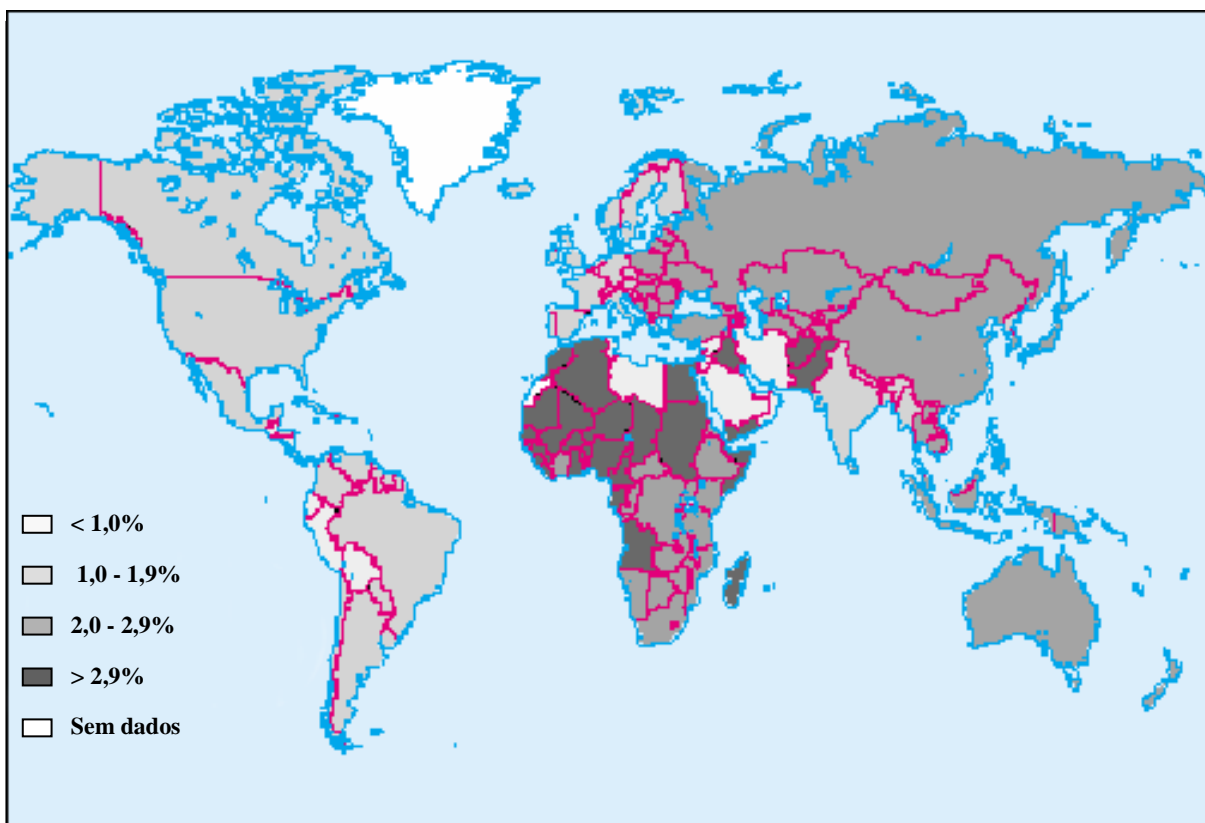


Figura 3: Distribuição do VHC no mundo. Fonte: Perz *et al.*, 2004.

Segundo Shepard e colaboradores (2005) a prevalência do VHC no Brasil é de 1,1%. Essa prevalência é baseada na investigação de pacientes positivos para o VHC em bancos de sangue, contudo este dado não é preciso, pois somente uma pequena parte da população brasileira é doadora de sangue e se submete a este procedimento. Desta forma esse dado de prevalência pode estar mascarando uma possível prevalência maior da hepatite C no

Brasil. Entretanto, estudo realizado por Paltanin e Reiche (2002), também em bancos de sangue brasileiros, mostrou uma prevalência de positividade para o VHC de 0,9%, semelhante ao apresentado por Shepard.

1.2.10 Epidemiologia molecular

Os estudos da epidemiologia molecular do vírus são importantes para que sejam identificados os fatores que possam influenciar na transmissão e progressão da doença, bem como, para que seja esclarecido sobre a origem dos diversos genótipos do vírus no mundo (**Figura 4**).

Considerando-se que estudos dessa natureza são pouco relatados no Brasil, é necessário que se delineie o perfil da genotipagem do VHC, visto que existe uma relação bem estabelecida entre o genótipo viral e a resposta ao tratamento. Também são realizados estudos com o objetivo de relacionar a forma de transmissão do vírus ao genótipo predominante entre diferentes populações de risco. Nos Estados Unidos, o genótipo 1a é o mais presente entre usuários de drogas intravenosas (ROSEN *et al.*, 1999). Enquanto que, na Itália, os genótipos prevalentes neste mesmo grupo de risco são os genótipos 1a e 3a (SILINI *et al.*, 1995b).

No Brasil, os genótipos 1, 2 e 3 encontram-se bem distribuídos nas diversas regiões do país, com ocorrência rara do genótipo 4 em alguns estados da região sudeste (CAMPIOTTO *et al.*, 2005 e OLIVEIRA *et al.*, 1999). (**Figura 5**)



Figura 4: Distribuição mundial dos genótipos do VHC. Fonte: Webster *et al.*, 2000.

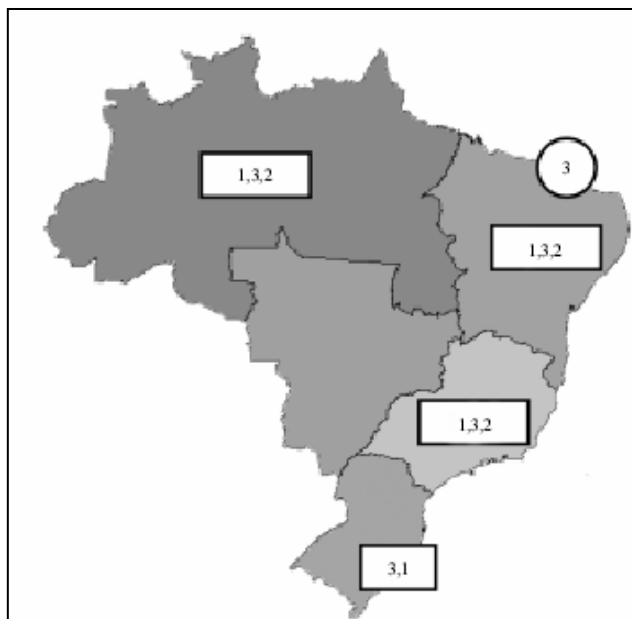


Figura 5: Distribuição dos genótipos do VHC no Brasil. Segundo Busek e Oliveira (2003).

1.2.11 Diagnóstico

1.2.11.1 Diagnóstico Sorológico

A reatividade de anticorpos pode ser detectada para uma grande variedade de epítomos virais, correspondendo tanto a proteínas estruturais como proteínas não-estruturais do VHC (STRAUSS, 2001). Testes ELISA são fáceis de executar e baratos. Acredita-se que a sensibilidade do *screening* de pacientes realizado por esse teste varie de 98 a 100%. Um dos problemas desta técnica é a possibilidade de resultados falsamente negativos devido ao período de janela imunológica necessário ao aparecimento dos anticorpos. Da mesma forma, indivíduos imunocomprometidos também têm uma maior possibilidade de obterem resultados falsamente negativos (PAWLOTSKY, 1999).

O teste RIBA é utilizado para confirmar resultados positivos no teste ELISA e tem por base a detecção de anticorpos anti-VHC a partir da ligação desses a antígenos virais fixados em membranas de nitrocelulose (MUNOZ ESPINOSA, 2002). De acordo com Pawlotsky (1999), este teste não é útil ao diagnóstico das infecções pelo VHC em laboratórios clínicos, por não apresentar nenhuma informação adicional ao ELISA. Por outro lado, esse método pode ser utilizado na análise de soroconversões e é muito importante para o diagnóstico do VHC em bancos de sangue (PAWLOTSKY, 1999).

O ensaio imunoenzimático para o antígeno do core do VHC foi desenvolvido recentemente e sua eficiência tem sido comparada à do teste qualitativo para o vírus (REDDY *et al.*, 2006). A pesquisa desse antígeno tem sido utilizada, principalmente, no acompanhamento do tratamento de pacientes, visto que os níveis de antígeno do core podem

ser correlacionados às concentrações de RNA viral presentes no soro dos indivíduos infectados e, conseqüentemente, podem ser usadas como marcadores da replicação viral (BUTI *et al.*, 2004).

1.2.11.2 Diagnóstico por Cultura de Células

Por muito tempo, um modelo de cultura de células plausível para a replicação do VHC não foi possível. Diversas linhagens celulares foram testadas, mas não havia um tipo de célula ideal que permitisse o isolamento viral para fins de pesquisa ou diagnóstico (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2003).

Contudo, a partir de 2003, foi proposto um modelo de cultivo celular para estudo do VHC (TOMASSINI *et al.*, 2003). Para que este modelo fosse possível, foram feitas alterações na estrutura do genoma do VHC. Estas pequenas alterações visam facilitar a adequação viral ao meio de cultivo *in vitro*. Este complexo já funciona bem e permite que se descubra cada vez mais informações a respeito de características ainda obscuras com relação ao VHC, como forma de replicação e funções de algumas proteínas virais (AIZAKI *et al.*, 2004). Entretanto, esse modelo de complexo replicativo só é utilizado para fins de pesquisa. Como o vírus utilizado nestes estudos é um vírus mutante, o vírus infectante presente em um indivíduo infectado continua sendo incapaz de se replicar em meios normais de cultivo celular.

1.2.11.2 Diagnóstico Qualitativo do VHC

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é a ferramenta de biologia molecular mais facilmente utilizada no diagnóstico de doenças. Caracteriza-se por possibilitar diagnóstico rápido, sensível e específico. A principal dificuldade na adequação da técnica de PCR para o VHC foi a escolha dos iniciadores a serem utilizados na reação.

Okamoto e colaboradores (1990) analisaram vários iniciadores para reações de PCR, os quais eram localizados em diferentes regiões do VHC tais como: região 5' não-codificante do genoma do VHC, região do core, região codificante da proteína NS1, região codificante das proteínas NS3 e NS4 e região codificante da proteína NS5. Seus estudos concluíram que a região não-codificante do genoma viral é a área mais conservada entre os diferentes tipos e subtipos do VHC, tornando-se, assim, a região mais adequada à pesquisa do RNA do VHC por PCR. A utilização de uma segunda PCR aumenta dez vezes a eficiência do teste, promovendo sensibilidade de 10U/mL.

Já a hibridização *in situ* é utilizada para detectar presença do RNA do VHC em esfregaços de células mononucleadas a partir de sangue periférico (BRÉCHOT, 1997). Essa técnica não é muito utilizada, não havendo muitos estudos que constatem sua eficácia.

O “HCV Qualitative TMA” é um teste disponibilizado comercialmente pela Corporação Bayer. Esta técnica é baseada em três passos: captura da seqüência alvo, amplificação desta seqüência e detecção do produto amplificado. A detecção é feita utilizando-se sondas complementares ao fragmento amplificado marcadas com quimioluminescência, sendo o resultado obtido a partir da interpretação do sinal quimioluminescente (KHAN *et al.*, 2004).

O teste “AMPLICOR HCV MONITOR” é um teste comercial que baseia-se na transcrição do RNA viral para produção do cDNA, amplificação por PCR deste cDNA alvo usando iniciadores específicos do VHC, hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica (AMPLICOR HCV MONITOR TEST V 2.0, Roche Diagnostic Systems, Germany).

1.2.11.3 Genotipagem Viral

A incapacidade de detecção da existência de co-infecção por diferentes genótipos ou subtipos é um problema geral encontrado nas diversas técnicas de genotipagem do VHC. Até mesmo o seqüenciamento que mostrou-se a técnica mais sensível, é ineficiente na determinação de co-infecções (HAUSHOFER *et al.*, 2003).

A técnica de RFLP baseia-se na amplificação da região 5' não-codificante do RNA viral, com conseqüente digestão do produto amplificado. As enzimas *HaeIII* e *RsaI* combinadas com as enzimas *MvaI* e *HinfI* seriam as responsáveis pela diferenciação das amostras em genótipos. A diferenciação entre os subtipos 1a e 1b ocorreria pela utilização da enzima *BstUI*, enquanto que a diferenciação em subtipos 2a ou 2b se daria pela utilização da enzima *ScrFI*. A técnica não diferencia os subtipos do genótipo 2 em a, b e c (DAVIDSON *et al.*, 1995).

O teste comercial LiPA, baseia-se na hibridização dos produtos amplificados com sondas específicas para os diferentes genótipos virais. No caso, utilizam-se primers biotinizados para amplificação do material viral na região 5' não-codificante. O DNA produzido a partir do RNA viral é hibridizado por sondas oligonucleotídicas imobilizadas. As sondas encontram-se ligadas a uma fita de nitrocelulose e são específicas para a região 5' dos diferentes genótipos do VHC. Utiliza-se um conjugado para revelação da hibridização. A

banda da fita que der resultado colorimétrico corresponde ao genótipo do vírus (COMANOR *et al.*, 2003).

A genotipagem do VHC por técnica de seqüenciamento é realizada por análise das seqüências da região 5' não-codificante ou, até mesmo, da região hipervariável codificadora da proteína do envelope E2. Esta técnica pode ser feita por diferentes kits de seqüenciamento e seus respectivos aparelhos (MÜLLER *et al.*, 2003; ELAHI *et al.*, 2003 e BRÉCHOT, 1997). As técnicas de seqüenciamento são consideradas mais sensíveis para uso em grandes rotinas quando comparado com os testes de hibridização (HAUSHOFER *et al.*, 2003), todavia o custo é mais elevado.

1.2.11.4 Diagnóstico quantitativo do VHC

Métodos para medição da carga viral têm utilizado PCR quantitativa e um teste de “branched” DNA. Todavia, é necessário definir clinicamente a relevância dos níveis virais de VHC e padronização destes níveis em unidades internacionais, para que eles possam ter aplicação clínica e em pesquisa (PAWLOTSKY *et al.*, 2000). O conhecimento da carga viral é importante para o acompanhamento da eficácia do tratamento. A quantificação da carga viral, no entanto, não é um indicador da gravidade da doença (PAWLOTSKY, 2002).

O Teste AMPLICOR HCV MONITOR utiliza na amplificação, junto com a amostra a ser quantificada, um Padrão de Quantificação do VHC que é uma cópia transcrita de RNA não-infecciosa que contém locais de fixação ao iniciador idênticos aos do RNA alvo do VHC e uma região única de fixação da sonda que permite que o amplicon do Padrão de Quantificação se distinga do amplicon do VHC. Os níveis de RNA do VHC presentes nas amostras de teste são determinados comparando o sinal do VHC com o sinal do Padrão de Quantificação em cada amostra (AMPLICOR HCV MONITOR TEST V 2.0, Roche Diagnostic Systems, Germany).

A RT-PCR Competitiva é um método *in-house* baseado na co-amplificação competitiva de seqüências alvo específicas junto a padrões internos de concentração conhecida em um mesmo tubo de reação. É usado um competidor thio-RNA mutado, estável e resistente a Rnases, como controle interno. Depois de transcritos e amplificados, os produtos são digeridos com *BamHI* e é feita eletroforese em gel de agarose. A quantificação é dada a partir da densidade ótica das bandas visualizadas no gel, medidas sob luz ultra-violeta e usando um sistema próprio para análise. A intensidade da fluorescência emitida pelo brometo de etídio associado ao DNA é proporcional à quantidade de DNA. Em estudos realizados, o teste mostrou-se tão sensível quanto o “real time” e mais sensível que o ensaio Amplicor HCV Monitor (HAZARI *et al.*, 2004).

Dentre os testes disponibilizados para quantificação do RNA do VHC, o Real Time PCR é o teste com menor limite de detecção (350 cópias/mL) sendo, portanto, o mais sensível (MANCINI *et al.*, 2004). No entanto, o custo da máquina, da sonda, do kit fluorescente e de outros reagentes necessários para a implementação da técnica, torna o método muito caro e inacessível para diagnóstico de pequenas rotinas (HAZARI *et al.*, 2004).

1.2.12 Prevenção e tratamento

A prevenção da infecção pelo vírus da hepatite C depende mais da conscientização da população que de políticas públicas visando a este fim. Atualmente, o teste para VHC feito nos bancos de sangue é o primeiro passo para a diminuição da incidência da hepatite C (SIMMONDS *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de vacinas seria uma outra alternativa para o combate à disseminação da infecção pelo VHC, contudo essa alternativa se confronta com uma série de obstáculos. O primeiro deles é exatamente o fato do VHC ser altamente heterogêneo, o que dificulta a confecção de uma vacina efetiva contra todos os genótipos e subtipos virais. Além disso, os ensaios *in vitro* não estão bem estabelecidos ainda e a pesquisa de vacinas fica bastante comprometida. É importante que se saiba que antígeno seria mais efetivo para a indução de uma resposta protetora, efetiva e constante (NEVENS *et al.*, 2003).

O tratamento para hepatite C baseia-se na terapia combinada de interferon e ribavirina. Os interferons (IFN) do tipo I foram os primeiros agentes a permitir um tratamento eficaz para hepatite viral C crônica com clareamento viral de 40% a 50%. A monoterapia com IFN para hepatite C crônica leva a uma resposta de 20% a 25%, enquanto o tratamento combinado de IFN e ribavirina aumenta o número de respostas a longo prazo para mais de 50% (DUMOULIN *et al.*, 1999).

Assume-se que ambos, a indução de um estado antiviral e os efeitos imunomodulatórios do IFN, são importantes para a eliminação da infecção pelo VHC. Durante um tratamento bem sucedido para hepatite C crônica, é incomum uma elevação da atividade inflamatória; observa-se, na verdade, um declínio gradual dos níveis de aminotransferases séricas pouco tempo após o estabelecimento da terapia com IFN (DUMOULIN *et al.*, 1999).

Outras possibilidades de tratamento baseadas na inativação da RNA-polimerase viral, das proteases virais ou bloqueio da ligação do RNA viral aos ribossomos do hospedeiro ainda estão em estudo (DASGUPTA *et al.*, 2004; NEVENS *et al.*, 2003 e BOROWSKI *et al.*, 2002).

1.3 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

O VHC é endêmico na maioria das partes do mundo, mas a distribuição geográfica de seus diversos genótipos, bem como a incidência e a prevalência da hepatite C ocorre de forma diferente nos diversos pontos do planeta.

Estudos de epidemiologia molecular do vírus são importantes para que sejam identificados fatores que influenciam a transmissão e progressão da doença, bem como, para que sejam estabelecidos esclarecimentos sobre a origem dos diversos genótipos do vírus no mundo.

Considerando-se que estudos desta natureza são pouco relatados no Brasil é necessário que se delinieie o perfil epidemiológico do VHC em nosso país.

Este trabalho irá revelar a epidemiologia da hepatite C em Fortaleza, esclarecendo acerca de questões sociais e fatores de risco relacionados a gravidade da infecção; tornando possível o estabelecimento de metas mais adequadas ao controle e prevenção da doença nesta cidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar estudo molecular do Vírus da Hepatite C isolado de pacientes provenientes de um hospital de referência em Fortaleza, Ceará, no período de Março de 2004 a Agosto de 2005.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar o diagnóstico qualitativo e a genotipagem do vírus da hepatite C na Unidade de Biologia Molecular, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará.
- Descrever características epidemiológicas relacionadas à infecção pelo vírus da hepatite C na população estudada.
- Observar a possível forma de transmissão viral predominante entre os indivíduos avaliados.
- Determinar a prevalência dos genótipos do vírus da hepatite C na população de estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

3.1.1 Local do estudo

Esta pesquisa foi realizada na cidade de Fortaleza, capital do estado do Ceará. Fortaleza é uma cidade com aproximadamente 2.374.944 habitantes (população estimada em 01/07/2005, segundo IBGE). O sexo masculino corresponde a 47% dos habitantes e a maior parte da população encontra-se concentrada na faixa etária de 10 a 30 anos (DATASUS, 2005).

Em 2002, o Ceará apresentou a maior incidência de hepatite C na região Nordeste com 109 casos novos, ficando à frente de estados como Bahia (105 casos) e Pernambuco (78 casos) (DATASUS, 2005). O governo do Estado do Ceará, através da Secretaria de Saúde do Estado, tem concentrado esforços na tentativa de combater a hepatite C, por meio de campanhas de informação sobre a transmissão da doença e de financiamento do tratamento de pacientes infectados com o VHC.

Os pacientes deste estudo eram provenientes do ambulatório de gastroenterologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC). O HUWC é, reconhecidamente, um hospital de referência no controle e tratamento das hepatites virais no estado. É um hospital público responsável pelo atendimento de aproximadamente 11.350 pessoas por mês. As consultas no ambulatório de gastroenterologia correspondem a 5% da demanda mensal do hospital.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Pesquisa em Micobactérias e na Unidade de Biologia Molecular, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

3.1.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa:

- Pacientes com teste anti-VHC positivo, apresentando sintomas ou não.
- Pacientes com história clínica sugestiva de infecção pelo VHC.

3.1.3 Critérios de exclusão

Fora excluídos da pesquisa:

- Pacientes que já haviam iniciado tratamento da infecção pelo VHC há mais de um mês.

3.2 COLETA DE AMOSTRAS E ENTREVISTA

Os pacientes eram atendidos pelo médico gastroenterologista e depois encaminhados para a coleta de sangue.

Após esclarecimento acerca do estudo e da aquisição do consentimento do paciente (ANEXO II) era coletado 10 mL de sangue do mesmo em tubo sem anticoagulante através de punção venosa. Este material era prontamente identificado (nome do paciente e número de registro da amostra no laboratório) e acondicionado em isopor contendo gelo, sendo mantido assim até o procedimento de separação do soro.

Após a coleta de sangue, era feita uma entrevista com o paciente. Confidencialmente, o indivíduo respondia a algumas questões para que pudesse ser preenchido um questionário (ANEXO II). Neste questionário eram anotados dados relativos à condição sócio-econômica, fatores de risco para VHC, manifestações clínicas, existência prévia ou atual de outras doenças (como hipertensão, diabetes, problemas renais ou de coagulação, hepatite B, hepatite autoimune), informações sobre uso de medicamentos e tratamento.

Dados laboratoriais eram adquiridos posteriormente através da leitura dos prontuários dos pacientes. Pesquisavam-se resultados de testes sorológicos para diversos agentes virais como: vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (VHB), vírus da hepatite A (VHA) e HTLV I e II. Também eram anotados resultados de dosagens de transaminases (ALT e AST), albumina, proteínas totais e bilirrubina.

Os índices de transaminases apresentados pelos pacientes eram classificados em níveis normais ou alterados. Contudo, para que esse tipo de classificação fosse feita, era necessário que se analisasse os níveis de ALT e AST apresentados pelo indivíduo em pelo menos três dosagens recentes dessas enzimas. No caso do paciente não apresentar as três dosagens recomendadas, não era possível fazer esse tipo de classificação.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O processamento das amostras para o diagnóstico molecular do VHC foi realizado no laboratório de Pesquisa de Micobactérias e na Unidade de Biologia Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC.

O sangue coletado era armazenado a 4°C por um período de 2 a 4 horas para que ocorresse a retração do coágulo. Após esse tempo, o material era centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e o soro obtido era transferido para criotubos identificados apenas com o número de registro da amostra no laboratório.

O soro era dividido em duas alíquotas de 1mL. A alíquota que seria utilizada imediatamente na etapa de extração de RNA era armazenada a -20°C, enquanto que a outra alíquota era armazenada a -80°C, constituindo uma soroteca. O protocolo adotado no processamento das amostras está apresentado no anexo I e o experimento seguiu o fluxograma apresentado na **Figura 6**.

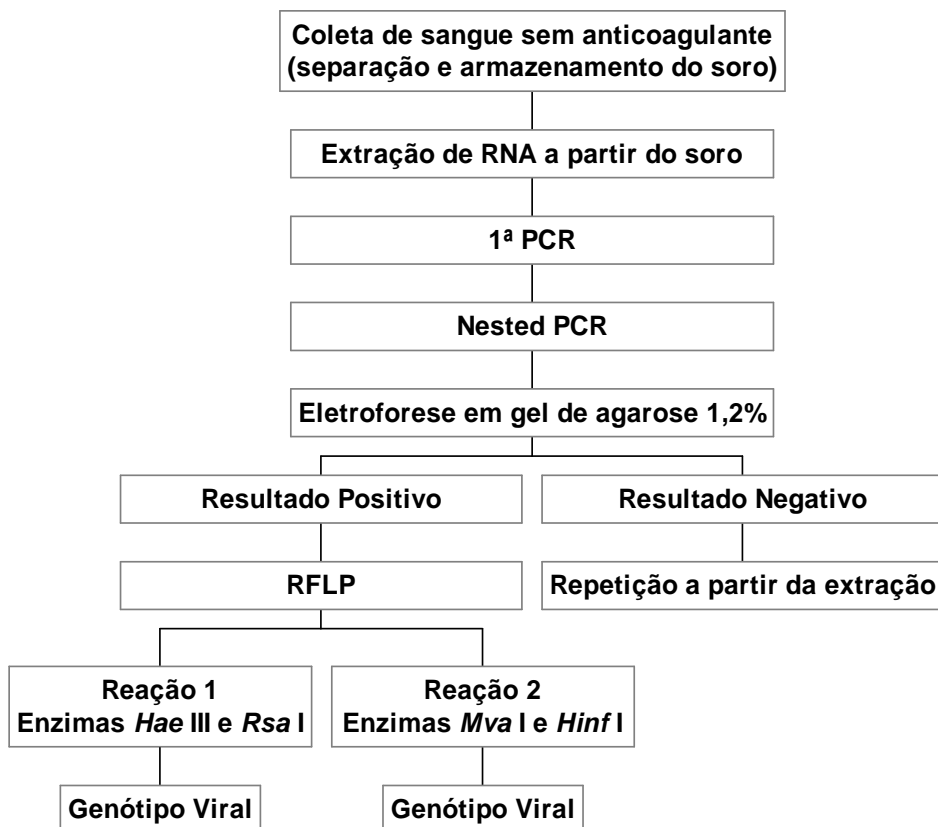


Figura 6: Fluxograma geral da metodologia experimental.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Toda a etapa de extração de RNA viral era realizada em capela de fluxo laminar tipo IIb, com fluxo negativo, localizada no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, no Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC.

Antes do início do procedimento, a cabine era limpa com glutaraldeído 2% e todo o material a ser utilizado na extração (pipetas, ponteiros, tubos, luvas, estantes e alguns reagentes) era submetido à luz ultravioleta por 20 minutos (**Figura 7**). Foram tomados todos os cuidados necessários para evitar a contaminação com Rnases contidas no ambiente durante a manipulação do material. Nesta etapa, o descarte dos materiais era feito em solução de hipoclorito de sódio 5%.

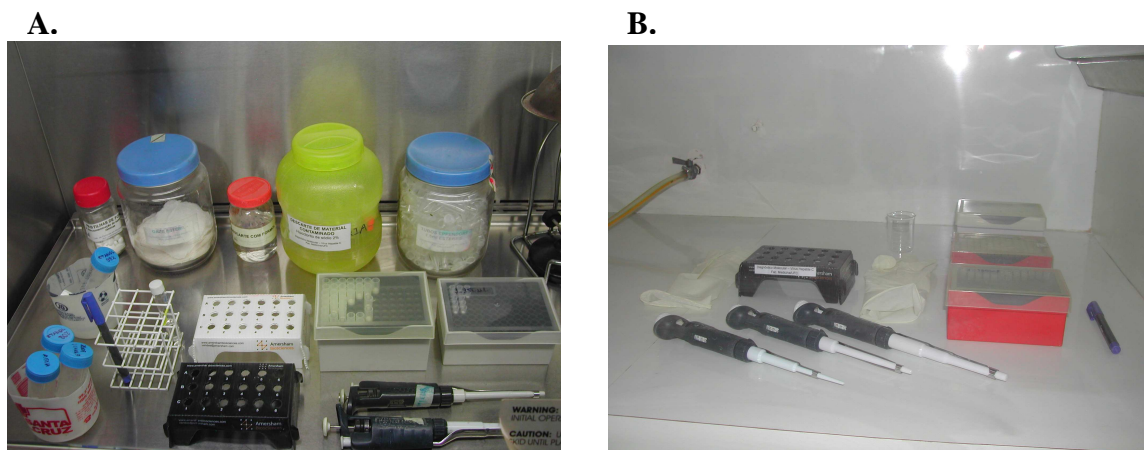


Figura 7: Cabines de biossegurança contendo os materiais organizados para submissão à luz ultravioleta antes do início dos procedimentos experimentais. O item “A” apresenta a cabine utilizada na extração de RNA viral e o item “B” corresponde à cabine utilizada para preparação de mix de transcrição, PCR e digestão enzimática.

A extração foi baseada na publicação de Chomczynski and Sacchi (1987). A primeira etapa da extração objetivava a separação entre o RNA e a maioria dos contaminantes orgânicos presentes no soro. Em um tubo tipo eppendorf de 1,5mL era adicionado 355 μ L de TRIZOL® (Invitrogen), 35 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico 24:1 e 200 μ L da amostra de soro do paciente. As amostras eram homogeneizadas manualmente e, a seguir, centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Modelo 2K15 - SIGMA).

Após a centrifugação, o RNA solubilizado na fase aquosa superior da amostra (aproximadamente 350 μ L) era transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 700 μ L de etanol 95% e 30 μ L de acetato de sódio 3M pH 5,5. Esta mistura era homogeneizada lentamente e mantida à -20°C por 20 minutos para que ocorresse a precipitação do RNA. A seguir, o material era centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C.

Após essa fase, era realizada a etapa de lavagem e secagem do RNA extraído. O etanol 95% era desprezado e ao RNA precipitado era adicionado 1mL de etanol 80%. Uma etapa de centrifugação (5 minutos a 12000rpm/ 4°C) era feita e o etanol 80% era desprezado para que fosse adicionado etanol 100% ao tubo. Uma nova etapa de centrifugação era realizada, idêntica à anterior, e a extração era finalizada com o descarte e a secagem de todo o etanol. Os tubos eram deixados em posição invertida sobre gaze estéril por cerca de 15

minutos para garantir a secagem completa do etanol. O protocolo seguido na extração de RNA é apresentado no anexo I.

Um *controle positivo*, representado por uma amostra de soro sabidamente PCR positivo para o vírus da hepatite C, era adicionado a cada nova bateria de extrações para validar os experimentos.

3.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA

A reação de transcrição reversa era feita imediatamente após a etapa de extração de RNA. Objetivava a conversão do RNA extraído da amostra de soro em cDNA para possibilitar a execução das etapas posteriores de amplificação do ácido nucléico viral.

Para cada amostra era preparado um mix de 25 µL composto por todo o material necessário à transcrição, representado por: 14 µL de H₂O Mili-Q, 5 µL de tampão 5× (contendo tris-HCl 250mM, pH 8,0; KCl 375 mM e MgCl₂ 15mM), 2 µL de Ditioneitol 0,1M (DTT - Invitrogen), 1,0 µL do mix de desoxinucleotídeos 10 mM (contendo adenina, timina, guanina e citosina – Amersham Biosciences), 1,0 µL de “random primer” 50 µM (Invitrogen), 1,0 µL da enzima para inibição de Rnases 10U/µL (RNAsin - Invitrogen) e 1,0 µL de MMLV 200U/µL (“Moloney Murine Leukemia Vírus” – Invitrogen).

Esse mix era adicionado diretamente ao tubo contendo o RNA extraído e precipitado. A seguir, os tubos eram mantidos a uma temperatura de 37°C (Banho-maria Thermonix - Biotech International) por um período de 5 a 12 horas para que ocorresse a reação de transcrição reversa.

Ao fim do tempo necessário à reação de transcrição reversa, o material era submetido a um aquecimento de 95°C por 10 minutos, o qual objetivava finalizar o processo por desnaturação da enzima MMLV-RT. Logo depois, o material era mantido a 4°C por 10 minutos, centrifugado, identificado (cDNA, número de registro da amostra no laboratório e data da extração) e armazenado a -20°C. O protocolo utilizado nas etapas de transcrição reversa, amplificação do ácido nucléico viral e eletroforese encontra-se apresentado no Anexo I.

O *controle negativo da reação* era composto pelos reagentes da transcrição reversa adicionados de água. A partir deste momento, ele passava por todas as etapas às quais as amostras dos pacientes eram submetidas. No caso de contaminação do controle negativo, os resultados obtidos eram desconsiderados e os testes eram refeitos a partir da extração de RNA do soro.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL

Foi baseada na técnica descrita por Chan e colaboradores (1992), que utiliza dois pares de iniciadores relativos à região 5' não-codificante do genoma viral.

3.6.1 Primeira PCR

Ocorria da seguinte forma: 4 µL do cDNA produzido era adicionado a 21 µL do mix de 1ª PCR composto por 16,8 µL de H₂O Mili-Q, 2,5 µL de tampão 10× adicionado de MgCl₂ 15 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,5 µL de cada iniciador 939 e 209 (50pmoles/µL - **Quadro 1** - Invitrogen), e 0,2 µL de Taq-polimerase 5U/µL (Cenbiot enzimas).

A seguir as amostras eram levadas ao termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e a reação era processada no seguinte esquema: aquecimento inicial a 94°C por 3 minutos, para que ocorresse a separação das fitas de DNA; seguido de 30 ciclos de 94°C por 25 segundos para a desnaturação, 50°C por 35 segundos para o anelamento e 68°C por 2,5 minutos para a extensão. Após os trinta ciclos, havia um período de extensão final que ocorria a 68°C por quinze minutos e depois as amostras eram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20°C. O produto gerado por esta reação possuía 306 pb, contudo a quantidade do mesmo na amostra ainda era pequena, o que impossibilitava sua visualização em um gel de agarose e fundamentava a necessidade da realização de uma segunda PCR.

Iniciadores	Sentido	Seqüência (5' → 3')
939	Positivo	CTGTGAGGAACTACTGTCTT
209	Negativo	ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACCT

Quadro 1: Iniciadores de primeira PCR.

3.6.2 Nested PCR

Na segunda reação de PCR eram adicionados 5 µL do produto da 1ª PCR a 70 µL de um mix constituído por 59,1 µL de H₂O Mili-Q, 7,5 µL de tampão 10× adicionado de MgCl₂ 15mM, 1,0 µL de dNTPs 10 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,0 µL dos iniciadores internos 940 e 211 (50pmoles/µL - Quadro 2 - Invitrogen), e 0,4 µL de Taq-polimerase (5U/µL – Cenbiot enzimas)

O programa de temperaturas, ao qual as amostras eram submetidas no termociclador, era o seguinte: aquecimento inicial a 94°C por 3 minutos para que ocorresse a separação das fitas de DNA seguido de 40 ciclos de 94°C por 25 segundos para a desnaturação, 50°C por 35 segundos para o anelamento e 68°C por 2,5 minutos para a extensão. Aqui também havia um período de extensão final representado pela manutenção das amostras a uma temperatura de 68°C por quinze minutos e, ao final, os tubos ficavam a 4°C até sua posterior estocagem a -20°C. O produto de PCR gerado por esta reação possuía 251pb.

Iniciadores	Sentido	Seqüência (5' → 3')
940	Positivo	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG
211	Negativo	CACTCTCGAGCACCTATCAGGCAGT

Quadro 2: Iniciadores da nested PCR.

3.7 VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Quinze microlitros do produto amplificado no nested PCR eram misturados a 3µL de tampão de carregamento 6× e aplicado em um gel de agarose 1,2% preparado em TAE 1× (ver anexo I) contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. O brometo de etídio intercala-se a ácidos nucléicos e permite a visualização de bandas de DNA sob luz ultra-violeta (SAMBROOK *et al.*, 1989). Este reagente tem ação mutagênica. O procedimento adotado para descarte de géis e tampões contaminados com este reagente encontra-se descrito no anexo I e foi baseado na publicação de Lunn e Sansone (1987).

A corrida eletroforética era desenvolvida a 50 V por cerca de uma hora (Electrophoresis Power Supply EPS 600 - Pharmacia Biotech), em seguida as bandas eram visualizadas com iluminação ultravioleta.

Os resultados positivos passavam para a etapa de genotipagem e os resultados negativos eram confirmados por repetição a partir de nova extração de RNA. A seqüência viral amplificada, especificando a localização dos iniciadores, é mostrada na **Figura 8**.

```
gccagccccctgatggggggcgacactccaccatgaatcactcccCTGTGAGGAAC TACTGTCTTca  
cgcagaagcgtct agccatggcgttagtatgagtgtcgtgcagcctccaggacccccctcccgg  
gagagccatagtggctctgcggaaccggtgagtacaccggaattgccaggacgaccgggtccttct  
tggatcaaccgcctcaatgectggagatttgggcgtgcccccgcaagactgctagccgagt agtgt  
tgggtcgcgaaaggccttgtggtactgect gat aggggt gct tgcgagt gccccgggAGGTCTCGTA  
GACCGTGCACCATGAGCAcgaatcctaaacctcaaaaaaaaaaacaacgt
```

Figura 8: Seqüência do genoma viral amplificada. Os iniciadores 939 e 209 encontram-se destacados em vermelho, enquanto que os iniciadores 940 e 211 apresentam-se em verde. Fonte: CHOO *et al.*, 1991.

3.8 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A etapa de genotipagem do vírus era realizada em duas reações de digestão enzimática baseadas na publicação de Davidson *et al.* (1995).

Na primeira reação (RM1) eram utilizadas as enzimas de restrição *HaeIII* e *RsaI*. Vinte e cinco microlitros do produto de nested PCR era adicionado a um mix constituído por 1,4 µL de H₂O, 3,0 µL de tampão NE 10× (Invitrogen), 0,3 µL de *HaeIII* 10U/µL (Invitrogen) e 0,3 µL de *RsaI* 10U/ µL (Invitrogen).

Na segunda reação (RM2), as enzimas utilizadas eram *MvaI* e *HinfI*. Também nessa reação, era adicionado 25 µL do produto de nested PCR a um mix de 1,4 µL de H₂O, 3,0 µL de tampão K 10× (Invitrogen), 0,3 µL de *MvaI* 10U/µL (Pharmacia Biotech) e 0,3 µL de *HinfI* 10U/ µL (Invitrogen). O **Quadro 3** mostra as enzimas de restrição utilizadas e seus respectivos sítios de restrição.

Ambas as reações de digestão ocorriam a 37°C por cerca de 12 horas. Após esse tempo, as enzimas eram desnaturadas por aquecimento a 70°C por 10 minutos. O material digerido ficava armazenado a -20°C até o momento da análise por eletroforese. O protocolo seguido na genotipagem viral está apresentado no Anexo I.

Enzima de Restrição	Seqüência Alvo	Local de corte
<i>Hae</i> III	GGCC	GG / CC CC / GG
<i>Hinf</i> I	GANTC	G / ANTC CTNA / G
<i>Mva</i> I	CCWGG	CC / WGG GGW / CC
<i>Rsa</i> I	GTAC	GT / AC CA / TG

Quadro 3: Sítios de corte das enzimas empregadas na genotipagem do VHC. A letra N representa as bases nucleotídicas A, C, G ou T, enquanto W representa A ou T.

3.9 ANÁLISE DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO

A eletroforese dos fragmentos de restrição era feita em gel de agarose Metaphor® Cambrex 4%, preparado em TAE 1×, contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL de gel.

Um marcador padrão de DNA de 25 pb (Invitrogen) era adicionado a cada eletroforese, servindo como referência para a análise dos fragmentos digeridos.

A corrida ocorria por um período de 2 horas a 50V. A visualização das bandas era feita em luz ultravioleta, sendo que a imagem era obtida com máquina digital para posterior análise dos resultados. As **Figuras 9 e 10** apresentam as variações de restrição que ocorrem nos genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 quando são empregadas as enzimas *Hae* III/*Rsa* I e *Mva* I/*Hinf* I. O protocolo utilizado para preparação do gel de agarose Metaphor® e para organização dos resultados está descrito no Anexo I.

	<i>RsaI</i> ▽	<i>RsaI</i> ▽	<i>HaeIII</i> ▽	<i>RsaI</i> ▽	<i>HaeIII</i> ▽	<i>HaeIII</i> <i>RsaI</i> ▽	<i>HaeIII</i> <i>RsaI</i> ▽
a	33	23	46		114	9	26
b	102				114/5	9	26
c	44		58		114/5	9	26
d	44	12	46		58	56	9 26
e	44	12	46		114		9 26
f	56		46		114		9 26
g	56		46		58	56	9 26
h	33	69			114		9 26
i	83		18		114		9 26
j	101				114		9 26
k	44	172					9 26
l	217						9 26
l'	216						9 26
m	44	12	46		117		9 26

Figura 9: Tamanho esperado dos fragmentos de nested PCR digeridos com as enzimas *HaeIII* e *RsaI*. Genótipo 1: b, c; genótipo 2: d, e, f, g; genótipo 3: a, h, i, j; genótipo 4: b, c, k, l; genótipo 5: b, c, l'; genótipo 6: m. Fonte: Abid *et al.*, 2000.

	<i>MvaI</i> ▼	<i>Hinfi</i> ▼	<i>MvaI</i> ▼	<i>MvaI</i> ▼	
a	53	56	7	41 94	
b	53	63		41 94	
c	53	104			94
d	53	198			
e	109		142		
f	53	56	142/3		
g	53	63	43/4	94	

Figura 10: Tamanho esperado dos fragmentos de nested PCR digeridos com as enzimas *MvaI* e *Hinfi*. Genótipo 1: b, c; genótipo 2: c, d; genótipo 3: a, e, f; genótipo 4: f; genótipo 5: d, f; genótipo 6: g. Fonte: Abid *et al.*, 2000.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística do estudo consistiu de estatística descritiva (através da apresentação dos dados por meio de tabelas e gráficos e por análises percentuais) e inferência estatística (por meio da determinação de intervalos de confiança e de aplicação de testes de hipótese para comparação de proporções).

A análise foi realizada utilizando os programas estatísticos Epi-Info 6.04d e SSPS para Windows versão 10.0. Como nível de significância ou erro tipo I foi tomado o valor mais aplicado de $\rho = 0,05$.

3.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará e recebeu parecer favorável a sua execução no dia 29 de abril de 2005 através do ofício N° 242/05 (Anexo III).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

Foi colhido um total de 120 amostras no período de Março/2004 a Agosto/2005 no ambulatório de gastroenterologia do HUWC. Dentre essas, 70 pacientes (58,3%) eram do sexo masculino e 50 pacientes (41,7%) eram do sexo feminino. A média de idade da população estudada foi de 44 ± 1 ano, variando entre 18 e 80 anos de idade.

Quanto à escolaridade, 2% dos pacientes eram analfabetos, 16% tinham apenas o ensino fundamental incompleto, 10% tinham terminado o ensino fundamental, 6% possuíam ensino médio incompleto, 46% possuíam ensino médio completo, 4% tinham ensino superior incompleto e 16% possuíam ensino superior completo (**Figura 11**).

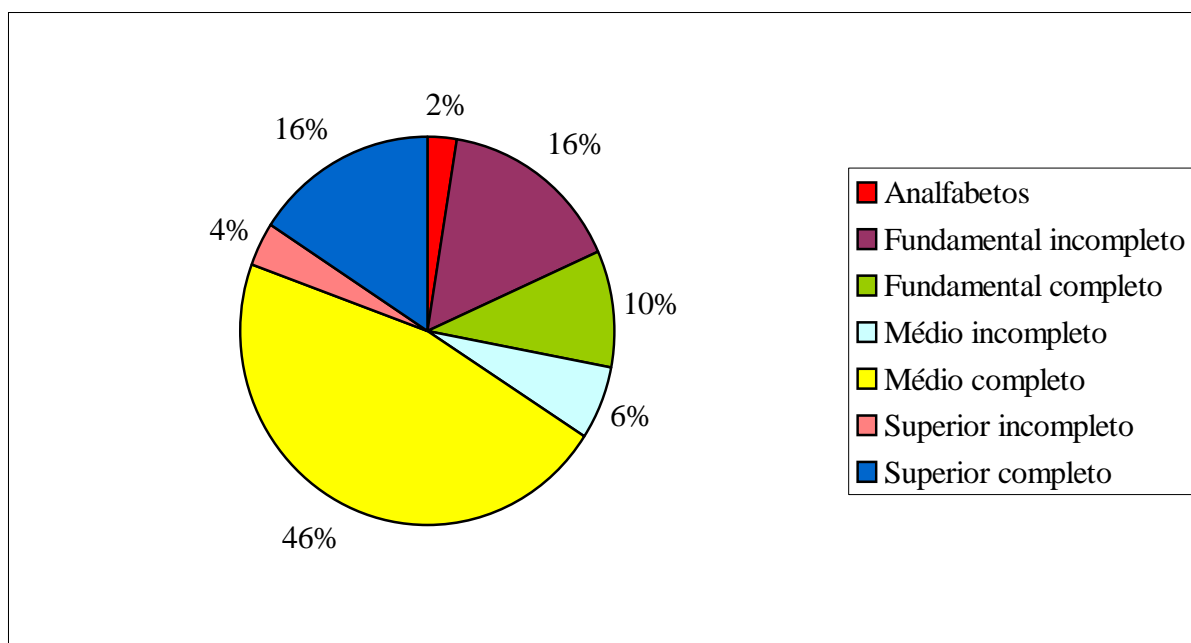


Figura 11: Distribuição dos indivíduos da pesquisa segundo o nível de escolaridade (n=120).

Dentre os 120 pacientes, apenas 89 se manifestaram informando presença ou ausência de manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo VHC. Dentre esses, 30,3% apresentavam sintomas, sendo febre e dor abdominal os sinais clínicos mais relatados. Quanto à dosagem de transaminases, somente 51 pacientes possuíam valores de dosagens de ALT registrados em seus prontuários e 63% destes indivíduos (30 pessoas) apresentaram níveis de ALT alterados; contudo, a relação entre possuir estes níveis alterados e apresentar sintomas da doença não foi significativa ($p > 0,05$).

Quanto aos fatores de risco para infecção pelo VHC, o mais prevalente foi história clínica de cirurgia (37,50%), seguido por transfusão sanguínea (22,80%), DST prévia (14,65%), uso de drogas (10,77%), tatuagem (5,60%), diálise (4,30%) e risco ocupacional

(4,30%). Um total de 79 pacientes apresentou mais de um fator de risco para a doença e 12 pacientes possuíam uma fonte de infecção desconhecida. A distribuição dos fatores de risco para VHC entre os sexos pode ser vista na **Figura 12**. Diferenças mais significativas nas proporções são visualizadas entre os usuários de drogas (96% do sexo masculino e 4% do sexo feminino) e tatuados (85% do sexo masculino e 15% do sexo feminino).

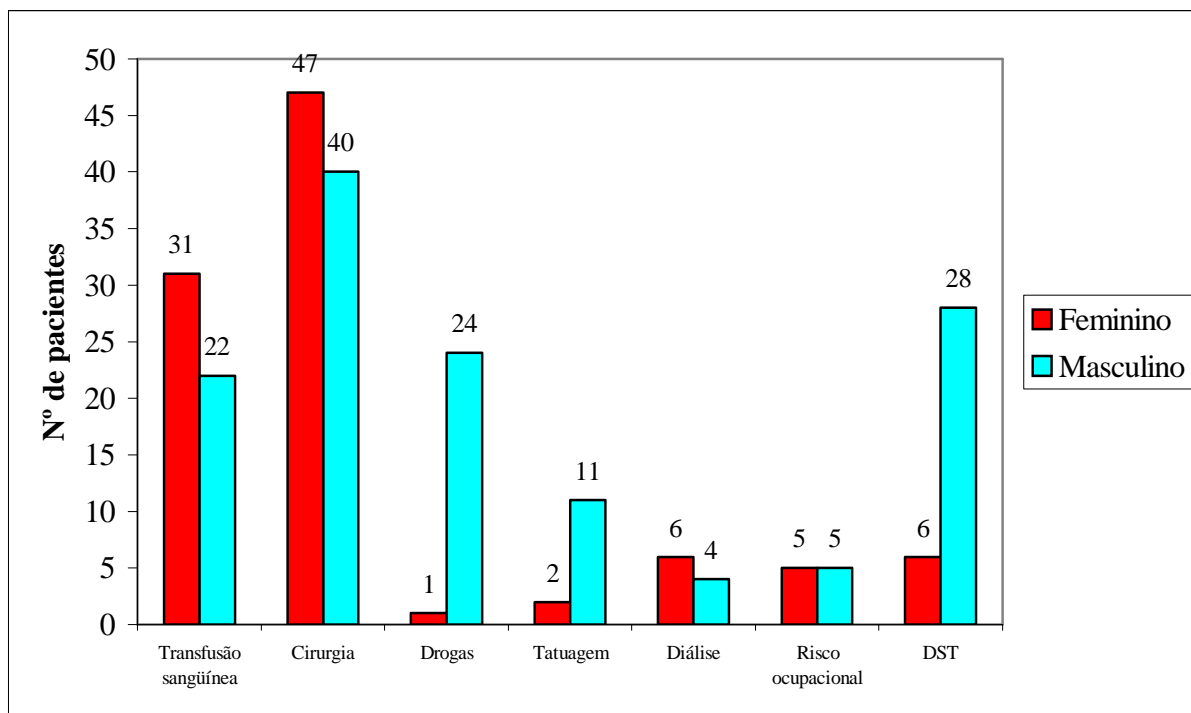


Figura 12: Distribuição dos fatores de risco para VHC entre os sexos (n=120).

Alguns dados sobre marcadores sorológicos foram obtidos a partir dos prontuários dos indivíduos da pesquisa. Seis pacientes possuíam anti-HBc IgG positivo e 10 pacientes possuíam anti-HBs positivo. Da população estudada, nenhum paciente possuía marcador sorológico para HIV (**Tabela 1**).

Tabela 1: Marcadores sorológicos pesquisados entre os 120 pacientes estudados

	Anti-HBc IgG	Anti-HBc IgM	HIV	HBsAg	Anti-HBs
Positivo	6	2	0	3	10
Negativo	24	20	15	31	11
Total	30	22	15	34	21

4.2 DIAGNÓSTICO QUALITATIVO

Um total de 96 pacientes (80%) foi positivo no teste para detecção do vírus da hepatite C. Um exemplo de gel de agarose 1,2% com amostras positivas para o VHC pode ser visto na **Figura 13**.

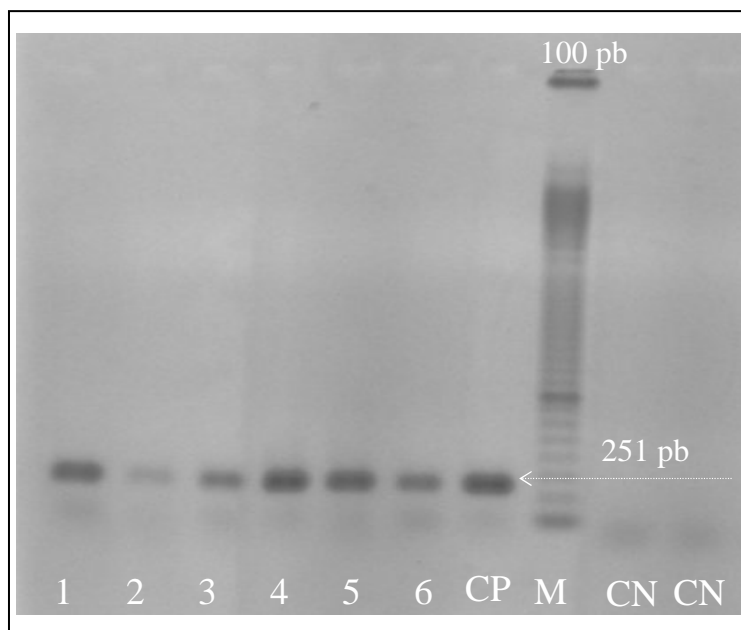


Figura 13: Gel de agarose 1,2% mostrando bandas de 251 pb. Poços 1 a 6: amostras positivas no teste qualitativo para VHC; CP: controle positivo; M: marcador padrão de 100 pb; CN: controle negativo.

Dentre as amostras positivas, 39,6% pertenciam ao sexo feminino e 60,4% pertenciam ao sexo masculino (**Tabela 2**).

Tabela 2: Distribuição entre os sexos do resultado do teste qualitativo para VHC.

Qualitativo	Sexo				Total
	Feminino	(%)	Masculino	(%)	
Positivo	38	(32)	58	(48)	96
Negativo	12	(10)	12	(10)	24
Total	50		70		120

Os pacientes com qualitativo positivo apresentavam idade variando entre 18 e 68 anos. A média de idade destes indivíduos foi 44 ± 2 anos, estando a distribuição da faixa etária concentrada entre 32 e 59 anos, com 78 pacientes (81%) englobados nesta região, conforme mostrado na **Figura 14**. Não foi observada diferença significativa na distribuição das idades entre os sexos ($\rho=0,30$) e, também, não houve correlação significativa entre o resultado do teste qualitativo e a idade dos pacientes ($\rho>0,05$).

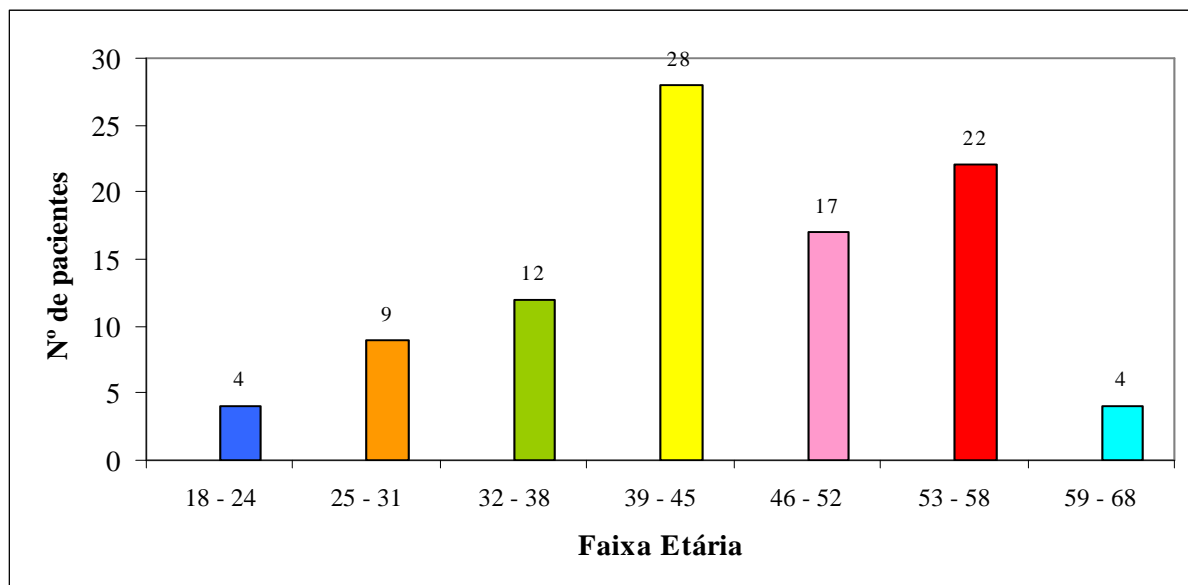


Figura 14: Distribuição dos 96 pacientes com qualitativo positivo para VHC segundo a faixa etária.

Com relação aos comportamentos de risco relacionados à aquisição da infecção, 25% dos pacientes positivos eram usuários ou ex-usuários de drogas. Foi demonstrada uma correlação entre o uso de drogas e a positividade para o VHC no teste qualitativo (**Figura 15**). Noventa e seis por cento, ou seja, 24 pacientes dos 25 indivíduos usuários de drogas foram positivos neste teste, confrontando com apenas 1 (um) paciente usuário de droga e com teste qualitativo negativo ($\rho = 0,04$). As drogas usadas por esses pacientes eram injetáveis, cocaína, maconha e gluconergan (um tipo de suplemento energético injetável). A análise entre os fatores de risco para infecção pelo VHC e o resultado do teste qualitativo é mostrada na **Tabela 3**.

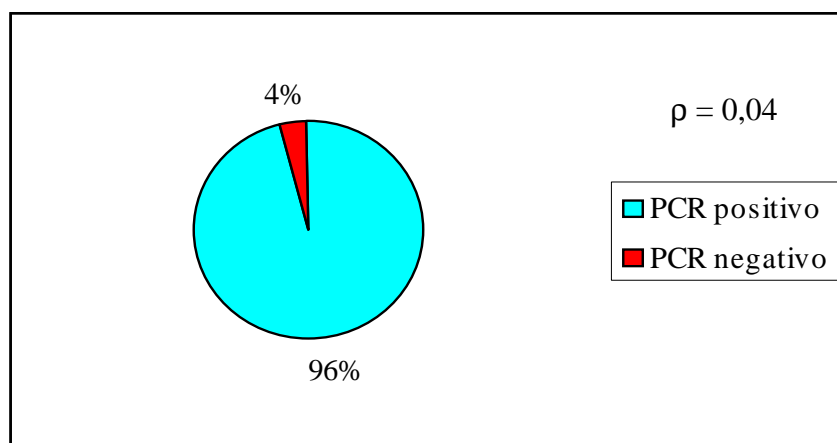


Figura 15: Distribuição do resultado do teste qualitativo entre os 25 indivíduos usuários de drogas.

A respeito do comportamento sexual, 88% dos indivíduos com história de infecção por doença sexualmente transmissível foram positivos para VHC no teste qualitativo, todavia, esse dado não foi estatisticamente significativo ($p = 0,24$). Trinta e um por cento de todos os 96 pacientes positivos para VHC apresentavam história de DST prévia, sendo gonorréia a infecção mais comum.

No que diz respeito à transfusão sanguínea, cirurgia ou diálise, não foi observada nenhuma significância estatística entre a presença desses fatores e a positividade ou negatividade no teste qualitativo para VHC. História clínica de cirurgia foi o fator de risco mais presente entre os pacientes positivos (73%), seguido por transfusão sanguínea (45,8%). Diálise, tatuagem e risco ocupacional corresponderam a 7,3%, 10,4% e 8,3% dos pacientes positivos, respectivamente.

Tabela 3: Relação entre os fatores de risco para infecção pelo VHC e o resultado do teste qualitativo.

Fator de risco	Resultado do teste qualitativo				P
	Positivo	(%)	Negativo	(%)	
Cirurgia	70	(80)	17	(20)	NS
Transfusão sanguínea	44	(83)	9	(17)	NS
Drogas	24	(96)	1	(4)	0,04
DST	30	(88)	4	(12)	NS
Tatuagem	10	(77)	3	(23)	NS
Diálise	7	(70)	3	(30)	NS
Risco ocupacional	8	(80)	2	(20)	NS

NS: estatisticamente não significativa.

Cinquenta e três pacientes possuíam história de transfusão sanguínea, todavia não houve significância estatística ($p = 0,35$, segundo o teste de Fisher) entre o fato da transfusão ter ocorrido antes ou após 1993 (ano em que foi iniciada a pesquisa do anti-VHC nos bancos de sangue) e o resultado do teste qualitativo.

Oitenta e nove pacientes se pronunciaram a respeito da presença ou ausência de sintomatologia para hepatite C. Vinte e sete deles (30%) relataram a apresentação de sintomas e, dentre esses, 25 (92,6%) foram positivos no teste qualitativo para VHC contra apenas 2 pacientes sintomáticos e negativos no teste qualitativo. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,07$).

Com relação aos níveis de ALT, somente 51 pacientes tiveram seus resultados de dosagem reportados. Dentre esses, 32 indivíduos apresentaram níveis de transaminases alterados. Noventa por cento deles (29 pacientes) tiveram resultado positivo no teste qualitativo para VHC, mas, nessa relação, não foi observada significância estatística ($p=0,39$) (**Figura 16**).

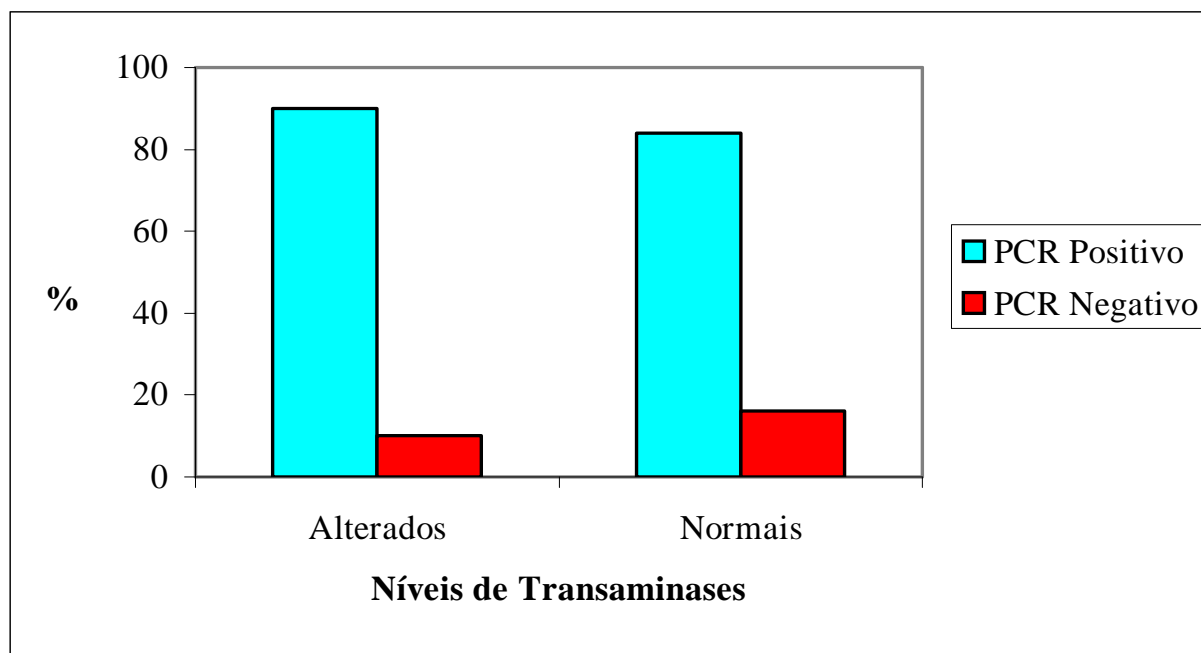


Figura 16: Relação entre o resultado do teste PCR qualitativo para VHC e os níveis de transaminases (n = 51).

Quanto às informações sobre marcadores sorológicos, observou-se que, entre os pacientes submetidos à pesquisa de anticorpo anti-HBs (21 pacientes), havia uma alta prevalência deste marcador (44,4%) nos pacientes com qualitativo positivo para VHC. Três pacientes possuíam anti-HBc IgG positivo, 2 possuíam sorologia positiva para HBsAg e apenas um paciente apresentou positividade para anti-HBc IgM.

Doze pacientes com pesquisa de anti-VHC positiva foram negativos no PCR qualitativo para VHC. Dentre esses, um indivíduo possuía western-blot para VHC negativo e três possuíam western-blot indeterminado.

Quarenta e quatro pacientes relataram que seus parceiros tinham se submetido à pesquisa de anticorpo anti-VHC. Cinco indivíduos possuíam parceiros com sorologia positiva para VHC, contudo, somente quatro desses indivíduos foram positivos no teste qualitativo para VHC. A **Figura 17** mostra a relação entre o resultado da sorologia para VHC do parceiro

e o resultado do teste qualitativo do paciente do estudo. Todavia, a análise desta relação não apresentou significância estatística ($p > 0,05$).

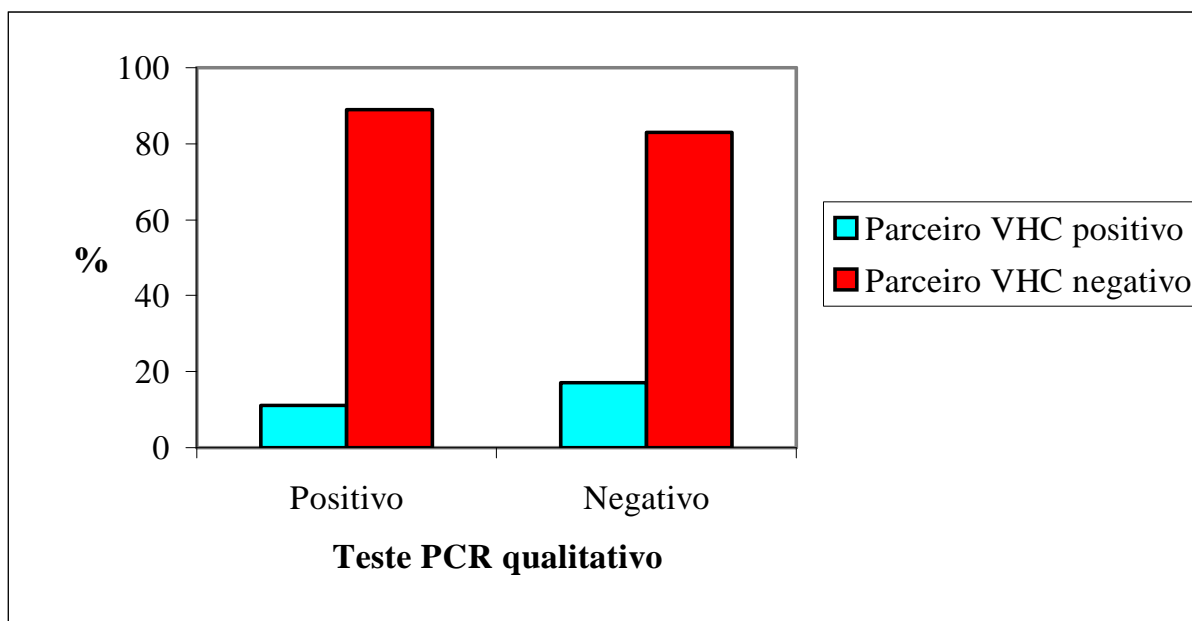


Figura 17: Relação entre o resultado do teste qualitativo e a pesquisa de anticorpo anti-VHC do parceiro (n = 44).

Quarenta pacientes foram submetidos à biópsia hepática e, de acordo com os resultados deste exame, foi observado que 37,5% desses indivíduos apresentavam quadro de hepatite crônica de atividade leve, 25% apresentavam hepatite crônica de atividade moderada, 25% possuíam cirrose moderada e 12,5% caracterizavam quadro de cirrose.

4.3 GENOTIPAGEM

Todos os 96 pacientes positivos no PCR foram submetidos à etapa de genotipagem viral. O genótipo mais prevalente, de acordo com este estudo, foi o genótipo 1 com 45 pacientes (46,9%), seguido pelo genótipo 3 (33 pacientes, 34,4%), genótipo 2 (8 pacientes, 8,3%) e genótipo 4 (apenas 1 paciente). Em nove amostras, não foi possível a determinação do genótipo do VHC e esses casos foram classificados como indeterminados (**Figuras 18 e 19**).

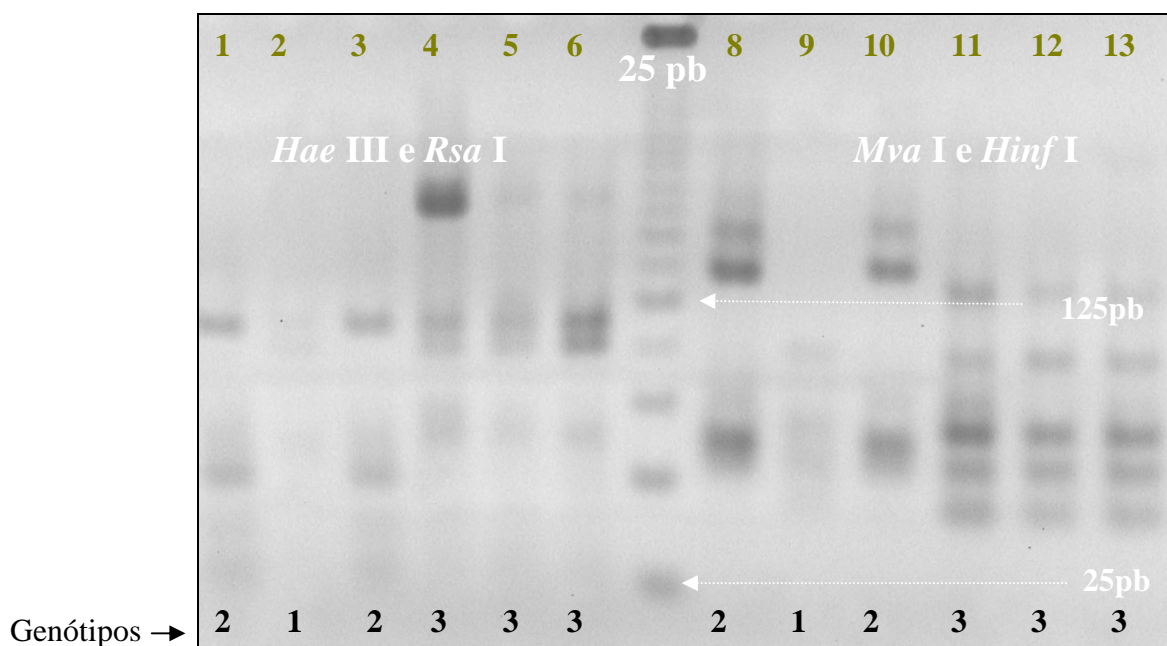


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose Metaphor 4%, mostrando o padrão das bandas que caracterizam os diversos genótipos do VHC. Poços 1-6: amostras digeridas com as enzimas *HaeIII* e *RsaI*; poços 8-13: produtos de 2ª PCR digeridos com as enzimas *MvaI* e *HinfI*. Poços 1, 3, 8 e 10 caracterizam genótipo 2. Poços 2 e 9 evidenciam genótipo 1. Poços 4, 5, 6, 11, 12 e 13 representam genótipo 3. Poço 7: marcador de DNA padrão de 25 pb.

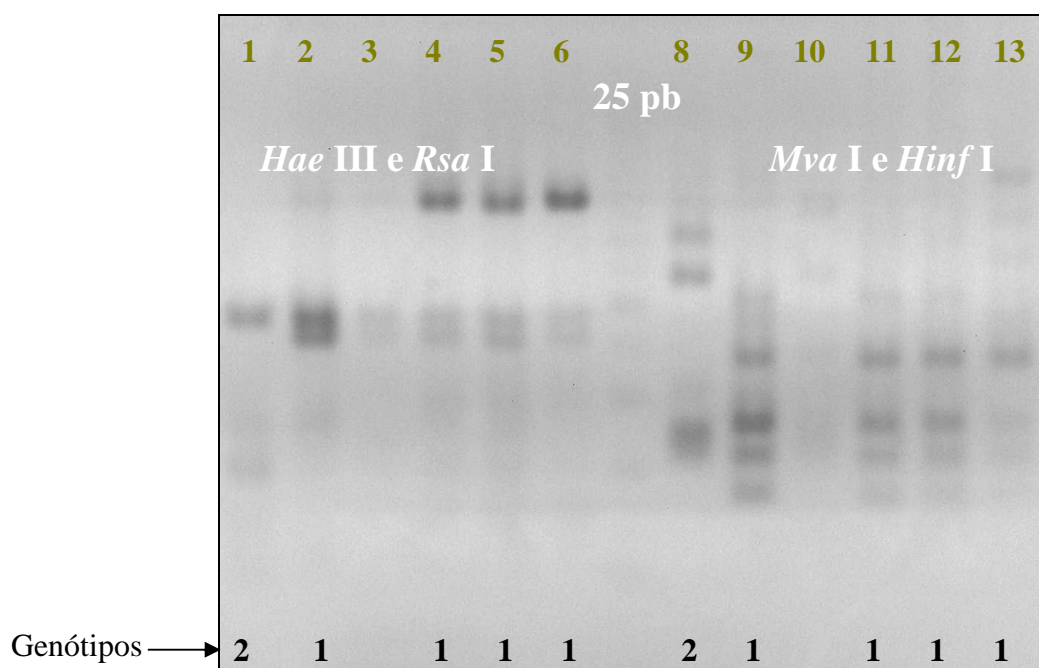


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose Metaphor a 4%, evidenciando o padrão de genótipo 1. Os poços 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12 e 13 referem-se ao genótipo 1. Os poços 1 e 7 caracterizam genótipo 2, enquanto que os poços 3 e 10 apresentam bandas fracas, impossibilitando a determinação de algum genótipo. O marcador padrão de 25pb apresenta-se fracamente no poço 7.

A distribuição dos sexos entre os diferentes genótipos ocorreu de forma bem igualitária, com percentuais masculino e feminino bem próximos. O único genótipo que apresentou diferença um pouco mais acentuada foi o genótipo 1, com 67% dos indivíduos sendo do sexo masculino e 33% do sexo feminino. Contudo, essa diferença não conferiu significância estatística ($p=0,33$). O sexo masculino foi o mais prevalente entre todos os genótipos (**Tabela 4**).

Tabela 4: Distribuição dos genótipos do VHC entre os sexos.

Sexo	Genótipo									Total	
	1	(%)	2	(%)	3	(%)	4	(%)	Indeterminado (%)		
Feminino	15	(33)	4	(50)	15	(45)	0	(0)	4	(44)	38
Masculino	30	(67)	4	(50)	18	(55)	1	(100)	5	(56)	58
Total	45		8		33		1		9		96

Na **Figura 20** é mostrada a distribuição dos genótipos dentro de uma faixa etária determinada. Claramente, o genótipo 2 mostrou-se mais prevalente em relação aos demais genótipos dentro da faixa etária de 44 a 56 anos. Todavia, esta prevalência não foi estatisticamente significativa ($p = 0.46$). Na faixa etária de 18 a 30 anos, a distribuição mostrou-se bem uniforme entre os grupos. Esta distribuição foi um pouco divergente na faixa etária de 31 a 43 anos, mas sem significar relevância estatística. O genótipo 2 não apresentou nenhum paciente na faixa etária de 57 a 68 anos.

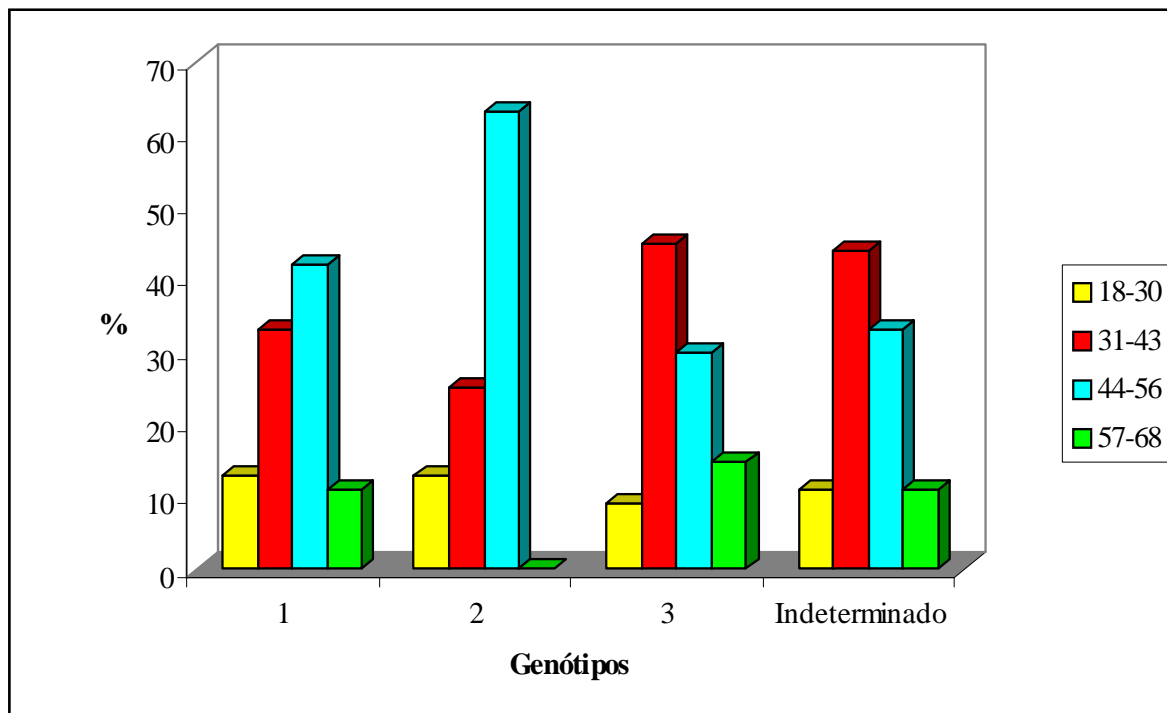


Figura 20: Distribuição dos pacientes do estudo de acordo com o genótipo e faixa etária.

Para obter uma melhor análise estatística dos dados, os genótipos virais foram agrupados em genótipos tipo 1 e não-1 e genótipos tipo 3 e não-3. Esses grupos foram cruzados com todas as variáveis relevantes deste estudo para verificação de correlações estatísticas. No que diz respeito à distribuição em faixa etária dos pacientes desses agrupamentos, não se observou nenhuma diferença significativa. A **Figura 21** ilustra bem esta uniformidade de distribuição.

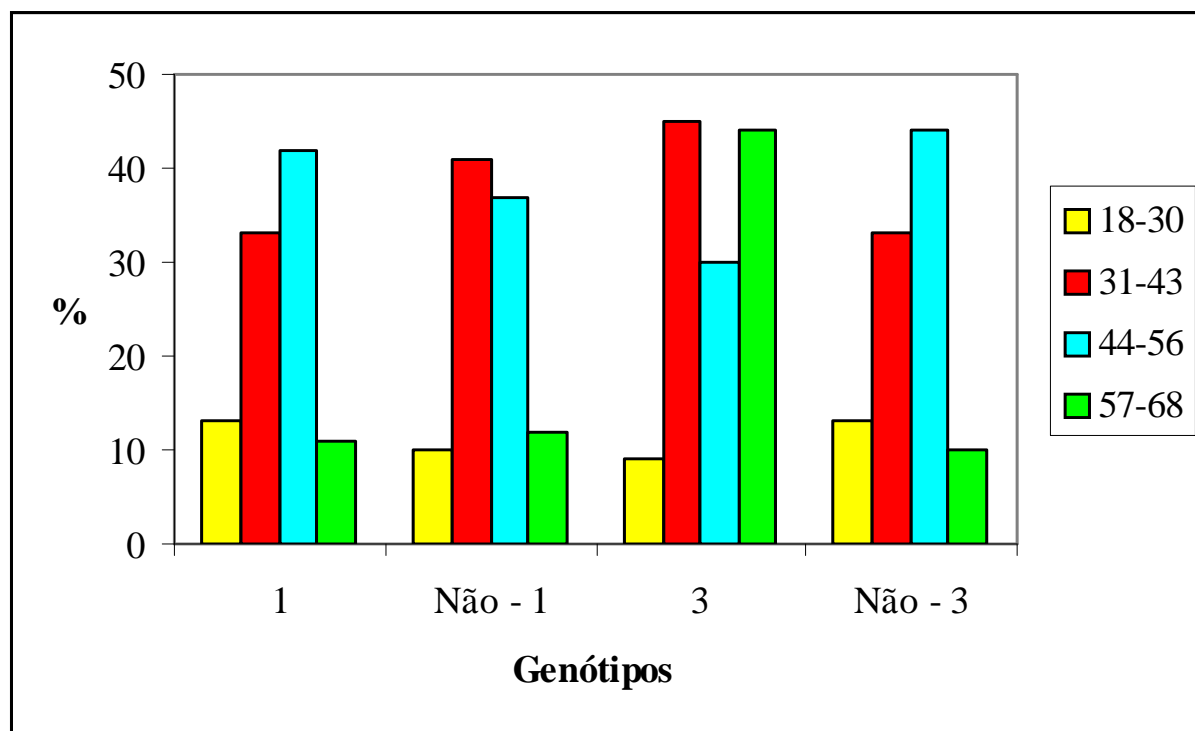


Figura 21: Distribuição dos genótipos tipo 1 e não-1 e tipo 3 e não-3 de acordo com a faixa etária (n = 96).

A **Tabela 5** mostra a distribuição dos genótipos do VHC entre os diversos fatores de risco responsáveis pela aquisição da infecção. História clínica de cirurgia foi o fator de risco mais presente em todos os genótipos virais.

A distribuição dos genótipos entre os fatores de risco ocorreu de forma bem homogênea. Os genótipos 1 e 3 estiveram presentes e foram os mais prevalentes em todos os fatores de risco, sem exceção, sendo o genótipo 1 sempre mais freqüente que o genótipo 3. A distribuição dos pacientes com genótipo 2 e com genótipo indeterminado ocorreu de forma um pouco menos semelhante na população, mas essas diferenças não foram significativas.

Ademais, observou-se significância estatística quando foi relacionado o fato de ter exposição ocupacional ao vírus e desenvolver doença pelo genótipo 1 do vírus da hepatite C ($\rho = 0,01$; segundo o teste de Fisher). Todas as outras variáveis foram analisadas e correlacionadas com os genótipos, mas todas as inferências apresentaram $\rho > 0,05$.

Tabela 5: Relação entre os fatores de risco para infecção pelo VHC e os genótipos virais.

Fator de risco	Genótipos							P	
	1	(%)	2	(%)	3	(%)	Indeterminado (%)		
Cirurgia									
Sim	32	(45,7)	5	(7,1)	27	(38,6)	6	(8,6)	NS
Não	13	(52)	3	(12)	6	(24)	3	(12)	NS
Transfusão sanguínea									
Sim	20	(46,5)	5	(11,6)	16	(37,2)	2	(4,7)	NS
Não	25	(48)	3	(5,8)	17	(32,7)	7	(13,5)	NS
Drogas									
Sim	11	(45,8)	2	(8,4)	8	(33,3)	3	(12,5)	NS
Não	34	(47,8)	6	(8,5)	25	(35,2)	6	(8,5)	NS
DST									
Sim	13	(44,8)	4	(13,8)	10	(34,5)	2	(6,9)	NS
Não	32	(48,5)	4	(6,1)	23	(34,8)	7	(10,6)	NS
Tatuagem									
Sim	6	(60)	0	(0)	4	(40)	0	(0)	NS
Não	39	(45,9)	8	(9,4)	29	(34,1)	9	(10,6)	NS
Diálise									
Sim	4	(57,1)	0	(0)	3	(42,9)	0	(0)	NS
Não	41	(46,6)	8	(9,1)	30	(34,1)	9	(10,2)	NS
Exposição ocupacional									
Sim	7	(87,5)	0	(0)	1	(12,5)	0	(0)	0,01*
Não	38	(43,7)	8	(9,2)	32	(36,8)	9	(10,3)	NS

* Genótipo 1 versus outros genótipos.

NS: estatisticamente não significante.

A análise da correlação entre a presença ou ausência de sintomatologia para hepatite C e o genótipo viral causador da doença não mostrou nenhuma significância estatística ($\rho = 0,16$). No entanto, o percentual de indivíduos com sintomatologia para hepatite C foi, consideravelmente, maior entre os pacientes genótipo 1 e 3. O mesmo ocorreu quando relacionou-se a manutenção de níveis elevados de ALT e AST e o genótipo viral. Nas **Tabelas 6 e 7**, são apresentados os valores percentuais obtidos neste estudo. Com relação aos níveis de transaminases dos pacientes, vale relatar que, em todos os genótipos, mais de 50% dos pacientes apresentavam níveis de transaminases alterados, sendo o percentual de indivíduos com transaminases alteradas maior entre os pacientes genótipo 1.

Observa-se um elevado índice de pessoas apresentando transaminases alteradas, mas não verificou-se nenhuma relação significativa entre esta variável, a sintomatologia da doença e o genótipo viral dos pacientes.

Tabela 6: Relação entre sintomatologia e genótipos do VHC.

Manifestações	Genótipo										
									Indeterminado		Total
clínicas	1	(%)	2	(%)	3	(%)	4	(%)	(%)		
Sintomático	11	(32)	4	(57)	6	(23)	0	(0)	3	(60)	25
Assintomático	23	(68)	3	(43)	20	(77)	1	(100)	2	(40)	49
Total	34		7		26		1		5		74

Tabela 7: Relação entre níveis de transaminases e genótipos do VHC.

Níveis de	Genótipo										
									Indeterminado		Total
ALT	1	(%)	2	(%)	3	(%)	4	(%)	(%)		
Alterados	16	(70)	2	(67)	8	(57)	1	(100)	3	(60)	30
Normais	7	(30)	1	(33)	6	(43)	0	(0)	2	(40)	16
Total	23		3		14		1		5		46

5. DISCUSSÃO

A descoberta do vírus da Hepatite C ocorreu recentemente, em 1989, há apenas 16 anos (CHOO *et al.*, 1989). A partir desta data, várias pesquisas começaram a ser feitas com o objetivo de desvendar características virais desconhecidas, como tipo de genoma, morfologia, meio de replicação e forma de transmissão (MEISEL *et al.*, 1995; MATSUURA *et al.*, 1993; BRADLEY *et al.*, 1992 e CHOO *et al.*, 1991). Estudos de epidemiologia molecular tornaram-se importantes para a análise de rotas de transmissão e de vias de disseminação virais.

Este estudo teve como objetivo realizar um estudo molecular do vírus da hepatite C em pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídeo, em Fortaleza, capital do estado do Ceará, Brasil. Pesquisas dessa natureza, normalmente, realizam o diagnóstico qualitativo do VHC e depois caracterizam o vírus isolado de acordo com os genótipos e subtipos propostos por Simmonds *et al.* em 1993. A partir da classificação viral em um dado genótipo e subtipo, torna-se possível a análise da distribuição dos vários tipos do vírus em determinadas categorias de idade e sexo, bem como a correlação destes tipos com fatores de risco para aquisição da infecção, manifestações clínicas da doença e resposta ao tratamento.

Nesta pesquisa, foi utilizada a técnica de RFLP descrita por Davidson *et al.* (1995) para classificação do VHC em genótipos. Esse método utiliza as enzimas de restrição *Hae* III, *Rsa* I, *Mva* I e *Hinf* I para realizar a genotipagem do VHC. Essa técnica permite ainda a subtipagem dos genótipos virais 1, 2 e 3 utilizando as enzimas de restrição *Bst*UI e *Scr*FI. Uma das limitações do nosso estudo deveu-se à falta das enzimas necessárias à subtipagem do VHC, ficando a análise restrita aos genótipos virais.

No início da pesquisa, enviamos amostras de soro de dois pacientes positivos para VHC à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), na Bahia, onde foram confirmados nossos resultados de PCR qualitativo e de genotipagem.

Um problema encontrado no nosso estudo foi a dificuldade para obter dados laboratoriais dos pacientes a partir dos prontuários dos mesmos. Informações importantes como: níveis recentes de transaminases (ALT e AST), resultados de biópsia hepática e presença de marcadores sorológicos para hepatite A, hepatite B, HIV e HTLV não puderam ser adquiridas de todos os pacientes. Em alguns casos, apenas um pequeno número de indivíduos possuía estas informações em seus prontuários e, no momento da entrevista, muitos pacientes não lembravam dos resultados dos exames realizados, portanto, a análise destas variáveis ficou restrita aos poucos pacientes que possuíam estes dados.

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Os pacientes com qualitativo positivo para o VHC possuíam média de idade de 44 anos, estando a distribuição das idades concentrada entre 32 e 59 anos. Oitenta e um por cento dos indivíduos deste estudo encontravam-se nesta faixa etária.

Um estudo semelhante ao nosso, realizado na Bahia com 232 pacientes positivos no teste qualitativo para VHC apresentou uma média de idade de 45 anos no sexo masculino e 39 anos no sexo feminino (PARANÁ *et al.*, 2000). Países como Estados Unidos e Itália apresentaram resultados semelhantes a esse, sempre com a média de idade da população estudada variando entre 38 e 48 anos e com a maior parte dos pacientes positivos para a doença concentrados na faixa etária de 40 a 60 anos (ANSALDI *et al.*, 2005; WILLIAMS, 1999).

Madhava e colaboradores (2002), após extensa revisão sobre a epidemiologia da hepatite C em vários países da África, relataram, que a prevalência do VHC aumentava de acordo com o aumento da média de idade da população estudada. Entre pacientes com mais de 40 anos de idade, a prevalência do VHC era maior. O mesmo foi observado por Sanchez *et al.* (2000) em estudo realizado no Peru.

Discordando um pouco desta média, Dore *et al.* (2003) mostrou, em revisão bibliográfica baseada na epidemiologia da hepatite C na Austrália, que os maiores índices de infecção pelo VHC encontravam-se entre as pessoas localizadas na faixa etária de 20 a 39 anos, mas sendo estes índices também elevados em indivíduos com 40 a 49 anos de idade. Esta frequência diminuía claramente em sujeitos com mais de 50 anos de idade.

Um outro estudo realizado no Brasil, com 89 doadores de sangue positivos no teste qualitativo para hepatite C, mostrou que a média de idade das pessoas, quando da aquisição da infecção pelo VHC correspondia a 21,1 anos. Apenas uma pessoa no estudo relatava aquisição da infecção viral após 40 anos de idade (SILVA *et al.*, 2005). Um fator que contribuiria para a maior prevalência da doença entre pessoas com mais de 30 anos de idade seria, exatamente, o fato de que a exposição ao VHC foi diminuída a partir de 1975, devido ao surgimento de seringas descartáveis e da possibilidade de transfusões sanguíneas mais seguras a partir de 1989, no mundo, e 1993, no Brasil (ANSALDI *et al.*, 2005). A maior prevalência da hepatite C entre indivíduos com mais de 40 anos de idade ocorreria pelo fato da doença comportar-se de forma assintomática e persistente nos primeiros 10 a 20 anos após a infecção inicial, e também porque o paciente infectado somente procura ajuda médica depois de transcorrido muito tempo do contato inicial com o vírus (BOOTH E THOMAS, 1996).

Pesquisa realizada na França mostrou uma prevalência máxima da infecção pelo VHC entre indivíduos com idade de 60 a 75 anos, sendo esta prevalência, interessantemente,

ainda muito elevada entre indivíduos com mais de 75 anos de idade (DESENCLOS *et al.*, 1999). Dentre os pacientes estudados em nosso trabalho, apenas um deles possuía idade superior a 75 anos (80 anos) e o resultado de seu teste qualitativo foi negativo. A expectativa de vida da população cearense (69,2 anos [IBGE, 2004]) é menor do que a expectativa de vida da população francesa. Isso explicaria o fato de que estudos feitos no Ceará, ou mesmo no Brasil, não abrangem, eficientemente, a faixa etária superior aos 70 anos de idade, ficando esses indivíduos agrupados entre os pacientes com mais de 40 anos, 50 anos, ou mais de 60 anos (PALTANIN e REICHE, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2001).

A distribuição do VHC entre os sexos ocorre de forma bem diferenciada entre os estudos e não há um padrão identificado. Normalmente, observa-se uma frequência maior do sexo masculino quando o estudo é conduzido na população em geral (CODES *et al.*, 2003; PARANÁ *et al.*, 2000 e OSELLA *et al.*, 1997). Frequentemente, estudos que envolvem apenas usuários de drogas apresentam um maior percentual de pessoas do sexo masculino, talvez pelo fato dos homens se exporem mais a este tipo de prática que as mulheres (KREKULOVA *et al.*, 2005; SHUSTOV *et al.*, 2005). Contudo, Silini *et al.* (1995b) realizaram uma pesquisa somente com usuários de drogas na qual se observou uma prevalência do sexo feminino sobre o masculino.

Estudos realizados com pessoas que se submeteram a transfusões sanguíneas mostram, em sua maioria, uma prevalência do sexo feminino. Isto ocorreria, talvez, devido ao fato das mulheres se exporem mais a procedimentos cirúrgicos (devido à gravidez) que poderiam desencadear a necessidade de uma transfusão (BELLENTANI *et al.*, 2000; SANCHEZ *et al.*, 2000; DESENCLOS *et al.*, 1999). Algumas mulheres transfundidas, ouvidas neste estudo, tinham recebido sua primeira transfusão devido a complicações no parto de algum filho.

Quanto à escolaridade dos pacientes estudados, verificou-se uma prevalência de indivíduos que haviam terminado o ensino médio completo (46,3%). Esse dado está de acordo com o que há relatado na literatura. Em estudo realizado no Peru, observou-se que pessoas com menor nível educacional possuíam maiores índices de positividade para o VHC (SANCHEZ *et al.*, 2000). Do mesmo modo, estudo realizado por Rosen *et al.* (1999) apresentou predominância da infecção pelo VHC entre pessoas que não haviam concluído o ensino superior e, em um estudo realizado na Sibéria em que 2000 indivíduos foram divididos em três grupos de estudo formados por trabalhadores da área da saúde, pacientes de duas clínicas de recuperação para pessoas viciadas em drogas ou álcool e visitantes de pacientes internados em um hospital da região; foi observado uma relação entre nível de escolaridade e soropositividade para VHC. Indivíduos com um maior nível educacional (nível superior)

possuíam menor frequência de soropositividade para VHC quando comparados a indivíduos que só possuíam o ensino médio (SHUSTOV *et al.*, 2005). Ao contrário de nossos resultados, Zarife e colaboradores (2005) encontraram uma maior prevalência de VHC em pessoas com melhor condição sócio-econômica, dado este explicado por uma maior acesso dessas pessoas a serviços de saúde.

Uma grande parte dos pacientes com qualitativo positivo estudados neste trabalho (92,6%) relataram sintomatologia para hepatite C. Devido à escolha do paciente não ter acontecido de forma randômica e dos indivíduos estudados serem aqueles que procuraram auxílio médico em um hospital, é previsível que boa parte destes pacientes apresentem sintomas apesar da doença se comportar, na maior parte dos casos, de forma assintomática (BOOTH e THOMAS, 1996).

Com relação aos níveis de transaminases, 64,5% dos pacientes com qualitativo positivo apresentaram estes níveis alterados. Em trabalho realizado por Paraná e colaboradores (2000) com pacientes candidatos a tratamento para hepatite C, foi observado que 82,4% dos indivíduos estudados possuíam níveis de ALT flutuantes ou persistentemente alterados. O fato dos pacientes serem candidatos a tratamento contribuiria para que o percentual de indivíduos com níveis de ALT alterados fosse maior; visto que, para que o paciente se submeta a tratamento para hepatite C, é necessário que haja indícios de dano hepático decorrente da infecção. No decorrer do desenvolvimento desta pesquisa, 37 pacientes avaliados iniciaram tratamento para hepatite C.

Um aspecto importante da hepatite crônica pelo VHC é, exatamente, a flutuação nos níveis de ALT ao longo do tempo, já que as fases de ALT normal podem se intercalar com valores alterados (FOCACCIA *et al.*, 2003). Estudo comparativo realizado entre pacientes com infecção aguda e crônica pelo VHC mostrou que a maioria dos pacientes com hepatite aguda apresenta níveis elevados de ALT, entretanto, nos casos de hepatite crônica foi observado uma proporção significativa dos pacientes com níveis de ALT normais (CHAUDHURI *et al.*, 2005). Desta forma, vários autores concordam que os níveis de ALT não devem ser os únicos marcadores utilizados como preditivo de infecção pelo VHC (BUSEK *et al.*, 2002; SANTANA *et al.*, 2001 e SILINI *et al.*, 1995a). Neste trabalho, não houve correlação significativa entre os níveis de transaminases e o resultado no teste qualitativo para VHC.

De acordo com Silva e colaboradores (2005), os níveis de transaminases podem ser relacionados com a severidade da lesão hepática, quanto maior o nível de AST ou ALT mais avançado o estágio de fibrose encontrado. Contradizendo este dado, Focaccia e colaboradores (2003) afirmaram que na hepatite crônica pelo VHC, os níveis de

transaminases, particularmente de ALT, podem não guardar relação direta com a gravidade das lesões histológicas. Em nosso estudo, apenas 14 pacientes possuíam ambos resultados de transaminases e de biópsia hepática, outros pacientes possuíam apenas um destes resultados, deste modo, a análise da correlação entre essas duas variáveis não foi possível de ser realizada.

5.2 FATORES DE RISCO

A hepatite C foi várias vezes nomeada como hepatite pós-transfusional devido a sua associação à transmissão por transfusões sanguíneas, antes que começasse a ser feito a pesquisa de anti-VHC nos bancos de sangue (ALTER *et al.*, 1975).

Neste estudo, 44% dos pacientes (53/120) que relataram submissão à transfusão sanguínea foram positivos no teste qualitativo para VHC, sendo esse um dos fatores de risco mais presentes entre os indivíduos, ficando atrás apenas de história clínica de cirurgia.

É provável que a expressiva presença da transfusão sanguínea como fator de risco, observada entre os indivíduos deste estudo, deva-se também à campanha promovida pelo Ministério da Saúde durante todo o ano de 2004. Esta campanha orientava para que as pessoas que tivessem recebido transfusão antes do ano de 1993 seguissem a um posto de saúde e fizessem o teste sorológico para hepatite C. Como o Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) é referência no controle e tratamento de hepatites virais no estado, os pacientes com teste anti-VHC positivo, provenientes dos postos de saúde do estado ou dos bancos de sangue, foram, em sua maioria, encaminhados para este hospital.

Estudo desenvolvido na cidade de Londrina, Paraná, com 183 pacientes com teste anti-VHC positivo apresentou distribuição dos fatores de risco semelhante a do nosso estudo, com 33,3% dos indivíduos infectados com o VHC tendo recebido transfusão sanguínea (VOGLER *et al.*, 2004). Segundo o trabalho de Paraná e colaboradores (2000), a transfusão sanguínea foi o fator de risco para infecção pelo VHC mais presente entre 232 indivíduos VHC positivos. Neste estudo, história clínica de cirurgia não foi considerada como um fator de risco para aquisição da infecção.

Na Itália, Bellentani e colaboradores (2000) relataram que a prevalência de anticorpos anti-VHC em pacientes que receberam transfusão sanguínea é de 6%. Diversos estudos observaram que quanto maior número de transfusões sanguíneas maior o risco de infecção pelo VHC, sendo este risco claramente maior entre hemofílicos, com prevalência de até 87% (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; DORE *et al.*, 2003; BUSEK *et al.*, 2002 e BELLENTANI *et al.*, 2000).

Neste trabalho, não foi observada diferença significativa quando se relacionou o ano da transfusão sangüínea (se antes ou depois de 1993) e o resultado do teste qualitativo. Contrariamente, estudos realizados com pacientes submetidos à hemodiálise observaram que pessoas que tinham se submetido à transfusão antes de 1993 eram mais propícias a serem positivas para a infecção pelo VHC que aquelas que tinham se submetido à transfusão após esta data (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2005). Prati (2002) relatou que o risco de aquisição de infecções hepatotrópicas através da transfusão de sangue é de 20 casos por um milhão de unidades de sangue. Forcic e colaboradores (2001) pesquisaram o RNA do VHC em 2718 *pools* de plasma considerados anti-VHC negativos e 2,1% das amostras foram positivas no teste molecular. Conclui-se que, apesar dos testes sorológicos para hepatite C estarem cada vez mais sensíveis, está claro que estes testes não são 100% eficientes e que o risco atual de aquisição do VHC através de transfusão sangüínea ainda existe, principalmente devido à fase de janela imunológica da infecção (FORCIC *et al.*, 2005; ALLAIN, 2003).

A estratégia adotada no Brasil, atualmente, para prevenção da transmissão da hepatite C associada à transfusão sangüínea baseia-se no teste para anti-VHC e na determinação dos níveis de ALT quando da doação de sangue. Todos os casos de positividade para o anticorpo anti-VHC ou níveis elevados de ALT são descartados (GONÇALES *et al.*, 2000). Apesar de todos os cuidados, há uma pressão por parte da população (principalmente daqueles indivíduos infectados pela hepatite C ou com parentes ou amigos infectados) para que os bancos de sangue substituam o diagnóstico sorológico para pesquisa de anti-VHC pelo diagnóstico molecular (pesquisa do RNA viral no soro do paciente). Segundo Gonçalves *et al.* (2000), o teste RIBA-2, utilizado nos bancos de sangue, apresenta 87,9% de concordância com o teste qualitativo para hepatite C, sendo este um índice de concordância aceitável. Neste estudo, seis casos indeterminados segundo o RIBA-2 foram positivos na RT-nested PCR. Atualmente, é questionado se a relação custo-benefício justificaria a adoção de uma rotina diagnóstica baseada em técnicas de biologia molecular para o *screening* de doadores de sangue. Prati (2002) afirma que os testes sorológicos utilizados atualmente são perfeitamente adequados para minimizar a contaminação de indivíduos através da transfusão sangüínea e que os recursos necessários à implementação de novos testes diagnóstico seriam melhor aproveitados se empregados na prevenção e tratamento da infecção.

De outra forma, atualmente, o uso de drogas intravenosas é a principal forma de transmissão da hepatite C e o principal meio de manutenção da infecção por este vírus nas populações (SHEPARD *et al.*, 2005; DORE *et al.*, 2003). Em nosso estudo, vinte e cinco pacientes relataram uso de drogas. Não fizemos distinção dos usuários de drogas entre as categorias de drogas injetáveis ou cocaína inalada, como é visto em alguns estudos, devido ao

pequeno número de pacientes que apresentavam este comportamento como fator de risco. Incluímos, também, no grupo de usuários de drogas, os pacientes que tinham feito uso de Gluconergan® (droga energética composta por 25% de vitamina C, 25% de glicose e etilamina-3-fenil-norcanfano), devido à administração deste composto ocorrer através de injeções intravenosas e de, muitas vezes, ser feita através do compartilhamento de agulhas.

Noventa e seis por cento dos indivíduos usuários de drogas estudados foram positivos no teste qualitativo para VHC ($p = 0,04$). Este dado concorda com o que é informado na literatura. Segundo Shepard *et al.* (2005), a prevalência do VHC entre usuários de drogas varia de 64 a 94%, sendo maior quanto maior o tempo de exposição a este fator de risco. Neste mesmo trabalho, foi observado que a prevalência do VHC entre jovens usuários de drogas era de 60%, o que sugeria que a infecção pelo VHC ocorreria rapidamente após iniciada a prática de injeções. Na Austrália, verifica-se um aumento no nível de incidência do VHC quando este é analisado em relação a jovens usuários de drogas menores de 20 anos (DORE *et al.*, 2003). Na Bélgica, o comportamento da infecção pelo VHC entre os usuários de drogas ocorreu de forma contrária ao que foi visto na Austrália, lá o VHC esteve mais presente entre indivíduos mais velhos que entre os mais novos, talvez porque o tempo de exposição ao fator de risco fosse muito maior (MATHEI *et al.*, 2005). Estudo realizado por Silini e colaboradores (1995b) com usuários de drogas apresentou média de idade destes pacientes de 29,4 anos, relatando uma alta prevalência do VHC entre indivíduos jovens. No nosso estudo, a média de idade dos usuários de drogas foi de 46 anos.

Estudo sorológico realizado em Londrina apresentou somente 6,7% de prevalência do uso de drogas como fator de risco para hepatite C (VOGLER *et al.*, 2004). A prevalência do VHC varia bastante de acordo com o grupo específico estudado. Entre prisioneiros na Austrália foi observado positividade para anti-VHC de 77,3% entre os usuários de drogas (HELLARD *et al.*, 2004).

Em estudo realizado na Bahia com 127 pacientes positivos para VHC e com genótipo 1 ou 3, apenas 9 indivíduos relataram uso de drogas injetáveis ilícitas e 7 usavam cocaína inalada, contudo 16 pacientes relataram compartilhamento de seringas para aplicação de complexos vitamínicos, perfazendo 25,2% de frequência do uso de drogas como fator de risco dos pacientes deste estudo. Neste estudo, foi apontado que a frequência do uso de drogas entre a população brasileira não é tão alta quanto a frequência observada em outros países do mundo (CODES *et al.*, 2003).

O Gluconergan® era frequentemente usado por jogadores de futebol nas décadas de 70 e 80. Todos os indivíduos usuários de Gluconergan® estudados neste trabalho (12 pacientes) foram positivos no teste qualitativo para VHC. Estudo realizado por Souto e

colaboradores (2003) com 40 ex-jogadores de futebol, apresentou 3 casos confirmadamente positivos para hepatite C. Apesar da positividade apresentada no estudo ter sido, relativamente, baixa; ela ainda mostra uma maior probabilidade do indivíduo possuir hepatite C quando enquadrado dentro do grupo de ex-jogadores de futebol que quando estando na população em geral. Os pacientes entrevistados por Souto não sabiam informar que tipo de complexo vitamínico era administrado a eles, mas foi confirmado que a administração destas drogas ocorria, realmente, através do compartilhamento de seringas e agulhas com outros jogadores. Um outro estudo realizado no Brasil que menciona a importância do uso de Gluconergan® na transmissão da hepatite C foi o realizado por Silva *et al.* (2005) entre doadores de sangue com sorologia positiva para VHC. Neste estudo, 41 indivíduos entrevistados relataram uso de Gluconergan® e 21 deles tinham o uso de Gluconergan® como único fator de risco envolvendo a transmissão do VHC.

A possibilidade de transmissão sexual do VHC ainda gera controvérsias entre os autores. Segundo Wejstal (1999), não foi observada a presença do VHC em amostras de sêmen e secreção vaginal de indivíduos infectados pelo vírus, contudo a análise da prevalência do VHC entre parceiros de sujeitos infectados acusou uma prevalência maior nestes indivíduos que aquela observada na população em geral. Da mesma forma, a prevalência de infecção pelo VHC foi maior em indivíduos com múltiplos parceiros sexuais que entre a população em geral. Stroffolini e colaboradores (2001) sugerem que a transmissão da hepatite C entre parceiros ocorreria não devido a transmissão sexual, mas sim decorrente da exposição do casal aos mesmos fatores de risco para aquisição da doença.

Constava em nosso questionário uma pergunta acerca do parceiro do indivíduo entrevistado. Quarenta e quatro pacientes estavam informados a respeito do exame anti-VHC do parceiro e, dentre esses, cinco indivíduos relataram anti-VHC do parceiro positivo. Uma possível fonte de erro em nosso estudo é que os parceiros não foram realmente testados. Os dados basearam-se somente nas respostas dos pacientes do estudo. Desta forma, não podemos criar hipóteses a respeito da possibilidade de transmissão sexual entre os indivíduos estudados.

A maioria dos pacientes abordados nesta pesquisa eram homens e mulheres de meia-idade, casados e que possuíam somente um parceiro sexual. Consideramos o fato do paciente ter possuído DST em algum momento de sua vida como um indício de comportamento sexual de risco para a infecção pelo VHC, devido à presença de DST estar associada a comportamento sexual promíscuo e sem cuidados de segurança. Oitenta e oito por cento dos pacientes com história de DST prévia foram positivos no teste qualitativo para

VHC. Todavia, boa parte dos pacientes que relataram história de DST prévia possuíam ainda outros fatores de risco, como uso de drogas ou história clínica de cirurgia.

Na Sibéria, observou-se que riscos sexuais significantes pertenciam a pessoas que possuíam mais de quatro parceiros sexuais durante sua história de vida, tinham comportamento homossexual, ou àquelas com história de doença sexualmente transmitida. (SHUSTOV *et al.*, 2005).

A hemodiálise como fator de risco para infecção se apresentou em apenas 7,3% dos pacientes. Estudo anterior realizado com 752 pacientes de 12 clínicas de hemodiálise de Fortaleza, apresentou prevalência de anti-VHC de 52%, sendo o tempo de hemodiálise fator significativo para esta positividade (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Estudo realizado no Brasil com pacientes submetidos à hemodiálise mostrou uma média de prevalência do VHC de 28,2% (CARNEIRO *et al.*, 2005). Estudo feito em Recife com 249 pacientes de clínicas de hemodiálise mostrou prevalência da doença entre os indivíduos de 8,4%. Este estudo utilizou a PCR para avaliar a positividade dos pacientes para o VHC (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005).

Shustov e colaboradores (2005) relataram em seu estudo realizado na Sibéria com 2000 pacientes que o fato do indivíduo trabalhar na área da saúde e se expor a riscos como cortes com agulhas ou bisturis e contato da pele lesada ou membranas mucosas com sangue de pacientes não constituía impacto significativo na soropositividade para VHC.

Contudo, casos de acidentes ocorridos com profissionais da área da saúde resultando em transmissão do VHC não são raros. Hosoglu e colaboradores (2003) relataram um caso de uma enfermeira que se contaminou com o VHC a partir de um acidente ocorrido quando tratava de um paciente com hepatite C. Neste caso, uma amostra de sangue do paciente infectado, acidentalmente, foi atirada sobre o rosto da enfermeira e entrou em contato com a mucosa da conjuntiva da profissional. Três meses após este contato inicial, a enfermeira estava com os índices de transaminases alterados e com alguns sintomas de problema hepático. Os pacientes estudados neste trabalho que relataram risco ocupacional como fator de risco para infecção pelo VHC eram enfermeiros, auxiliares e técnicos de enfermagem. Entre eles havia, também, um balconista de farmácia que poderia ter se exposto ao vírus por ter a função de aplicar injeções e medicamentos.

SHUSTOV *et al.* (2005) não observaram significância na relação entre a submissão a intervenções cirúrgicas, anestésias gerais ou tratamentos dentários e a transmissão do VHC. Contudo, na África, estima-se que 50% das injeções aplicadas na população sejam feitas de forma inadequada, sem os devidos cuidados de higiene e segurança.

Desta forma, o uso de seringas e agulhas não-estéreis seria uma importante forma de disseminação do VHC no país (MADHAVA *et al.*, 2002).

O risco de transmissão do VHC não ocorreria somente durante o procedimento cirúrgico em si, mas durante todo e qualquer tipo de procedimento que envolvesse a manipulação de materiais perfuro-cortantes, bem como durante a injeção de medicamentos. A maior parte dos pacientes estudados já tinham se submetido a algum tipo de cirurgia. No entanto, além da cirurgia como fator de risco, muitos deles apresentavam um outro comportamento passível de ocasionar infecção pelo VHC, como submissão a transfusão sanguínea, uso de drogas, história de DST prévia ou hemodiálise. Deste modo, não foi possível ter uma estimativa real do risco de infecção ocasionado pela submissão à cirurgia.

Em estudo realizado na Sibéria, a tatuagem só constituiu fator de risco para infecção pelo VHC quando apresentada por presidiários que a tinham feito em institutos de detenção (SHUSTOV *et al.*, 2005).

Uma pequena porcentagem (10,4%) dos indivíduos estudados possuía tatuagem. Segundo Nishioka e Gyorkos (2001), a tatuagem constitui um meio totalmente passível de transmissão de hepatite C, hepatite B, HIV e, até mesmo, sífilis. Todavia, em nosso trabalho a determinação de tatuagem como fator de risco não foi significativa para a positividade do VHC no teste qualitativo.

5.3 MARCADORES SOROLÓGICOS

No nosso estudo, 80% dos pacientes foram positivos no teste qualitativo para VHC. Entretanto, doze pacientes com sorologia positiva para hepatite C foram negativos no teste qualitativo. Segundo Bukh e colaboradores (1992), a negatividade no teste qualitativo com anti-VHC positivo pode ocorrer por vários fatores. Um deles seria a possibilidade da quantidade de vírus presente na amostra de soro estar abaixo do limite de detecção do teste. O limite de detecção do teste utilizado no nosso estudo é de 10U/mL, correspondendo a um dos testes mais sensíveis existentes, no entanto, o risco de resultado falsamente negativo devido à concentração viral no soro do paciente é ainda possível. Um outro fator que explicaria essa negatividade no teste qualitativo seria a realização do anti-VHC no início da infecção e, quando da realização do PCR qualitativo, o paciente já estaria curado da mesma. Uma outra possibilidade seria a perda do ácido nucléico viral durante a manipulação do material. Exatamente para evitar este tipo de risco, todos os resultados negativos no teste qualitativo eram repetidos para haver confirmação.

Em estudo prospectivo realizado na Itália por Ansaldi e colaboradores (2005), 3577 amostras de soro de pacientes de vários hospitais italianos foram testadas para

anticorpos anti-VHC. Noventa e cinco dessas amostras foram positivas tanto no teste ELISA como no western-blot para VHC, contudo, em apenas 50 exemplares, foi possível a detecção do RNA do VHC. Essa baixa positividade do teste qualitativo frente ao teste ELISA poderia ser explicada pelo fato das amostras de soro serem provenientes dos anos de 1996 e 1997 e estarem congeladas a algum tempo, talvez sob condições não tão apropriadas à conservação do material genético viral. De acordo com José e colaboradores (2005), o RNA do VHC se conservaria estável por bastante tempo quando conservado em freezers à -20°C ou à -70°C . Estes autores estudaram a viabilidade de soros previamente positivos no teste qualitativo para VHC após cinco anos de estocagem. Seus resultados não mostraram diminuição dos níveis do RNA do VHC, mesmo após cinco anos de armazenamento do soro à -20°C . Esse estudo também não mostrou diferença significativa na redução dos títulos de RNA do VHC quando foram comparadas a armazenagem do material à -20°C ou à -70°C .

Acredita-se que na co-infecção do VHC com VHB ocorra a supressão da replicação de um dos dois vírus. Isso atuaria sobre o padrão de produção de anticorpos para as proteínas virais. Considera-se que na hepatite C o anti-HBc positivo é bem mais freqüente que o HBsAg positivo (FOCACCIA *et al.*, 2003).

Em estudo realizado com 35 pacientes co-infectados com VHC e VHB, foi observado positividade para os dois vírus na pesquisa de ácidos nucléicos em somente cinco indivíduos. Na maioria dos casos, os pacientes apresentavam positividade no teste qualitativo para somente um vírus, ou mesmo para nenhum dos dois vírus (SQUADRITO *et al.*, 2002). Em pacientes positivos para HBsAg, foi observada uma falta de detecção do DNA do VHB quando da co-infecção com VHC, refletindo uma forte supressão da replicação viral. Do mesmo modo, níveis indetectáveis de RNA do VHC podem ser encontrados em pacientes co-infectados com o VHB, apesar destes indivíduos apresentarem positividade para anti-VHC. No estudo realizado por Squadrito e colaboradores (2002), foi observada maior supressão do vírus da hepatite B, frente à co-infecção com o vírus da hepatite C.

Em nosso estudo, nenhum dos pacientes positivos para VHC eram co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em Fortaleza, o Hospital São José de Doenças Infecciosas é o responsável pelo acompanhamento e tratamento dos pacientes co-infectados com estes dois vírus. Estudos posteriores realizados com pacientes desta instituição poderiam informar a respeito do comportamento da infecção pelo VHC nestes indivíduos co-infectados. Segundo Matthews-Greer *et al.* (2001), os níveis de VHC presentes em indivíduos co-infectados com o HIV são significativamente mais altos que os níveis virais apresentados por pacientes infectados somente com o VHC. O risco de transmissão sexual do VHC também é

maior quando o paciente infectado pelo VHC é co-infectado pelo HIV (KEISERMAN *et al.*, 2003).

A positividade para o anticorpo anti-VHA IgM foi observada em somente um indivíduo positivo no teste qualitativo para VHC. Estudo realizado por Devalle *et al.* (2003) com 197 pacientes com sorologia positiva para o VHC apresentou positividade para anti-VHA IgM em apenas 3 indivíduos. Oitenta e seis por cento dos pacientes avaliados neste trabalho possuíam anticorpos totais para anti-VHA, mostrando infecção passada pelo VHA e imunidade a este vírus. Em nosso estudo, só foi pesquisado o anticorpo anti-VHA IgM, desta forma, não possuímos dados a respeito da frequência de positividade para anti-VHA total na população analisada. Devalle *et al.* (2003) sugeriram, em seu estudo, a vacinação das pessoas não imunes ao HVA, a fim de evitar a ocorrência de casos de hepatite fulminante devido à associação VHA e VHC.

5.4 GENÓTIPOS

A distribuição dos genótipos do VHC no mundo comporta-se de forma heterogênea. Alguns genótipos, como 1a, 2a, e 2b, apresentam ampla distribuição mundial, já outros, como os genótipos 5 e 6, encontram-se limitados a determinadas regiões do mundo (Webster *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, relatamos a detecção dos genótipos 1, 2, 3 e 4 nos 96 indivíduos com resultado positivo no teste qualitativo. Contudo, nove amostras foram submetidas ao processo de genotipagem e apresentaram resultado inconclusivo. Esta dúvida no resultado da genotipagem foi observada em amostras que possuíam resultado fracamente positivo no teste qualitativo. Os casos fracamente positivos na PCR, quando submetidos à genotipagem, apresentavam bandas muito fracas e pouco nítidas e, algumas vezes, estas bandas eram totalmente invisíveis. Este tipo de padrão impossibilitava a determinação de um resultado. As amostras com qualitativo positivo e sem genótipo determinado foram nomeadas indeterminadas.

O genótipo 4 foi detectado em um paciente do sexo masculino, de 50 anos de idade, que possuía como fatores de risco para infecção uma transfusão sanguínea recebida em 1968 e uma infecção anterior por gonococos. Este genótipo não tinha sido detectado em nenhum estudo realizado anteriormente com a população de Fortaleza ou da região Nordeste do Brasil (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; BUSEK e OLIVEIRA, 2003; PARANÁ *et al.*, 2000 e OLIVEIRA *et al.*, 1999). O genótipo 4 do VHC é, frequentemente, associado à infecção nos países da África Central e, principalmente, no Egito (WEBSTER *et al.*, 2000 e GOHARY *et al.*, 1995). No Brasil, o genótipo 4 do VHC tinha sido detectado somente em estados do

Sudeste do país e em frequência bastante baixa, variando de 0,2 a 0,7% (CAMPIOTTO *et al.*, 2005 e OLIVEIRA *et al.*, 1999). Nos Estados Unidos, o genótipo 4 viral apresenta prevalência de 1,1% e está, frequentemente, associado à transmissão através do uso de drogas intravenosas ou por uso de cocaína inalada (LYRA *et al.*, 2004). A análise filogenética do ácido nucléico viral isolado deste paciente é importante para que se confirme a detecção deste genótipo e para que se possa sugerir a origem da entrada deste tipo viral no estado.

Os genótipos 5 e 6 do VHC encontram-se limitados a algumas áreas do mundo. O genótipo 5 é responsável por 30 a 50% dos casos de hepatite C na África do Sul, enquanto que o genótipo 6 encontra-se concentrado em áreas de Hong Kong, Macau e Vietnã (WEBSTER *et al.*, 2000). No Brasil, mais precisamente em São Paulo, foram detectados três casos de infecção pelo VHC associada ao genótipo 5 viral em pacientes nascidos no Brasil e que nunca tinham viajado para outros países (LEVI *et al.*, 2002).

Paraná e colaboradores (2000) realizaram estudo com a população de Salvador infectada pelo VHC, na procura de genótipos virais característicos da população africana, visto que 80% da população daquela cidade é formada por afro-brasileiros ou mulatos. Contudo, nesse estudo, não foram detectados os genótipos 4 e 5 do VHC, os mais presentes dentre a população da África. Segundo FARIAS (1997), a população cearense é formada por descendentes de portugueses e escravos. Os escravos que vinham trabalhar nas plantações de cana-de-açúcar ou algodão eram provenientes da região da África Central, principalmente dos países do Congo e Angola. A região da África Central é infectada, principalmente, pelos genótipos do VHC 4 e 5. Estudos de natureza filogenética seriam importantes para avaliar a similaridade entre os genótipos do VHC presentes no Ceará e os genótipos do VHC apresentados nos países africanos. Análises moleculares das seqüências das regiões NS5 do genoma viral permitiriam a determinação da similaridade dos isolados e da distância temporal presente entre eles, o que informaria a quanto tempo estes vírus poderiam ter sido separados (THIERS *et al.*, 2000).

Estudo feito na Índia, com pacientes portadores de sintomas de doença hepática, mostrou uma distribuição dos genótipos bem distinta da distribuição vista neste trabalho. O genótipo 1b apresentava frequência de 9,6%, genótipos 2a e 2b somavam 1,5%, enquanto que os genótipos mais frequentes foram 3a (34,7%) e 3b (47,7%). Das 375 amostras analisadas no estudo, somente 17 (1,2%) não puderam ser genotipadas pelo método baseado na amplificação do genoma viral (CHAUDHURI *et al.*, 2005). Estudo anterior feito em 2003 (RAGHURAMAN *et al.*, 2003) já reportava a prevalência do genótipo 3 no país, no entanto, apesar de apenas 90 pacientes terem se submetido à genotipagem, além dos genótipos 1, 2 e 3,

a população de estudo apresentou também o genótipo 4 (5,5%), com frequência superior a do genótipo 2 (com 1 paciente).

Em estudo feito com pacientes húngaros e austríacos, observou-se clara predominância do genótipo 1 nas duas populações. Todos os indivíduos da Hungria analisados apresentaram genótipo 1, sendo o subtipo 1b o mais presente. Nos sujeitos austríacos, além do genótipo 1, foram detectados pacientes com os genótipos 2 e 3. Nesses indivíduos o subtipo 1b também foi mais presente. Análises filogenéticas dos genótipos 1 encontrados na Hungria revelaram alta identidade de seqüência entre os isolados (MULLER *et al.*, 2003).

A distribuição dos genótipos do VHC apresentada em um trabalho desenvolvido na Sibéria mostrou grande similaridade com a distribuição genotípica observada neste estudo. Naquele país, após genotipagem de 388 isolados do VHC, relatou-se prevalência do genótipo 1b (50,3%), seguido bem próximo pelo genótipo 3a (44,8%) e, logo depois, pelos genótipos 2a e 2c (4,4% e 0,3%, respectivamente) (SHUSTOV *et al.*, 2005).

Estudos realizados anteriormente no Brasil mostraram prevalência do genótipo 3 do VHC no estado do Ceará, contudo este estudo foi realizado com apenas dez pacientes provenientes de uma mesma clínica de hemodiálise. Neste caso, a possibilidade de contaminação nosocomial era bastante alta (BUSEK e OLIVEIRA, 2003). Estudo mais recente realizado por Campiotto e colaboradores (2005) mostraram uma distribuição dos genótipos na região nordeste da seguinte forma: 66,4% de prevalência do genótipo 1, seguido por 30,4% de prevalência do genótipo 3 e por último, 3,0% de prevalência do genótipo 2. Vinte e três pacientes provenientes do Ceará foram analisados no estudo de Campiotto e colaboradores (2005).

Na Itália, genótipos 3 e 4 foram detectados somente em pacientes com mais de 31 anos de idade e o genótipo 1b tornou-se mais prevalente em pacientes que tinham de 46 a 60 anos, ou mais de 60 anos que em pacientes de 2 a 14 anos, mesmo sendo o genótipo mais presente entre crianças e adultos jovens. (ANSALDI *et al.*, 2005). Em nosso estudo, não foi observado nenhum tipo de correlação significativa no que diz respeito à distribuição dos genótipos entre fatores de risco ou categorias de idade.

Infecções causadas por mais de um genótipo do VHC foram detectadas em estudos realizados por Schröter e colaboradores (2003) e Bowden *et al.* (2005). Essas múltiplas infecções estão comumente associadas a pacientes com múltiplas exposições aos fatores de risco para VHC, como usuários de drogas injetáveis e hemofílicos. Em nosso estudo, não foi detectado nenhum caso de infecção pelo VHC devido a mais de um genótipo viral, entretanto, é provável que a metodologia utilizada em nosso trabalho não possibilite este

tipo de detecção. No estudo realizado por Schröter e colaboradores (2003), foi utilizado o seqüenciamento da região 5' não-codificadora do genoma viral para genotipagem do VHC, enquanto que Bowden e colaboradores (2005) utilizaram o seqüenciamento da região do core viral na genotipagem.

Apesar do que é relatado na literatura, no nosso estudo não foi observada nenhuma correlação significativa entre a distribuição dos genótipos e os fatores de risco para a infecção pelo VHC (exceto a relação visualizada entre genótipo 1 e exposição ocupacional). Da mesma forma, não foi observada nenhuma relação significativa entre a faixa etária dos pacientes e os genótipos apresentados. Estudos complementares, possibilitando o diagnóstico viral a nível de tipos e subtipos e tendo como população alvo somente um grupo de risco para infecção pelo VHC (como usuários de drogas, transfundidos, pacientes sob hemodiálise), poderiam esclarecer um pouco mais a respeito da epidemiologia molecular deste vírus em Fortaleza.

6. CONCLUSÕES

- A positividade observada no teste qualitativo para hepatite C foi de 80%, dentre as 120 amostras analisadas.
- A história clínica de cirurgia foi o fator de risco mais presente na população de estudo, com frequência de 73%.
- O uso de drogas foi o fator de risco que teve maior associação com positividade no teste qualitativo para hepatite C, com 96% dos indivíduos positivos neste teste.
- O genótipo 1 foi o mais prevalente dentro da população estudada, contradizendo estudos anteriores realizados no Ceará que apontavam o genótipo 3 como o mais prevalente neste estado.
- Entre os genótipos virais observados neste estudo, foi detectado um paciente com genótipo 4, tipo este não relatado antes nesta cidade.
- Na análise entre os genótipos virais e os fatores de risco para a infecção pelo VHC, foi observada uma maior prevalência do genótipo 1 entre os indivíduos que possuíam como fator de risco para a infecção a exposição ocupacional e esta associação foi estatisticamente significativa.
- A distribuição dos genótipos virais entre as categorias de idade, fatores de risco e manifestações clínicas comportou-se de forma bem homogênea neste estudo.
- O emprego de técnicas de seqüenciamento será necessário para a identificação das amostras com genótipo indeterminado e para a confirmação do genótipo 4.

07. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID K, QUADRI R, VEUTHEY AL, HADENGUE A, NEGRO F. A novel hepatitis C virus (HCV) subtype from Somalia and its classification into HCV clade 3. **J Gen Virol.** V. 81(Pt 6), p. 1485-93, 2000.

AIZAKI H, LEE KJ, SUNG VM, ISHIKO H, LAI MM. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. **Virology.** V. 324(2), p. 450-61, 2004.

ALBUQUERQUE AC, COELHO MR, LOPES EP, LEMOS MF, MOREIRA RC. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 100(5), p. 467-70, 2005.

ALLAIN JP. Transfusion risks of yesterday and of today. **Transfus Clin Biol.** V. 10(1), p. 1-5, 2003.

ALTER HJ, HOLLAND PV, MORROW AG, PURCELL RH, FEINSTONE SM, MORITSUGU Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. **Lancet.** V. 2(7940), p. 838-41, 1975.

ALTER HJ, PURCELL RH, GERIN JL, LONDON WT, KAPLAN PM, MCAULIFFE VJ, WAGNER J, HOLLAND PV. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. **Infect Immun.** V. 16(3), p. 928-33, 1977.

AMPLICOR HCV MONITOR TEST V 2.0, **Roche Diagnostic Systems**, Germany.

ANSALDI F, BRUZZONE B, SALMASO S, ROTA MC, DURANDO P, GASPARINI R, ICARDI G. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. **J Med Virol.** V. 76(3), p. 327-32, 2005.

BALAYAN MS, ANDJAPARIDZE AG, SAVINSKAYA SS, KETILADZE ES, BRAGINSKY DM, SAVINOV AP, POLESCHUK VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirology.** V. 20(1), p. 23-31, 1983.

BANCROFT WH, SNITBHAN R, SCOTT RM, TINGPALAPONG M, WATSON WT, TANTICHAROENYOS P, KARWACKI JJ, SRIMARUT S. Transmission of hepatitis B virus to gibbons by exposure to human saliva containing hepatitis B surface antigen. **J Infect Dis.** V. 135(1), p. 79-85, 1977.

BARTENSCHLAGER R, KAUL A, SPARACIO S. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. **Antiv Res.** V. 60(1), p. 91-102, 2003.

BATALLAN A, FAUCHER P, PONCELET C, DEMARIA F, BENIFLA JL, MADELENAT P. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: recent news about the benefit of caesarean sections. **Gynecol Obstet Fertil.** V. 31(11), p. 964-8, 2003.

BELEC L, LEGOFF J, SI-MOHAMED A, BLOCH F, MATTA M, MBOPI-KEOU FX, PAYAN C. Cell-associated, non-replicating strand(+) hepatitis C virus-RNA shedding in cervicovaginal secretions from chronically HCV-infected women. **J Clin Virol.** V. 27(3), p. 247-51, 2003.

BELLENTANI S, MIGLIOLI L, MASUTTI F, SACCOCCIO G, TIRIBELLI C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Italy: the slowly unraveling mystery. **Microbes Infect.** V. 2(14), p. 1757-63, 2000.

BOND WW, FAVERO MS, PETERSEN NJ, GRAVELLE CR, EBERT JW, MAYNARD JE. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. **Lancet.** V. 1(8219), p. 550-1, 1981.

BOOTH JC, THOMAS HC. Pathogenesis of chronic hepatitis C and associated clinical manifestations. **Baillieres Clin Gastroenterol.** V. 10(2), p. 257-74, 1996.

BOROWSKI P, SCHALINSKI S, SCHMITZ H. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. **Antiviral Res.** V. 55(3), p. 397-412, 2002.

BOST-BRU C. The pediatrician and hepatitis C virus. **Arch Pediatr.** V. 6(10), p. 1122-5, 1999.

BOWDEN S, MCCAWE R, WHITE PA, CROFTS N, AITKEN CK. Detection of multiple hepatitis C virus genotypes in a cohort of injecting drug users. **J Viral Hepat.** V. 12(3), p. 322-4, 2005.

BRADLEY DW, BEACH MJ, PURDY MA. Recent developments in the molecular cloning and characterization of hepatitis C and E viruses. **Microb Pathog.** V. 12(6), p. 391-8, 1992.

BRADLEY DW, COOK EH, MAYNARD JE, MCCAUSTLAND KA, EBERT JW, DOLANA GH, PETZEL RA, KANTOR RJ, HEILBRUNN A, FIELDS HA, MURPHY BL. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. **J Med Virol.** V. 3(4), p. 253-69, 1979.

BRADLEY DW, MAYNARD JE. Etiology and natural history of post-transfusion and enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. **Semin Liver Dis.** V. 6(1), p. 56-66, 1986.

BRECHOT C. Hepatitis C virus: molecular biology and genetic variability. **Dig Dis Sci.** V. 41(12 Suppl), p. 6S-21S, 1996.

BRECHOT C. La biologie du virus de l'hépatite C: les implications cliniques. **Ver Méd Interne.** V. 18(1), p. 893-905, 1997.

BUKH J, PURCELL RH, MILLER RH. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. **Proc Natl Acad Sci U S A.** V. 89(1), p. 187-91, 1992.

BUSEK S, OLIVEIRA G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genet Mol Res.** V. 2(1), p. 117-23, 2003.

BUSEK SU, BABA EH, TAVARES FILHO HA, PIMENTA L, SALOMAO A, CORREA-OLIVEIRA R, OLIVEIRA GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 97(6), p. 775-8, 2002.

BUTI M, MENDEZ C, SCHAPER M, SAULEDA S, VALDES A, RODRIGUEZ-FRIAS F, JARDI R, ESTEBAN R. Hepatitis C virus Core Antigen as a predictor of non-response in genotype 1 chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirin. **J Hepatol.** V. 40(3), p. 527-32, 2004.

CAMPIOTTO S, PINHO JR, CARRILHO FJ, DA SILVA LC, SOUTO FJ, SPINELLI V, PEREIRA LM, COELHO HS, SILVA AO, FONSECA JC, ROSA H, LACET CM, BERNARDINI AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** V. 38(1), p. 41-9, 2005.

CAREDDA F, ANTINORI S, PASTECCHIA C, MORONI M. HBV/HDV coinfection. **Lancet.** V. 2(8556), p. 455, 1987.

CARNEIRO MA, MARTINS RM, TELES SA, SILVA SA, LOPES CL, CARDOSO DD, VANDERBORGHT BO, YOSHIDA CF. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 96(6), p. 765-9, 2001.

CARNEIRO MA, TELES SA, DIAS MA, FERREIRA RC, NAGHETTINE AV, SILVA SA, LAMPE E, YOSHIDA CF, MARTINS RM. Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 100(4), p. 345-9, 2005.

CHAN SW, MCOMISH F, HOLMES EC, DOW B, PEUTHERER JF, FOLLETT E, YAP PL, SIMMONDS P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. **J Gen Virol.** V. 73 (Pt 5), p. 1131-41, 1992.

CHAUDHURI S, DAS S, CHOWDHURY A, SANTRA A, BHATTACHARYA SK, NAIK TN. Molecular epidemiology of HCV infection among acute and chronic liver disease patients in Kolkata, India. **J Clin Virol.** V. 32(1), p. 38-46, 2005.

CHIBA J, OHBA H, MATSUURA Y, WATANABE Y, KATAYAMA T, KIKUCHI S, SAITO I, MIYAMURA T. Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** V. 88(11), p. 4641-5, 1991.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.** V. 162(1), p. 156-9, 1987.

CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science.** V. 244(4902), p. 359-62, 1989.

CHOO QL, RICHMAN KH, HAN JH, BERGER K, LEE C, DONG C, GALLEGOS C, COIT D, MEDINA-SELBY R, BARR PJ, *ET AL.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** V. 88(6), p. 2451-55, 1991.

CODES L, DE FREITAS LA, SANTOS-JESUS R, VIVITSKI L, SILVA LK, TREPO C, REIS MG, PARANA R. Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia Brazil. **Braz J Infect Dis.** V. 7(6), p. 409-17, 2003.

COMANOR L, ELKIN C, LEUNG K, KRAJDEN M, KRONQUIST K, NICOLAS K, HORANSKY E, DEMEDINA M, KITTICHAJ P, SABLON E, ZIERMANN R, SHERLOCK C. Successful HCV genotyping of previously failed and low viral load specimens using an HCV RNA qualitative assay based on transcription-mediated amplification in conjunction with the line probe assay. **J Clin Virol.** V. 28(1), p. 14-26, 2003.

DATASUS – www.datasus.gov.br (acessado em 17/12/2005).

DASGUPTA A, DAS S, IZUMI R, VENKATESAN A, BARAT B. Targeting internal ribosome entry site (IRES) – mediated translation to block hepatitis C and other RNA viruses. **FEMS Microbiol Lett.** V. 234(1), p.189-99, 2004.

DAVIDSON F, SIMMONDS P, FERGUSON JC, JARVIS LM, DOW BC, FOLLETT EA, SEED CR, KRUSIUS T, LIN C, MEDGYESI GA, *ET AL.* Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. **J Gen Virol.** V. 76 (Pt 5), p. 1197-204, 1995.

DEMARINI DJ, JOHNSTON VK, KONDURI M, GUTSHALL LL, SARISKY RT. Intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity. **J Virol Methods**. V. 113(1), p. 65-8, 2003.

DESENCLOS JC, PILLONEL J, DELAROCQUE-ASTAGNEAU E AND DE VALK H. Épidémiologie de l'hépatite C et stratégies de surveillance. **Médecine et Maladies Infectieuses**. V. 29(5), p. 325-331, 1999.

DEVALLE S, DE PAULA VS, DE OLIVEIRA JM, NIEL C, GASPAR AM. Hepatitis A virus infection in hepatitis C Brazilian patients. **J Infect**. V. 47(2), p. 125-8, 2003.

DHALIWAL SK, PRESCOTT LE, DOW BC, DAVIDSON F, BROWN H, YAP PL, FOLLETT EA, SIMMONDS P. Influence of viraemia and genotype upon serological reactivity in screening assays for antibody to hepatitis C virus. **J Med Virol**. V. 48(2), p. 184-90, 1996.

DIAGO M, ZAPATER R, TUSET C, CARBONELL P, GONZALEZ C, CORS R, CASAS E. Intrafamily transmission of hepatitis C virus: sexual and non-sexual contacts. **J Hepatol**. V. 25(2), p. 125-8, 1996.

DORE GJ, LAW M, MACDONALD M, KALDOR JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. **J Clin Virol**. V. 26(2), p. 171-84, 2003.

DUBUISSON J, PENIN F, MORADPOUR D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. **Trends Cell Biol**. V. 12(11), p. 517-23, 2002.

DUMOULIN FL, LEIFELD L, SAUERBRUCH T, SPENGLER U. Autoimmunity induced by interferon-alpha therapy for chronic viral hepatitis. **Biomed Pharmacother**. V. 53(5-6), p. 242-54, 1999.

ELAHI E, POURMAND N, CHAUNG R, ROFOOGARAN A, BOISVER J, SAMIMI-RAD K, DAVIS RW, RONAGHI M. Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing. **J Virol Methods**. V. 109(2), p. 171-6, 2003.

FARCI P, PURCELL RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Semin Liver Dis.** V. 20(1), p. 103-26, 2000.

FARIAS A. Escravidismo e abolição no Ceará. In: _____ **História do Ceará Império.** Tropical editora, p. 47-52, 1997.

FOCACCIA R e COLABORADORES. Hepatite C. In: _____ **Tratado de Hepatites Virais,** 1ª , Ed. Atheneu, p. 195-328, 2003.

FORCIC D, ZGORELEC R, BRANOVIC K, KOSUTIC-GULIJA T, SANTAK M, MAZURAN R. Incidence of hepatitis C virus RNA in anti-HCV negative plasma pools in Croatia. **Transfus Apher Sci.** V. 24(3), p. 269-78, 2001.

FORCIC D, ZGORELEC R, KOSUTIC-GULIJA T, IVANCIC J, BARICEVIC M, LUPRET L, MAZURAN R. Screening of serologically negative plasma pools for hepatitis C virus by nucleic acid amplification testing in Croatia, 2001-2003. **Transfus Apher Sci.** V. 33(2), p. 175-9, 2005.

GOHARY AE, HASSAN A, NOOMAN Z, UCHIDA T, SHIKATA T, LAVANCHY D. HCV genotypes in acute and chronic hepatitis C infection in Suez, Egypt. **Inter. Hepatol. Commun.** V. 4 (1), p. 42-45, 1995.

GONÇALES NS, COSTA FF, VASSALLO J, GONÇALES FL JR. Diagnosis of hepatitis C virus in Brazilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: comparison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** V. 42(5), p. 263-7, 2000.

GROSS JB. Hepatitis C: a sexually transmitted disease? **Am J Gastroenterol.** V. 96(11), p. 3051-53, 2001.

HADLER SC, DE MONZON M, PONZETTO A, ANZOLA E, RIVERO D, MONDOLFI A, BRACHO A, FRANCIS DP, GERBER MA, THUNG S, ET AL. Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela. **Ann Intern Med.** V. 100(3), p. 339-44, 1984.

HAUSHOFER AC, BERG J, HAUER R, TRUBERT-EXINGER D, STEKEL HG, KESSLER HH. Genotyping of hepatitis C virus-comparison of three assays. **J Clin Virol.** V. 27(3), p. 276-85, 2003.

HAZARI S, ACHARYA SK, PANDA SK. Development and evaluation of a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control. **J Virol Methods.** V. 116(1), p. 45-54, 2004.

HELLARD M, AITKEN C, MACKINTOSH A, RIDGE A, BOWDEN S. Investigation of infection control practices and knowledge of hepatitis C among body-piercing practitioners. **Am J Infect Control.** V. 31(4), p. 215-20, 2003.

HELLARD ME, HOCKING JS, CROFTS N. The prevalence and the risk behaviours associated with the transmission of hepatitis C virus in Australian correctional facilities. **Epidemiol Infect.** V. 132(3), p. 409-15, 2004.

HOSOGLU S, CELEN MK, AKALIN S, GEYIK MF, SOYORAL Y, KARA IH. Transmission of hepatitis C by blood splash into conjunctiva in a nurse. **Am J Infect Control.** V. 31(8), p. 502-4, 2003.

IBGE – www.ibge.gov.br (acessado em 17/12/2005).

JOSE M, GAJARDO R, JORQUERA JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. **Biologicals.** V. 33(1), p. 9-16, 2005.

KEISERMAN DR, BOTH CT, MATTOS AA, REMIAO J, ALEXANDRE CO, SHERMAN KE. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in patients with hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. **Am J Gastroenterol.** V. 98(4), p. 878-83, 2003.

KHAN N, ASWAD S, SHIDBAN H, AGHAJANI M, MENDEZ R, MENDEZ R, COMANOR L. Improved detection of HCV Infection in hemodialysis patients using a new HCV RNA qualitative assay: experience of a transplant center. **J Clin Virol.** V. 30(2), p. 175-82, 2004.

KHUROO MS, DUERMAYER W, ZARGAR SA, AHANGER MA, SHAH MA. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in India. **Am J Epidemiol.** V. 118(3), p. 360-4, 1983.

KIM WR. Global epidemiology and burden of hepatitis C. **Microbes and Infection.** V. 4(12), p. 1219-25, 2002.

KOHARA M. Hepatitis C virus replication and pathogenesis. **J Dermatol Sci.** V. 22(3), p. 161-8, 2000.

KREKULOVA L, REHAK V, RILEY LW. Hepatitis C virus (HCV) 5'NC sequence variants and their association with hepatitis C risk groups. **J Clin Virol.** V. 32(4), p. 300-4, 2005.

KUO G, CHOO QL, ALTER HJ, GITNICK GL, REDEKER AG, PURCELL RH, MIYAMURA T, DIENSTAG JL, ALTER MJ, STEVENS CE, ET AL. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science.** V. 244(4902), p. 362-4, 1989.

KURSTAK E, KURSTAK C, HOSSAIN A, AL TUWAIJRI A. Current status of the molecular genetics of hepatitis C virus and its utilization in the diagnosis of infection. **Clin Diag Virol.** V. 3(1), p. 1-15, 1995.

LAUER GM, WALKER BD. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.** V. 345(1), p. 41-52, 2001.

LEDNAR WM, LEMON SM, KIRKPATRICK JW, REDFIELD RR, FIELDS ML, KELLEY PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. **Am J Epidemiol.** V. 122(2), p. 226-33, 1985.

LEVI JE, TAKAOKA DT, GARRINI RH, FACHINI RM, FOCACCIA R, DE BORTHOLI SANTOS E, MITRE HP, DE MENDONCA JS, DE PAULA CAVALHEIRO N, BARONE AA, WENDEL S. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. **J Clin Microbiol.** V. 40(7), p. 2645-7, 2002.

LUNN G, SANSONE EB. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. **Anal Biochem.** V. 162(2), p. 453-8, 1987.

LYRA AC, RAMRAKHIANI S, BACON BR, DI BISCEGLIE AM. Infection with hepatitis C virus genotype 4 in the United States. **J Clin Gastroenterol**. V. 38(1), p. 68-71, 2004.

MADHAVA V, BURGESS C, DRUCKER E. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa. **Lancet Infect Dis**. V. 2(5), p. 293-302, 2002.

MANCINI C, PISANI G, AZZI A, LUISA ZERBINI M, GENTILI G, MARIO BISSO G; MS PARTICIPANTS. Inter-laboratory comparison of qualitative and quantitative detection of hepatitis C (HCV) virus RNA in diagnostic virology: a multicentre study (MS) in Italy. **J Clin Virol**. V. 30(4), p. 313-9, 2004.

MAST EE, ALTER MJ. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. **Seminars in Virology**. V. 4(5), p. 273-83, 1993.

MATHEI C, WOLLANTS E, VERBEECK J, VAN RANST M, ROBAEYS G, VAN DAMME P, BUNTINX F. Molecular epidemiology of hepatitis C among drug users in Flanders, Belgium: association of genotype with clinical parameters and with sex- and drug-related risk behaviours. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. V. 24(8), p. 514-22, 2005.

MATSUURA Y, MIYAMURA T. The molecular biology of hepatitis C virus. **Seminars in Virology**. V. 4(5), p. 297-304, 1993.

MATTHEWS-GREER JM, CALDITO GC, ADLEY SD, WILLIS R, MIRE AC, JAMISON RM, MCRAE KL, KING JW, CHANG WL. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without human immunodeficiency virus. **Clin Diagn Lab Immunol**. V. 8(4), p. 690-4, 2001.

MCTMAHON BJ, ALWARD WL, HALL DB, HEYWARD WL, BENDER TR, FRANCIS DP, MAYNARD JE. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. **J Infect Dis**. V. 151(4), p. 599-603, 1985.

MEDEIROS MT, LIMA JM, LIMA JW, CAMPOS HDE H, MEDEIROS MM, COELHO FILHO JM. Prevalence and associated factors to hepatitis C in hemodialysis patients in Brazil. **Rev Saude Publica**. V. 38(2), p. 187-93, 2004.

MEISEL H, REIP A, FALTUS B, LU M, PORST H, WIESE M, ROGGENDORF M, KRUGER DH. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. **Lancet**. V. 345(8959), p. 1209-11, 1995.

MENDES-CORREA MCJ, BARONE AA, GUASTINI C. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. V. 43(1), p. 15-9, 2001.

MESEGUER M, GARRIDO N, GIMENO C, REMOHI J, SIMON C, PELLICER A. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. **Fertil Steril**. V. 78(6), p. 1199-202, 2002.

MORADPOUR D, BLUM HE. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver Int**. V. 24(6), p. 519-25, 2004.

MORADPOUR D, BRASS V, BIECK E, FRIEBE P, GOSERT R, BLUM HE, BARTENSCHLAGER R, PENIN F, LOHMANN V. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. **J Virol**. V. 78(23), p. 13278-84, 2004.

MORADPOUR D, GOSERT R, EGGER D, PENIN F, BLUM HE, BIENZ K. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. **Antiviral Res**. V. 60(2), p. 103-9, 2003.

MULLER Z, DEAK J, ROSS RS, NAGY E, KOVACS L, ROGGENDORF M, KESSLER HH. Hepatitis C virus genotypes in Hungarian and Austrian patients with chronic hepatitis C. **J Clin Virol**. V. 26(3), p. 295-300, 2003.

MUNOZ ESPINOSA LE. Diagnosis of hepatitis C virus infection. **Rev Gastroenterol Mex**. V. 67(Suppl 2), p. S29-35, 2002.

MUTIMER D, SHAW J, NEUBERGER J, SKIDMORE S, MARTIN B, HUBSCHER S, MCMASTER P, ELIAS E. Failure to incriminate hepatitis B, hepatitis C, and hepatitis E viruses in the aetiology of fulminant non-A non-B hepatitis. **Gut**. V. 36(3), p. 433-6, 1995.

NEVENS F, ROSKAMS T, VAN VLIERBERGHE H, HORSMANS Y, SPRENGERS D, ELEWAUT A, DESMET V, LEROUX-ROELS G, QUINAUX E, DEPLA E, DINCQ S, VANDER STICHELE C, MAERTENS G, HULSTAERT F. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**. V. 38(5), p. 1289-96, 2003.

NISHIOKA SDE A, GYORKOS TW. Tattoos as risk factors for transfusion-transmitted diseases. **Int J Infect Dis**. V. 5(1), p. 27-34, 2001.

OKAMOTO H, OKADA S, SUGIYAMA Y, TANAKA T, SUGAI Y, AKAHANE Y, MACHIDA A, MISHIRO S, YOSHIZAWA H, MIYAKAWA Y, ET AL. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. **Jpn J Exp Med**. V. 60(4), p. 215-22, 1990.

OLIVEIRA ML, BASTOS FI, SABINO RR, PAETZOLD U, SCHREIER E, PAULI G, YOSHIDA CF. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Braz J Med Biol Res**. V. 32(3), p. 279-82, 1999.

OSELLA AR, MISCIAGNA G, LEONE A, DI LEO A, FIORE G. Epidemiology of hepatitis C virus infection in an area of Southern Italy. **J Hepatol**. V. 27(1), p. 30-5, 1997.

PALTANIN LF, REICHE EM. Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. **Rev Saude Publica**. V. 36(4), p. 393-9, 2002.

PARANA R, VITVITSKI L, BERBY F, PORTUGAL M, COTRIM HP, CAVALCANTE A, LYRA L, TREPO C. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arq Gastroenterol**. V. 37(4), p. 213-6, 2000.

PAWLOTSKY JM, BOUVIER-ALIAS M, HEZODE C, DARTHUY F, REMIRE J, DHUMEAUX D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. **Hepatology**. V. 32(3), p. 654-9, 2000.

PAWLOTSKY JM. Diagnostic tests for hepatitis C. **J Hepatol**. V. 31(Suppl 1), p. 71-9, 1999.

PAWLOTSKY JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology**. V. 36(5 Suppl 1), p. S65-73, 2002.

PERZ JF, FARRINGTON LA, PECORARO C, HUTIN YJF, ARMSTRONG GL. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. **Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America**. Ed. 42, 30 setembro-3 outubro, 2004.

PRATI D. Transmission of viral hepatitis by blood and blood derivatives: current risks, past heritage. **Dig Liver Dis**. V. 34(11), p. 812-7, 2002.

PRINCE AM, BROTMAN B, GRADY GF, KUHNS WJ, HAZZI C, LEVINE RW, MILLIAN SJ. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. **Lancet**. V. 2(7875), p. 241-6, 1974.

PURCELL RH, GERIN JL. Epidemiology of the delta agent: an introduction. **Prog Clin Biol Res**. V. 143(1), p. 113-9, 1983.

RAGHURAMAN S, SHAJI RV, SRIDHARAN G, RADHAKRISHNAN S, CHANDY G, RAMAKRISHNA BS, ABRAHAM P. Distribution of the different genotypes of HCV among patients attending a tertiary care hospital in south India. **J Clin Virol**. V. 26(1), p. 61-9, 2003.

REDDY AK, DAKSHINAMURTY KV, LAKSHMI V. Utility of HCV core antigen elisa in the screening for Hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis. **Indian J Med Microbiol**. V. 24(1), p. 55-57, 2006.

RIZZETTO M. The delta agent. **Hepatology**. V. 3(5), p. 729-37, 1983.

ROINGEARD P, HOURIOUX C, BLANCHARD E, BRAND D, AIT-GOUGHOLTE M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol Cell**. V. 96(2), p. 103-8, 2004.

ROSEN HR, CHOU S, SASAKI AW, GRETCH DR. Molecular epidemiology of hepatitis C infection in U.S. veteran liver transplant recipients: evidence for decreasing relative prevalence of genotype 1B. **Am J Gastroenterol.** V. 94(10), p. 3015-9, 1999.

ROSENBERG S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. **J Mol Biol.** V. 313(3), p. 451-64, 2001.

SALLIE R. Replicative homeostasis: a mechanism of viral persistence. **Med Hypotheses.** V. 63(3), p. 515-23, 2004.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning: A laborator manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press.** V. 3(2nd edition), 1989.

SANCHEZ JL, SJOGREN MH, CALLAHAN JD, WATTS DM, LUCAS C, ABDELHAMID M, CONSTANTINE NT, HYAMS KC, HINOSTROZA S, FIGUEROA-BARRIOS R, CUTHIE JC. Hepatitis C in Peru: risk factors for infection, potential iatrogenic transmission, and genotype distribution. **Am J Trop Med Hyg.** V. 63(5-6), p. 242-8, 2000.

SANTANA GO, COTRIM HP, MOTA E, PARANA R, SANTANA NP, LYRA L. Antibodies to hepatitis C virus in patients undergoing hemodialysis in Salvador, BA, Brazil **Arq Gastroenterol.** V. 38(1), p. 24-31, 2001.

SCHROTER M, FEUCHT HH, ZOLLNER B, SCHAFFER P, LAUFS R. Multiple infections with different HCV genotypes: prevalence and clinical impact. **J Clin Virol.** V. 27(2), p. 200-4, 2003.

SHEPARD CW, FINELLI L, ALTER MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis.** V. 5(9), p. 558-67, 2005.

SHUSTOV AV, KOCHNEVA GV, SIVOLOBOVA GF, GRAZHDANTSEVA AA, GAVRILOVA IV, AKINFEEVA LA, RAKOVA IG, ALESHINA MV, BUKIN VN, ORLOVSKY VG, BESPALOV VS, ROBERTSON BH, NETESOV SV. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Western Siberia. **J Med Virol.** V. 77(3), p. 382-9, 2005.

SILINI E, BONO F, CIVIDINI A, CERINO A, BRUNO S, ROSSI S, BELLONI G, BRUGNETTI B, CIVARDI E, SALVANESCHI L, ET AL. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. **Hepatology**. V. 21(2), p. 285-90, 1995a.

SILINI E, BONO F, CIVIDINI A, CERINO A, MACCABRUNI A, TINELLI C, BRUNO S, BELLOBUONO A, MONDELLI M. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. **J Hepatol**. V. 22(6), p. 691-5, 1995b.

SILVA GF, NISHIMURA NF, COELHO KI, SOARES EC. Grading and staging chronic hepatitis C and its relation to genotypes and epidemiological factors in Brazilian blood donors. **Braz J Infect Dis**. V. 9(2), p. 142-9, 2005.

SIMMONDS P, HOLMES EC, CHA TA, CHAN SW, MCOMISH F, IRVINE B, BEALL E, YAP PL, KOLBERG J, URDEA MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J Gen Virol**. V. 74 (Pt 11), p. 2391-9, 1993.

SIMMONDS P. Fleming Lecture: The origin and evolution of hepatitis viruses in humans **J. Gen. Virol**. V. 82(4), p. 693 – 71, 2001.

SOUTO FJ, DA SILVA AG, YONAMINE F. Risk of hepatitis C among Brazilian ex-soccer players. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 98(8), p. 1025-6, 2003.

SQUADRITO G, ORLANDO ME, POLLICINO T, RAFFA G, RESTUCCIA T, CACCIOLA I, DI MARCO V, PICCIOTTO A, COLUCCI G, CRAXI A, RAIMONDO G. Virological profiles in patients with chronic hepatitis C and overt or occult HBV infection. **Am J Gastroenterol**. V. 97(6), p. 1518-23, 2002.

STRAUSS E. Hepatitis C. **Rev Societ Brasil Med Trop**. V. 34(1), p. 69-82, 2001.

STROFFOLINI T, LORENZONI U, MENNITI-IPPOLITO F, INFANTOLINO D, CHIARAMONTE M. Hepatitis C virus infection in spouses: sexual transmission or common exposure to the same risk factors? **Am J Gastroenterol**. V. 96(11), p. 3138-41, 2001.

STUMPF MP, PYBUS OG. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. **FEMS Microbiol Lett.** V. 214(2), p. 143-52, 2002.

TAYLOR DR, TIAN B, ROMANO PR, HINNEBUSCH AG, LAI MM, MATHEWS MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. **J Virol.** V. 75(3), p. 1265-73, 2001.

TELLINGHUISEN TL, RICE CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Curr Opin Microbiol.** V. 5(4), p. 419-27, 2002.

THIERS V, TUVERI R, BRÉCHOT C. Épidémiologie moléculaire du virus de l'hépatite C. **Revue Française des Laboratoires.** V. 320 (1), p. 41-48, 2000.

TOMASSINI JE, BOOTS E, GAN L, GRAHAM P, MUNSHI V, WOLANSKI B, FAY JF, GETTY K, LAFEMINA R. An in vitro Flaviviridae replicase system capable of authentic RNA replication. **Virology.** V. 313(1), p. 274-85, 2003.

UEDA E, ENOMOTO N, SAKAMOTO N, HAMANO K, SATO C, IZUMI N, WATANABE M. Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. **Hepatol Res.** V. 29(2), p. 89-96, 2004.

VILLAREJOS VM, SERRA J, ANDERSON-VISONA K, MOSLEY JW. Hepatitis A virus infection in households. **Am J Epidemiol.** V. 115(4), p. 577-86, 1982.

VOGLER IH, NISHIYA A, MORIMOTO HK, REICHE EM, BORTOLIERO AL, MATSUO T, SABINO EC, VAZ AJ. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** V. 46(6), p. 303-8, 2004.

WEBSTER G, BARNES E, BROWN D, DUSHEIKO G. HCV genotypes--role in pathogenesis of disease and response to therapy. **Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.** V. 14(2), p. 229-40, 2000.

WEJSTAL R. Sexual transmission of hepatitis C virus. **J Hepatol.** V. 31 Suppl 1, p. 92-5, 1999.

WILLIAMS I. Epidemiology of hepatitis C in the United States. **Am J Med.** V. 107(6B), p. 2S-9S, 1999.

ZARIFE MA, SILVA LK, SILVA MB, LOPES GB, BARRETO ML, TEIXEIRA MD, DOURADO I, REIS MG. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2005

ANEXOS

ANEXO I – PROTOCOLOS LABORATORIAIS

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

ACETATO DE SÓDIO 3M, pH 5,5

Acetato de sódio anidro	24,6g
Água destilada	80mL

Dissolver o acetato de sódio em água. Ajustar o pH da solução com ácido acético glacial. Completar o volume da mistura para 100mL com água. Distribuir a solução em alíquotas de 20mL e esterilizar por autoclavação. Estocar à temperatura ambiente.

BROMETO DE ETÍDIO (10mg/ mL)

Brometo de etídio	1g
Água destilada	100 mL

Usar máscara durante a pesagem do brometo. Agitar a mistura com o auxílio de um agitador magnético por algumas horas, para assegurar que o corante dissolva. Distribuir em alíquotas e envolver os frascos com papel alumínio, ou manter o material armazenado em garrafa de cor escura. Estocar à temperatura ambiente.

CLOROFÓRMIO: ÁLCOOL ISOAMÍLICO 24:1

Clorofórmio	24mL
Álcool isoamílico	1mL

Homogeneizar a mistura por inversão e estocar à temperatura ambiente.

dNTPs 10mM

Adenina – solução estoque 100mM	50 µL
Timina – solução estoque 100mM	50 µL
Citosina – solução estoque 100mM	50 µL
Guanina – solução estoque 100mM	50 µL
Água destilada estéril	300 µL

Homogeneizar os oligonucleotídeos e a água em vórtex a temperatura ambiente. Distribuir a solução em alíquotas de 100 µL e estocar à -20°C.

ETANOL 80%

Etanol absoluto	80mL
Água destilada estéril	20mL

Homogeneizar a mistura por inversão e estocar à temperatura ambiente.

ETANOL 95%

Etanol absoluto	95mL
Água destilada estéril	5 mL

Homogeneizar a mistura por inversão e estocar à temperatura ambiente.

GEL DE AGAROSE 1,2%

Agarose	0,6 g
TAE 1×	50 mL

Dissolver a agarose no tampão e levar ao microondas por 1 minuto. Esperar esfriar até, aproximadamente, 50°C e adicionar 2 µL de brometo de etídio (10mg/ mL). Despejar a solução na fôrma (fechada nas laterais com fita crepe), colocar o pente e aguardar solidificar.

Retirar, cuidadosamente, o pente. A partir deste ponto o gel pode ser utilizado imediatamente para eletroforese ou ficar armazenado à 4°C até sua utilização.

GEL DE AGAROSE METAPHOR 4,0%

Agarose METAPHOR	2 g
TAE 1×	50 mL

Dissolver a agarose no tampão e deixar hidratar por 15 minutos. Levar ao microondas e aquecer em temperatura branda até que a solução esteja completamente límpida, sem aglomerados de agarose. Esperar esfriar até, aproximadamente, 50°C e adicionar 1 µL de brometo de etídio (10mg/ mL). Despejar a solução na fôrma (fechada nas laterais com fita crepe), colocar o pente largo e aguardar solidificar. Retirar, cuidadosamente, o pente. Armazenar o gel à 4°C até o momento da corrida eletroforética para prevenir que o gel aqueça durante a corrida.

MARCADORES 100pb e 25pb

Marcador (solução estoque)	10 µL
Loading buffer 6×	30 µL
Água destilada estéril	110 µL

Homogeneizar a mistura em vórtex e estocar à -20°C. Aplicar 15 µL da solução no gel para eletroforese. Utilizar o marcador de 100pb na eletroforese do teste qualitativo e o marcador de 25pb para genotipagem.

PRIMERS (SOLUÇÃO ESTOQUE) A PARTIR DO LIOFILIZADO

Concentração estoque: 500 pmoles/ µL

Primer 209: 5' – ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT - 3'

Tamanho do *primer*: 29pb

Cálculo:

Nmoles per OD = 3,2

OD's = 15,19

Nmoles = 48,7 (não confiável)

Fórmula: $\text{nmoles}/\text{OD} \times \text{OD} = \text{nmoles} \rightarrow 3,2 \times 15,19 = 48,608 \text{ nmoles (confiável)}$

Concentração do estoque (final):

500 pmoles \rightarrow 1 μ L de água

48.608 pmoles \rightarrow x

x = 97,216 μ L de água a ser adicionado ao liofilizado

Primer 211: 5' – CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT - 3'

Tamanho do *primer*: 26pb

Cálculo:

Nmoles per OD = 3,6

OD's = 13,33

Nmoles = 48,5 (não confiável)

Fórmula: $\text{nmoles}/\text{OD} \times \text{OD} = \text{nmoles} \rightarrow 3,6 \times 13,33 = 47,988 \text{ nmoles (confiável)}$

Concentração do estoque (final):

500 pmoles \rightarrow 1 μ L de água

47.988 pmoles \rightarrow x

x = 95,976 μ L de água a ser adicionado ao liofilizado

Primer 939: 5' – CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT - 3'

Tamanho do *primer*: 20pb

Cálculo:

Nmoles per OD = 4,0

OD's = 13,82

Nmoles = 55,9 (não confiável)

Fórmula: $\text{nmoles}/\text{OD} \times \text{OD} = \text{nmoles} \rightarrow 4,0 \times 13,82 = 55,28 \text{ nmoles (confiável)}$

Concentração do estoque (final):

500 pmoles \rightarrow 1 μ L de água

55.280 pmoles \rightarrow x

x = 110,56 μ L de água a ser adicionado ao liofilizado

Primer 940: 5' – TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG - 3'

Tamanho do *primer*: 20pb

TAMPÃO DE CARREGAMENTO (*LOADING BUFFER*) 6×

Azul de bromofenol	0,25%
Xileno cianol	0,25%
Glicerol em água (p/v)	30%

Homogeneizar e armazenar à 4°C.

TAMPÃO TRIS-ACETATO-EDTA (TAE) 50×

Tris base	242 g
EDTA	18,612 g
Água destilada	500 mL

Dissolver o tris base e o EDTA em água. Ajustar o pH para 8,0 com ácido acético glacial. Completar o volume para 1 litro com água. Autoclavar e estocar à temperatura ambiente. A solução de trabalho é 1×, portanto este estoque deve ser diluído 50 vezes.

PREPARO E ARMAZENAMENTO DO SORO PARA DIAGNÓSTICO DO VHC

1. Objetivo

Preparar e armazenar adequadamente as amostras de soro para exames moleculares de detecção e genotipagem do vírus da hepatite C (VHC).

2. Campo de Aplicação

Deteção de ácidos nucleicos virais de células e agentes virais circulantes no sangue.

3. Referência

Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Técnicas para coleta de sangue. Brasília: Ministério da Saúde, 1997. 32p.: il. (Série TELELAB)

4. Descrição:

Material

- Micropipetador de 1000µL
- Ponteiras azuis
- Tubos para crio-armazenamento 2,0mL
- Caneta para marcação de tubos
- Cuba com gelo
- Centrífuga
- Geladeira
- Congelador -20°C
- Freezer -70°C
- Recipiente para descarte com hipoclorito de sódio 2%
- Avental e máscara
- Luvas descartáveis
- Caixa de congelamento

Procedimentos

1. Colher sem uso de anticoagulante e manter a amostra no refrigerador ou gelo.
2. A amostra poderá ficar nessa condição por no máximo 4 horas até a centrifugação. Esse procedimento visa minimizar a ação de RNAses e DNAses que degradam os ácidos nucleicos. Além disso, o sangue pode hemolisar.
3. Centrifugue as amostras a 3000 rpm por 15 minutos. Caso a rede de fibrina esteja muito espessa talvez seja necessário repetir este procedimento.
4. Mantenha as amostras em baixa temperatura na cuba de gelo picado ou na geladeira até sua aliquotagem.
5. Aliquote o soro em dois tubos para crio-armazenamento de 2,0 mL. Evite preencher completamente.
6. Congele as amostras em congelador -20°C caso sejam utilizadas dentro de um período de 6 meses ou em freezer a -70°C para períodos maiores.
7. Registre as amostras no mapa de congelamento e no banco de dados de exames.

ISOLAMENTO DE RNA DO SORO

1. Objetivo

Extrair o RNA total de amostras de soro.

2. Campo de Aplicação

Este protocolo pode ser utilizado para a purificação de qualquer tipo de RNA a partir de amostras pouco contaminadas, tais como soro (não hemolisado), urina e saliva. Em combinação com protocolos de RT-PCR permite a detecção de agentes infecciosos cujo genoma é RNA: HIV, vírus da dengue, vírus da febre amarela, vírus da hepatite C.

3. Descrição

3.1 Base do método

A técnica pode ser dividida em três etapas: extração, precipitação e secagem. Durante a etapa de extração o RNA é separado da maioria dos contaminantes orgânicos pela extração com uma mistura desnaturante constituída de fenol:clorofórmio: GuSCN:2 – mercaptoetanol. Após centrifugação, o RNA permanece solubilizado na fase aquosa superior e é transferido para um tubo limpo contendo etanol e acetato de sódio. Nestas condições, o RNA é precipitado após resfriamento à baixa temperatura e centrifugação. Durante a precipitação, os contaminantes de baixo peso molecular solúveis (sais, monômeros, etc.) são eliminados enquanto o RNA fica cristalizado no fundo do tubo. Finalmente, o RNA é desidratado com etanol (95%) e seco.

3.2 Equipamentos e materiais

- Galeria para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
- Gaze estéril
- Micropipetadores de 20µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL
- Ponteiras livres de RNAses, estéreis, amarelas e azuis, com barreira
- Tiras de papel toalha estéreis
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estéreis
- Microcentrífuga refrigerada
- Balde com gelo

3.3 Reagentes

- Acetato de sódio 3M pH5,5 estéril
- Clorofórmio: álcool isoamílico 24:1
- Etanol 80%
- Etanol P.A (95%)
- Etanol 100%
- Trizol LS mantido a 4°C

3.4 Procedimentos

Os itens 1, 2, 3, 4 e 13 devem ser realizados preferencialmente no fluxo laminar. Os demais itens podem ser realizados na bancada tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação e degradação das amostras.

Colocar todo o material em luz UV, antes do início do experimento, por 15-30 minutos, inclusive luvas, frasco com tubos, pipetas e estantes. Solução de hipoclorito de sódio 2% para descarte de ponteiros e tubos.

Durante os intervalos de protocolo, deixar o material contido na capela em luz UV. Ligar a centrífuga a 4°C antes de iniciar os experimentos.

- *Controle negativo*: água e PCR mix
 - *Controle positivo*: soro de paciente sabidamente positivo
- I. Identifique dois tubos de microcentrífuga de 1,5mL para cada amostra. Numere na tampa dos tubos (tubo 1 e 2) a ordem das amostras (1, 2, 3...). Somente na segunda série dos tubos (tubo 2), rotule na lateral o código da amostra e outras informações que julgar necessárias. Após o experimento estes tubos poderão constituir uma biblioteca de cDNA;
 - II. Misturar o soro com pipeta antes do início do procedimento;
 - III. Adicione no tubo 1: 355 µL de TRIZOL, 35 µL de clorofórmio:al. amílico 24:1 e 200 µL de amostra (200 µL de soro ou 100 µL de soro + 100 µL de água DEPC). Agitar os frascos manualmente por inversão vigorosa por 10 seg (mistura rosa-leitosa);
 - IV. Centrifugue os tubos a 12.000 rpm por 10 min a 4°C;
 - V. Enquanto isso, adicione nos tubos 2: 700 µL de etanol P.A (95%) e 30 µL de acetato de sódio 3M pH 5,5;
 - VI. Transfira cuidadosamente a fase aquosa superior transparente (aprox. 300-400 µL) do tubo 1 para o tubo 2. Descarte os tubos com TRIZOL em local apropriado;
 - VII. Homogeneíze lentamente por inversão por 10-15 seg e mantenha no congelador (-20°C) por 20 minutos para precipitar. Pode-se interromper o experimento nesta etapa. Nesse caso, recomenda-se manter os tubos a -70°C;
 - VIII. Centrifugue os tubos a 12.000 rpm por 20 min a 4°C;
 - IX. Despreze a fase alcóolica por inversão dos tubos, tomando cuidado para não perder o precipitado, caso seja visível;
 - X. Adicione 1mL de etanol 80% em cada tubo. Centrifugue os tubos a 12.000 rpm por 5min a 4°C. Despreze a fase alcóolica por inversão dos tubos, tomando cuidado para não perder o precipitado, caso seja visível;
 - XI. Adicione 1mL de etanol P.A. (100%) em cada tubo. Centrifugue os tubos a 12.000 rpm por 5min a 4°C. Despreze a fase alcóolica por inversão dos tubos, tomando cuidado para não perder o precipitado, caso seja visível;
 - XII. Forre uma superfície do fluxo laminar com gaze estéril. Mantenha os tubos emborcados sobre esta superfície por 15min para secar. Enquanto espera, preparar RT mix;
 - XIII. A fim de evitar a degradação do material é recomendável prosseguir imediatamente a transcrição reversa, caso contrário, dissolva o precipitado em 14 µL de água DEPC e congele a -70°C.

4. Referências

- CHOMCZYNSKI, P e SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9, 1987.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laborator manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, FIOCRUZ. *Preparo de reagentes de biologia molecular*. CCPqGM, 2000.

QUALITATIVO VHC/ 5' NCR RT-Nested PCR (Chan, 1992)

1) Extração do VHC-RNA Data: ____/____/____

Amostra	Identificação	Resultado*	Amostra	Identificação	Resultado*
1			13		
2			14		
3			15		
4			16		
5			17		
6			18		
7			19		
8			20		
9			21		
10			22		
11			23		
12			24		

* Resultado dado como: Positivo, fracamente positivo ou negativo

2) Métodos

Transcriptase Reversa

Ressuspender o pellet de RNA total em 25µL de RT mix.

Programa de temperaturas: 37°C/ 1,5 horas até overnight; 95°C/ 10 min e encerrar a 4°C/ 10min.

Centrifugar ao término da RT(10s, 1000rpm, T.A.). Estocar a -20°C.

1ª PCR

- Centrifugar brevemente o cDNA. Distribuir em cada tubo 21 µL do mix e adicionar 4 µL do cDNA.

Programa de temperaturas HCV (PCR-1): 94°C 3min; 30 ciclos 94°C 25s, 50°C 35s, 68°C 2,5min, 68°C 15min; 4°C ∞. Produto 5'NCR: 306pb. Estocar a -20°C.

2ª PCR

- Distribuir em cada tubo 70 µL do mix e adicionar 5 µL do produto da 1ª PCR. Programa de temperaturas: HCV (HCV nested): 94°C 3min; 40 ciclos 94°C 25s, 50°C 35s, 68°C 2,5min, 68°C 15min; 4°C ∞. Produto 5'NCR: 251pb. Estocar a -20°C.

TRANSCRIPTASE REVERSA			1ª PCR			2ª PCR		
	× 1	× ____		× 1	× ____		× 1	× ____
H2O	14,0		H2O	16,8		H2O	59,1	
DEPC			Mili-Q			Mili-Q		
5×	5,0		10×	2,5		10×	7,5	
BUFFER			BUFFER			BUFFER		
DTT	2,0		com Mg ⁺⁺			com Mg ⁺⁺		
DNTPs	1,0		DNTPs	0,5		DNTPs	1,0	
10mM			10mM			10mM		
Random	1,0		939s	0,5		940s	1,0	
primer 50uM			50pmoles/uL			50pmoles/uL		
RNAsin	1,0		209	0,5		211	1,0	
10U/uL			50pmoles/uL			50pmoles/uL		
MMLV	1,0		Taq	0,2		Taq	0,4	
200U/uL			5U/UI			5U/uL		
TOTAL	25,0		TOTAL	21,0		TOTAL	70,0	

DETECÇÃO DO DIAGNÓSTICO QUALITATIVO

- 50mL de gel, contendo 1,2% agarose em TAE 1×, adicionado de 2 µL de brometo de etídio (BE, 10mg/mL). Adicionar 2 µL de BE também na cuba de eletroforese. Marcador de 100pb, usar 15 µL do mix-marcador diretamente no gel.

- Carregar 3 µL de tampão de carregamento e 15 µL de amostra. Total 18 µL. Corrida 45V/1,5 horas ou até o corante atingir a metade do gel.

Unidade de Biologia Molecular/HCV

DPML – Faculdade de Medicina – UFC

Resp.: Profa. Cristiane Frota

DESCONTAMINAÇÃO DE TAMPÕES E GÉIS CONTAMINADOS COM BROMETO DE ETÍDIO

Precaução: O brometo de etídio é um poderoso mutagênico, sendo moderadamente tóxico. Todas as vezes que se trabalhar com soluções que contenham este corante deve-se utilizar luvas. Após o uso, estas soluções devem ser descontaminadas pelo método descrito abaixo. Este método (Lunn e Sansone, 1987) reduz a atividade mutagênica do brometo de ensaios com Salmonella/microsomo em aproximadamente 200 vezes.

METODOLOGIA

Nota: Antes de proceder a descontaminação de géis corados com brometo de etídio, quebre-os em tamanho bem pequeno para aumentar a eficiência deste procedimento.

- 1) Transfira as soluções e géis contaminados para um balde. Adicione água suficiente para reduzir a concentração de brometo de $< 0,5$ mg/mL, tomando cuidado para não encher mais que $2/3$ do volume do balde;
- 2) À solução resultante, adicione 0,2 volume de ácido hipofosforoso 5% e 0,12 volume de nitrito de sódio 0,5M. Misture cuidadosamente. Importante: o pH da solução deverá ser $< 3,0$.

O ácido hipofosforoso é usualmente fornecido como uma solução a 50%. Devido ao fato de ser corrosivo deve sempre ser manipulado com cuidado. A diluição do ácido hipofosforoso deve sempre ser realizada imediatamente antes do uso.

A solução de nitrito de sódio 0,5M deve ser preparada dissolvendo 34,5g de nitrito de sódio em água para um volume final de 500mL.

- 3) Deixe o material em repouso a temperatura ambiente por 24 horas;
- 4) Após incubação, adicione quantidade de bicarbonato de sódio 1M para neutralizar a mistura;
- 5) Uma vez neutralizada, pode descartar a fase líquida na pia, para o sistema de esgoto do laboratório;
- 6) Embale os pedaços de géis em saco plástico duplo e dispense em lixo hospitalar.

GENOTIPAGEM DO VHC-RNA POR DAVIDSON (1995) - RFLP PARA ANÁLISE EM ELETROFORESE COM METAPHOR

1. Objetivo

Realizar a RFLP do produto amplificado da região 5'NC específico do genoma do vírus da Hepatite C para genotipagem.

2. Campo de Aplicação

Genotipagem do VHC-RNA

3. Referências

Chan S W, McOmish F, Holmes E C, Dow B, Peutherer J F, Follet E, Yap P L, Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *Journal of General Virology* 1992; 73; 1131-1141.

Simmonds P, Davidson F, Ferguson J, Jarvis L, Dow B, Follet E, Seed C, Krusius T, Lin C, Medgyesi G, Kiyokawa H, Olim G, Duraisamy G, Cuypers T, Saeed A, Teo D, Conradie J, Kew M, Lin M, Nuchaprayoon C, Ndimbie O, Yap P. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5'non-coding region. *Journal of General Virology* 1995; 76; 1197-1204.

Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. *Molecular cloning: A laborator manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.

4. Descrição

Materiais

- ponteiros com barreira para pipetadores de 10 µL, 20 µL e 100 µL
- luvas

Reagentes

- enzimas de restrição MvaI, RsaI, HaeIII, HinfI a 10U/ µL
- tampões de enzimas
- água deionizada estéril

Procedimento

Nota: Todos os produtos da PCR podem ser purificados antes de prosseguirem neste protocolo. No caso do DNA ter sido concentrado, complete a diferença dos mixes com água. Toda a manipulação de produtos da PCR deve ser feita em sala afastada das áreas de preparação das amostras de soro e extração, para evitar a contaminação do ambiente.

TIPAGEM

- 1) Identifique 2 (dois) tubos de microcentrífuga de 0,5 mL para cada amostra de DNA;
- 2) No fluxo laminar, prepare a mistura de reagentes RM1 e RM2, como abaixo, em volume suficiente para o total de amostras (n+1X):

Reação 1 (RM1)	1 ×	(N+1) ×
H ₂ O	1,4 µL	
NEBuffer 2 10 ×	3,0 µL	
HaeIII 10U/ µL	0,3 µL	
Rsa I 10U/ µL	0,3 µL	
Vol. Final	5,0 µL	

Reação 2 (RM2)	1 ×	(N+1) ×
H ₂ O	1,4 µL	
Buffer K 10 ×	3,0 µL	
MvaI 10U/ µL	0,3 µL	
HinfI 10U/ µL	0,3 µL	
Vol. Final	5,0 µL	

- 3) Distribua o volume final de RM1 numa das séries de tubos de microcentrífuga de 0,5mL e RM2 na outra. Feche os tubos, coloque-os numa cuba de gelo até a aplicação das amostras;
- 4) Num outro ambiente, adicione 25 µL de produto de PCR em cada tubo contendo as misturas de reagentes. Volume final de 30 µL.
- 5) Incube ambas reações durante 4 a 16 horas a 37°C para a digestão. Desnature as amostras a 70°C por 10 minutos antes da análise por eletroforese.

ELETROFORESE EM AGAROSE METAPHOR 4,0%

Metodologia:

Preparar 50mL de agarose Metaphor em TAE 1× (aquecer com cuidado e, quando estiver próximo de 50°C, adicionar 1 µL de Brometo de etídio [10mg/mL]). Transferir a agarose para um molde contendo pente largo. Aguardar solidificar e retirar os pentes. Montar o gel na cuba de eletroforese contendo TAE 1×. Misturar 5 µL do tampão de carregamento (6×) a 25 µL de cada amostra e aplicar 25-30 µL desta mistura no gel. Adicionar 2 µL do brometo de etídio (10mg/mL) no tampão da cuba.

- Marcador de 25pb, usar 15 µL do mix-marcador diretamente no gel.
- Proceder a corrida durante 1,5hora em 50V ou parar a corrida quando o corante referente ao azul de bromofenol estiver à metade do gel.

Resultados:



a) Controles

b) Amostras com resultados detectáveis

c) Amostras com resultados indetectáveis

d) Amostras a serem repetidas

Obs: OK significa que os resultados foram confirmados e encaminhados.

Unidade de Biologia Molecular/HCV
DPML – Faculdade de Medicina – UFC
Resp.: Profa. Cristiane Frota

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO E QUESTIONÁRIO



**TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO LIVRE
PARA ENTREVISTA DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO DA
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C**
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica - UFC
Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina

Registro Laboratório:...../.....

Termo de Esclarecimento

Você está sendo convidado a participar do estudo “*Epidemiologia molecular do vírus da Hepatite C (VHC) em Fortaleza, Ceará*”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Os objetivos deste estudo são: efetuar diagnóstico de hepatite C e determinar o tipo do vírus que está presente no material coletado, relacionar a presença e o tipo do vírus a fatores epidemiológicos, como forma de transmissão, prevalência em determinado sexo ou idade e à severidade da doença. Caso você participe, será necessário *coleta de 10 mL de sangue e resposta de perguntas relacionadas à hepatite C*. Você poderá ter o desconforto quando receber a picada para colher o sangue do seu antebraço.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer tipo de pagamento, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois você será identificado com um número (registro do laboratório).

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são: Dra *Cristiane Cunha Frota* que pode ser encontrada no endereço *Divisão de Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza. Telefone(s) (085) 4009 8301 e 4009 8303* e *Cristianne Sousa Bezerra, mestrandia do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica que pode ser encontrada nos endereços e telefones acima referidos*. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio; telefone (085) 4009- 8346.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li e/ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C EM FORTALEZA, CEARÁ”.

Eu,....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que sou livre para interromper meu consentimento a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Assinatura do paciente Data ____/____/____

Assinatura do representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha* Data ____/____/____

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____



**FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA PARA ENTREVISTA DOS
PARTICIPANTES DO ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA
MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C**

Universidade Federal do Ceará - UFC
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica
Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina

Registro laboratório: _____/_____/_____

Identificação

1. Nome: _____ 2. Idade: _____
3. Prontuário: _____ 4. Unidade de Atendimento: (HC-UFC), (HEMOCE),
(HIAS), (HSJ), Outra: _____
5. Sexo: (Masculino), (Feminino) 6. Data do atendimento: ____/____/____
7. Endereço: _____ 8. Bairro: _____
9. Fone: _____
10. Estado Civil: (Casado), (Divorciado), (Separado), (Solteiro), (Viúvo)
11. Profissão: _____ 12. Procedência: _____ 13. Natural: _____

Dados Sócio – Econômicos

14. Estudou até que série? _____ Analfabeto ()
15. Tem esgotos em casa? (Não), (Rede Pública), (Fossa Séptica), (Vala), (Ignorado)
16. Sua casa é de: (Taipa com banheiro), (Taipa sem banheiro), (Tijolo com banheiro),
(Tijolo sem banheiro), (Mista)
17. Fonte d'água: (Tratada), (Poço), (Lagoa), (Rio), (Carroça), (Chafariz), (Ignorada)
18. Renda Familiar em salários mínimos:___19. N°. de pessoas na casa: __Adultos: __Crianças: ____

Manifestações Clínicas

20. Assintomático ()
21. Sintomático () 22. Há quanto tempo tem conhecimento da doença? _____
• Relação dos possíveis sinais e sintomas. Assinale com **X** quando presente.

23. Icterícia	()	24. Colúria	()	25. Acolia	()	26. Febre	()
27. Adinamia	()	28. Anorexia	()	29. Mialgia	()	30. Artralgia	()
31. Dor abdominal	()	32. Tremores	()	33. Sonolência	()	34. Hepatomegalia	()
35. Esplenomegalia	()	36. Ascite	()	37. Equimoses	()	38. Eritema palmar	()
39. Edema de mmii	()	40. Ginecomastia	()	41. Melena	()	42. Aranha vascular	()
43. Coma	()	44. Fetor hepático	()				

45. Tem Biópsia? (Sim) (Não) Data: _____

Resultado: _____

Dados Epidemiológicos

46. Tipo Sangüíneo: (A) (B) (AB) (O) (Ignorado) 47. Fator RH: (Positivo) (Negativo) (Ignorado)
48. Raça: (Branco) (Negro) (Índio) (Mestiço) (Oriental)
49. Doador de Sangue? (Não) (Sim) (Hemoce) (Fujisan) _____ 50. Data: _____
51. Doou outras vezes? (Não) (Sim) Quantas vezes? _____ 52. Data: _____

- Assinale os itens abaixo, quando presentes, com um **X**

53. **Transfusão Sangüínea:** () Data: _____
54. **Cirurgia:** () Data: _____ Quais? _____
55. **Drogas:** () Quais? _____
56. **Tatuagem:** () Data: _____
57. **Injeção IM ou EV:** () Data: _____
58. **Extração dentária:** () Data: _____
59. **Em relação à prática sexual:** (Heterossexual) (Homossexual) (Bissexual) (Sem atividade)
60. **Usa ou usava camisinha?** (Não) (Sim) (Às vezes) (Ignorado) (Não se aplica)
61. **Nº. de parceiros no último ano:** (Apenas 1) (de 2 a 5) (mais de 5) (Ignorado) (Não se aplica)
62. **Teve doença sexualmente transmitida?** () Quantas no último ano? ___ Quais? _____
63. **Faz diálise?** () Há quantos anos? _____
64. **Faz acupuntura ou tem piercing?** ()
65. **Faz tratamento para alguma doença?** () Qual? _____
66. **Bebe ou bebeu álcool?** () Há quanto tempo? ___ (Socialmente), (Moderado), (Alcoólatra)
67. **Teve contato com alguém que apresentou hepatite na família ou no trabalho?** ()
68. **Seu parceiro (esposa/ esposo, namorado/ namorada) teve hepatite?** () Data: _____
69. **Você já teve hepatite antes?** () Data: _____ Sabe qual foi o tipo? _____
70. **Solicitou exame do parceiro?** (Solicitou) (Não solicitou) (Ignorado) (Não se aplica)
- **71. Resultado do exame do parceiro:** (Negativo) (Positivo) (Aguarda resultado) (Ignorado)

Dados Laboratoriais

72. **Exames sorológicos:** assinale com (+) reagente e (-) não reagente, podendo ser mais de um alterado.

- | | | | |
|-------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 73. Anti-Hbc IgG | () ___/___/___ | 74. HbsAg | () ___/___/___ |
| 75. Anti-HBc IgM | () ___/___/___ | 76. Anti-HCV | () ___/___/___ |
| 77. Anti- HVA IgM | () ___/___/___ | 78. Anti-HBs | () ___/___/___ |
| 79. HIV | () ___/___/___ | 80. VDRL | () ___/___/___ |
| 81. Chagas | () ___/___/___ | 82. HTLV I/II | () ___/___/___ |

83. **Exames laboratoriais:**

Data	TGP	TGO	Btotal	Bdireta	TAP	Ptotais	Albumina	Globulina
___/___/___	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
___/___/___	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
___/___/___	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

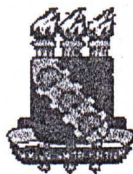
Tratamento

84. **Vem recebendo algum medicamento regularmente?** (Sim)(Não) Quais? _____
85. **Está sendo tratado para HCV?** (Sim), (Não) 86. **Início do tratamento** ___/___/___
87. **Esquema do tratamento:** (Interferon), (Ribavirina), (Interferon e Ribavirina), _____
88. **Duração do tratamento:** _____ 89. **Tratamento interrompido?** (Sim), (Não)

Observações:

ANEXO III – DECLARAÇÕES

ACEITE COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 242/05

Fortaleza, 29 de abril de 2005

Protocolo COMEPE n° 105/05

Pesquisador responsável: Cristianne Sousa Bezerra

Dept°./Serviço: Laboratório de Biologia Molecular/DPML

Título do Projeto: "Epidemiologia molecular do vírus da hepatite C em Fortaleza-CE"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 28 de abril de 2005.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Frota Bezerra', written over a faint circular stamp.

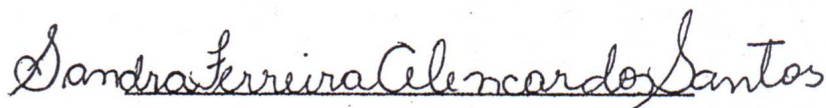
Prof. Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador Adjunto do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWC/UFC

REVISÃO PORTUGUÊS

Declaração

Eu, Sandra Ferreira Alencar dos Santos, com identidade nº 93002030667, profissional graduada pela Universidade Federal do Ceará em Letras-Inglês e suas respectivas literaturas, com diploma registrado sob o nº 57436, declaro para devidos fins que revisei o Texto de Monografia intitulado “Epidemiologia molecular do vírus da hepatite C em Fortaleza, Ceará.” Escrito pela mestranda Cristianne Sousa Bezerra. Sem mais para o momento, subscrevo-me atenciosamente;

Fortaleza, 12 de janeiro de 2006.



Sandra Ferreira Alencar dos Santos

ANEXO IV - PUBLICAÇÕES

RESUMO APRESENTADO NA FORMA DE PÔSTER NO XLI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL E DO I ENCONTRO DE MEDICINA TROPICAL DO CONE SUL
Realizado em Florianópolis – SC, no período de 6 a 10 de março de 2005

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE C EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE TRANSFUSÃO SANGÜÍNEA EM FORTALEZA, CEARÁ

Cristianne Bezerra, Roxeane Martins, Luana Lima, Cristiane Frota

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Núcleo de Estudos Avançados em Microbiologia Médica.

Rua Monsenhor Furtado SN. Rodolfo Teófilo. CEP. 60.441.750. Fortaleza - Ceará.
tiannebezerra@yahoo.com.br

Introdução: Estima-se que cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV). O HCV pode ser transmitido em qualquer situação em que sangue infectado é transferido entre indivíduos, tendo sido associado à transmissão através de transfusões sangüíneas quando ainda não se fazia pesquisa de anti-HCV nos bancos de sangue. Outras formas de transmissão associadas ao vírus são o uso de drogas intravenosas, tatuagens e prática de *body-piercing*. O HCV é classificado mundialmente em seis genótipos: 1, 2, 3, 4, 5 e 6. **Objetivo:** Delinear a distribuição genotípica do HCV em pacientes submetidos a transfusão sangüínea e com infecção aguda ou crônica em Fortaleza. **Metodologia:** O estudo foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio, onde foram entrevistados e submetidos à coleta de sangue 43 pacientes com sorologia positiva para HCV. O teste qualitativo foi feito por PCR, utilizando-se *primers* relativos à região 5' não-codificante do genoma viral. Os resultados positivos foram submetidos à genotipagem através da técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) descrita por Simmonds *et al*, 1995. **Resultados e conclusão:** Dos 43 pacientes estudados, 20 apresentavam história de transfusão sangüínea (46,51%). Dentre estes, 14 (70%) tiveram resultado qualitativo positivo. A análise genotípica do HCV destes pacientes apresentou a seguinte distribuição: genótipo 1 (64,28%), genótipo 2 (7,14%), genótipo 3 (28,57%). O genótipo 1 foi predominante, tanto entre os pacientes com história de transfusão sangüínea, quanto entre aqueles que teriam adquirido o vírus por outro meio.

TRABALHO APRESENTADO NA 57ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC
Realizada em Fortaleza – CE, no período de 17 a 22 de julho de 2005

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO
VÍRUS DA HEPATITE C GENÓTIPO 3, EM FORTALEZA, CEARÁ**

Cristianne Sousa Bezerra, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima,
José Milton de Castro Lima, Elodie Bomfim Hyppolito, Roxelane Martins Monteiro,
Cristiane Cunha Frota

Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Núcleo de Estudos Avançados em Microbiologia Médica.

Rua Monsenhor Furtado SN. Rodolfo Teófilo. CEP. 60.441.750. Fortaleza - Ceará.
tiannebezerra@yahoo.com.br

Introdução: Estima-se que cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV). O HCV pode ser transmitido em qualquer situação em que sangue infectado é transferido entre indivíduos, tendo sido associado à transmissão através de transfusões sanguíneas quando ainda não se fazia pesquisa de anti-HCV nos bancos de sangue. Outras formas de transmissão associadas ao vírus são o uso de drogas intravenosas, tatuagens e prática de body-piercing. O HCV é classificado mundialmente em seis genótipos: 1, 2, 3, 4, 5 e 6, tendo sido relatado previamente a prevalência do genótipo 3 no estado do Ceará (Busek et al, 2003).

Objetivo: Estabelecer o perfil epidemiológico de pacientes infectados com o vírus da hepatite C genótipo 3.

Metodologia: Este estudo foi realizado em 43 pacientes com infecção crônica pelo HCV, atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio em Fortaleza, Ceará. Estes pacientes foram identificados como infectados pelo HCV através de teste qualitativo feito por PCR, utilizando-se primers relativos à região 5' não-codificante do genoma viral. A genotipagem do vírus foi feita através da técnica de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) descrita por Davidson et al, 1995.

Resultados: Dos 43 pacientes estudados, 13 (30%) apresentavam infecção por HCV genótipo 3 em idade de 29 a 43 anos. As mulheres correspondiam a 38% deste grupo e os homens compunham os 62% restantes. O fator de risco para aquisição do HCV mais presente entre os indivíduos foi história prévia de cirurgia (43%). Outros fatores de risco presentes foram: história de transfusão sanguínea (19%) e uso de drogas intravenosas (14%). Em alguns casos (10%), o paciente não apresentava nenhum dos fatores de risco já conhecidos para aquisição da doença.

Conclusões: Os resultados deste estudo coincidiram com aqueles relatados na literatura que apontam a transfusão sanguínea e o uso de drogas intravenosas como as formas mais comuns de aquisição do HCV.

Nos pacientes que não haviam se exposto a nenhum dos fatores de risco relata-se a possibilidade de aquisição da doença por formas de transmissão não comuns, como: sexual e por compartilhamento de objetos perfuro-cortantes como lâminas de barbear e aparelhos de manicure.

Palavras-chaves: Hepatite C, genotipagem, epidemiologia.

**ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO AO JOURNAL OF CLINICAL
VIROLOGY**

**Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection in different populations of Ceará,
northeast of Brazil**

Cristianne S. Bezerra^{1*}, José M.C. Lima², Elodie B. Hyppolito², Janaína L. Vilar¹, José L.B. Moreira¹, Adilina S. Cunha¹, Cristiane C. Frota¹

¹Division of Medical Microbiology, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado s/n, 60441-750 Fortaleza-CE, Brazil

²Hospital Universitario Walter Cantidio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

*Corresponding author:

Cristianne S. Bezerra, Rua Raimundo Frota 552, Bairro Barra do Ceará, 60330-780, Fortaleza-CE, Brazil. Tel: 85-32841221. E-mail: tiannebezerra@yahoo.com.br.

Number of words in the abstract: 188

Number of words in the text: 2.704

Abstract

Background: The hepatitis C virus (HCV) is classified into six different genotypes and their distribution is different all over the world. Epidemiologic studies are important to determine several characteristics about the virus and the disease. **Objectives:** This study measured the prevalence of hepatitis C virus (HCV) and its genotype distribution in the population of Ceará, which is located in the northeast region of Brazil. **Study design:** A total of 120 patients that were anti-HCV seropositive filled a questionnaire about risk behaviours associated with HCV infection and were tested for HCV PCR qualitative test and genotyping by restriction fragment polymorphism. The detection was based in the amplification of the no-coding 5' region. **Results:** Of the total, 96 were positive to HCV test. History of surgery was the most reported, followed by use of drugs, tattoo, haemodialysis and occupational exposure. The genotype 1 was the most prevalent (46.9%), followed by genotype 3 (34.4%) and 2 (8.3%). It was identified one patient with genotype 4. **Conclusions:** The genotype distribution was similar among the several analysed risk behaviours. HCV genotype 4 was detected for the first time in northeast region of Brazil.

Keywords: Hepatitis C virus; Genotypes, Epidemiology: Northeast Brazil; Genotype 4.

Introduction

The infection by Hepatitis C virus (HCV) has a worldwide distribution with a prevalence of about 2% (Shepard *et al.*, 2005). Despite its usually asymptomatic clinical course, the virus can cause chronic liver disease, either by chronic active hepatitis or cirrhosis or hepatocellular carcinoma (Zoulim *et al.*, 2003). Hepatic biopsy is the gold-standard test to estimate the intensity of the tissue damage in chronic hepatitis and to determine the histological activity, while amino-transferase enzymes levels (ALT and AST) are indicators of the histological lesions severity (Lo Re V and Kostman, 2005; Silva *et al.*, 2005).

The virus transmission is well documented by exposition to contaminated blood and blood products. In the past, blood transfusion was the most important way for HCV transmission, but, after the discovery of HCV (Choo *et al.*, 1989) and the appearance of screening tests for hepatitis C (Kuo *et al.*, 1989), the incidence of hepatitis C infection transmitted by blood transfusion is decreasing (Allain, 2003). Vertical and sexual transmissions are also present but the risk appears to be low. Injection drug users represent the major risk group for HCV transmission and both incidence and prevalence of HCV infection remain high in this group. In the same way, intranasal cocaine use, tattooing and body piercing practice are others modes of HCV transmission (Ghosn *et al.*, 2005; Hellard *et al.*, 2004; Dev *et al.*, 2004; Hellard *et al.*, 2003; Paternoster *et al.*, 2001; Nishioka and Gyorkos, 2001).

The HCV is a positive stranded RNA virus with a genome of approximately 9600 nucleotides (Roingard *et al.*, 2004). Different isolates of HCV show substantial nucleotide sequence variability as a result of the accumulation of mutations during viral replication. This heterogeneity permitted classified the virus into six genotypes (1, 2, 3, 4, 5 and 6) divided in several subtypes (Simmonds *et al.*, 1993; Okamoto *et al.*, 1991). Genotype determination is crucial for epidemiological, as well as, clinical analysis. First, HCV genotypes show a distinct geographical distribution, being the genotypes 1, 2 and 3 the most frequent in the world, while others, as genotype 4, for example, are found predominantly in specific geographic areas (McOmish *et al.*, 1994). HCV genotypes are also associated with specific routes of transmission and epidemiological features (Shustov *et al.*, 2005; Dore *et al.*, 2003).

HCV genotypes can be determined by nucleotide sequencing of the entire genome followed by composition of a phylogenetic tree, which is presently the “gold standard” for the detection and identification of the various HCV genotypes and subtypes (Haushofer *et al.*, 2003). Other genotyping methods, more practical, are based in serological or molecular techniques. PCR-based genotyping methods include use of genotype specific primers for amplification, reverse hybridization analysis using genotype specific probes for an HCV

region and RFLP analysis of the highly conserved 5' non coding region (Pawlotsky, 1999). According Davidson *et al.* (1995), one of the advantages of using the 5'NCR for genotyping is the existence of a few identifiable polymorphisms between major genotypes that reliably associate with examples of the known genotypes.

Previous study suggested the prevalence of genotypes 1 and 3 in Brazil (Busek *et al.*, 2003), however the work was carried out, mainly, in the south and Southeast of the country. Therefore, this study aims to evaluate the prevalence of HCV genotypes in Ceara (Northeast of Brazil) and correlates with the epidemiological data.

Materials and methods

1. Patients

This study was carried out in 120 patients with chronic HCV infection, which had attended the Walter Cantidio University Hospital, Ceara (northeast of Brazil), between March 2004 and August 2005. The Walter Cantidio University Hospital is considered as the reference hospital in the treatment of HCV in that state. The study population included 71 (59%) men and 49 (41%) women, in the age varying from 18 to 80 years old.

The study group included patients with anti-HCV positive blood test, and also the ones screened for HCV infection from high risk groups. These patients came from different parts of the state. All patients were informed about the research and they had signed a written informed consent.

2. HCV RNA detection

For HCV RNA detection, blood was collected in tubes without any anticoagulant solution and kept at 4°C for a period between 2 and 4 hours before centrifugation. After that, the serum was obtained and the aliquots were stored at -80 °C until further testing.

Viral RNA was extracted from 200 µL serum with 300 µL TRIZOL® (Invitrogen), separated in an aqueous phase by chloroform addition and precipitated with ethanol (Chomczynski and Sacchi, 1987). The RNA pellet was reverse transcribed with MMLV (Invitrogen) and amplified by nested PCR using specific primers within 5' non-coding region of HCV genome as previously described (Chan *et al*, 1992). A reaction negative control, which was the reverse transcription mix without RNA, was included. A known positive serum was used as a positive control.

The second PCR amplification product was separated by electrophoresis on 1,2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. Negative results were repeated in order to confirm the assay; therefore the test was repeated from the RNA extraction. In case of contamination all the tests were repeated.

3. HCV genotyping

Restriction digestion was carried out on 25 µL of nested PCR product for 4-16 hours after adjustment with 10× enzyme reaction buffer as appropriate, as described by Davidson *et al* (1995) and McOmish *et al* (1994). Digestions were at 37 °C in the presence of (a) *Hae*III and *Rsa*I, and (b) *Mva*I and *Hinf*I.

Digestion products were visualized under UV light after electrophoresis through a 4% metaphor agarose Metaphor gel (Cambrex) containing 0,5 µg/mL ethidium bromide.

4. Collection of Epidemiological Data

Information was collected by confidential face-to-face interview regarding potential host-related and environment-related risk factors to HCV. Extensive medical history was also collected. Clinical information, including ALT and AST levels, were obtained from the hospital records of each patient. A form containing all these data was filled for further analysis. Informed consent was obtained from all subjects who participated in this study. Guidelines of the Ethical Committee of the Medical School, Federal University of Ceara, were followed in the conduct of this research.

5. Statistical analysis

Analysis was performed using two statistical database packages: SPSS v 10 for windows (IL, USA) and Epi-Info 6.04d (Center for Disease Control, GA, USA). Fisher's exact test and χ^2 test (Yates corrected) were used to analyse frequencies between groups when appropriate. It was also considered P values < 0.05 as statistically significant.

Results

HCV molecular detection

During the study period, 120 patients were analysed, of these 96 (80%) were positive in the HCV qualitative test, being 38 (39.6%) women and 58 (60.4%) men. The age mean was of 44 ± 2 years, ranging from 18 to 68 years, while 89% of the patients (78/96) had their age between 32 and 59 years old (Figure 1). The age distribution between the gender did not show significant difference ($P > 0.05$).

The risk of HCV was found to be associated with clinical history of surgery, being present in 73% of the patients. Forty-four patients (45.8%) had reported previous blood transfusion. Dialyses, tattoo and occupational risk corresponded respectively to 7.3%, 10.4% and 8.3% of the HCV positive patients (Table 1). In 1993 it was started the investigation of anti-HCV in the Brazilian blood banks, and in our study it was seen that there was no association of HCV with blood transfusion before of after 1993 ($P = 0.35$, according to the Fisher test). In contrast, the risk of HCV increased among the drug users (96% of them were HCV positive), and this behaviour was statistically significant ($P = 0.04$).

Finally, ninety percent of the patients that had shown abnormal transaminases titles were positive in the qualitative test ($P = 0.39$), while 92.6% of the symptomatic ones were also positive in this test.

Genotype distribution

All 96 patients that were positive in the PCR were submitted to the genotyping (table 2). As can be seen, the genotype 1 was the most prevalent, with 45 patients (46.9%), followed by the genotype 3 (33 patients, 34.4%), genotype 2 (8 patients, 8.3%) and genotype 4 (only 1 patient). It was not possible to determine the genotype of nine samples, and these cases were classified as indeterminate (Figure 2).

Results from the genotype analysis and host-related factors are also displayed in table 2. At an individual level, the association of a specific genotype and history of surgery, blood transfusion, drug users, sexual transmitted disease, tattoo or dialysis was not statistically significant. However, the genotype 1 was significantly more prevalent among the patients with occupational risk ($P = 0.01$). Overall, the prevalence was greater among those with genotypes 1 and 3 in all of the investigated risk factors.

Discussion

The present study is one of the first to examine risk factors for HCV in Ceara, consistently in HIV negative patients, allowing the investigation of the respective effects of different factors and HCV. The patients were recruited by a prepared physician, in a medical school hospital that is reference in the treatment of hepatitis in Ceara. They were selected based on their clinical history for HCV or anti-HCV seropositivity.

In our study, the HCV positive patients were male and at medium age (mean of 44 years old), being 81% of the patients with their age varying from 32 to 59. A similar study carried out also Brazil found an average age for men of 45 years and women of 39 years (Paraná *et al.*, 2000). Similarly, two independent studies carried out on United States and Italy, also demonstrated that HCV positive patients tend to be between 38 and 48 years and illness patients in the age between 40 and 60 years (Ansaldi *et al.*, 2005; Williams, 1999). The observed association of HCV with male sex reflects the sex differences with regard to stigma and its social consequences, which may result in differential health-seeking behaviour. In the present study, the transaminases levels were seen modified in 64.5% of the patients. In a study evaluating candidates to the treatment for hepatitis C, Parana and co-workers reported that 82.4% of their patients had that altered ALT levels (Paraná *et al.*, 2000). It might be possible that the high percentage of transaminases levels in Parana's study reflect that their patients were starting the treatment for HCV.

Before the HCV investigation was established as a routine screening exam in blood banks, the hepatitis C was known as hepatitis post blood transfusion due to its association to transmission by blood transfusions (Alter *et al.*, 1975). In our study the history of blood transfusion was the most prevalent of all studied risk factors, and 83% of the transfused patients (53/120) were positive in the HCV qualitative test. Nevertheless, the high prevalence of blood-transfused patients in this study compared to the other risk factors might be due to a campaign carried out in 2004 by the Federal Health Ministry advising the population who had received blood transfusion before 1993 to do the serologic test for the detection of HCV antibodies. In our study, the year of the blood transfusion and the qualitative HCV test did not show statistical significance; therefore, further analysis of this group of patients might provide additional information on their vulnerability. An Italian study reported 6% of anti-HCV seroprevalence in patients who received blood transfusion (Bellentani *et al.*, 2000).

The prevalence of HCV among drug users detected in our study was the highest compared to other exposure behaviors, similar to that described by Shepard and coworkers (2005): from 64 to 94% worldwide, being the prevalence increasing with duration of exposure. However, we did not determine whether were different ways of drug inoculation or

different kinds of drugs, such as injected drug, inhaled cocaine and marihuana cigar. Nowadays, the use of intravenous drugs is the major route to transmit hepatitis C and also is the principal way of infection maintenance of this particular virus in the populations (Shepard *et al.*, 2005; Dore *et al.*, 2003).

We found that the risk of HCV was also associated with sexually transmitted disease (STD), since these diseases are related to sexual risk behaviour and without proper care, however our data did not show statically significance. In a Siberian study, it was noticed that the risk factor for HCV infection was higher among individuals that had at least four sexual partners during their life history, homosexual behaviour, or history of sexually transmitted disease (Shustov *et al.*, 2005). The prevalence of HCV patients among the professionals that work in hospitals or clinical laboratories was according to that described by Shustov and co-workers (2005). In that study, they reported that this kind of work does not constitute significant impact to HCV positivity.

History of surgery was seen in mostly of the patients; nevertheless, they also had other type of exposure or behaviour associated to HCV infection. Recent studies had described low or no association to HCV when patients were previously submitted to surgeries, general anaesthesias or dental treatments (Leao *et al.*, 2006 and Shustov *et al.*, 2005). In opposite to this, an African study had shown a rate of 50% of HCV positivity among patients that were submitted to injections without proper biossecurity measures or with no-disposable needles and syringes, therefore contributing to the HCV dissemination in that continent (Madhava *et al.*, 2002).

In our study, we identified the genotypes 1, 2, 3 and 4 in the total of 96 HCV positive patients, and inconclusive genotyping in nine patients. Importantly, the genotype 4 was detected in one single patient of the male gender, about 50 years old, and had history of receiving blood transfusion in 1968 and a previous sexual transmitted disease by gonococcus. The patient is from the countryside of the northeast, never lived or travelled to abroad, and had no close contact with foreigners. This genotype had not been identified yet in published studies carried out in the population of the northeast region of Brazil (Campiotto *et al.*, 2005; Busek *et al.*, 2003; Paraná *et al.*, 2000 and Oliveira *et al.*, 1999). This genotype is frequently related to countries in Central Africa and mainly, in Egypt (Webster *et al.*, 2000 and el Gohary *et al.*, 1995). In Brazil, the genotype 4 had been detected at low rate only in southeast states, varying from 0.2 to 0.7% of HCV positive individuals (Campiotto *et al.*, 2005 and Oliveira *et al.*, 1999). At similar way, in the United States, the genotype 4 viral shows a prevalence of 1.1% and is frequently associated to the transmission by intravenous drugs or by inhaled cocaine (Lyra *et al.*, 2004). The philogenetics analysis of the isolated nucleic acid

from this patient would be important to show insights about its origin or genotype entrance in the northeast of Brazil.

A previous study carried out in Brazil had described the predominance of genotype 3 in the state of the Ceará, however, this published study had investigated only ten patients from the same haemodialysis clinic. In this way, there is the possibility of nosocomial contamination among the patients, which explains the high rate of this genotype (Busek et al., 2003). More recently, a study carried out by Campiotto and co-workers (2005) with 23 patients had shown the genotypes distribution in the northeast region: genotype 1 was the most common (66.4%), followed by genotype 3 (30.4%) and for last the genotype 2 (3.0%). Despite of the genotype 1 had shown significance association with occupational exposure and with what is published in the literature, our study did not show evidence of a association between a specific genotype in relation and a risk factor to HCV. Similarly, no significant relation was observed among the patient's age group and the genotypes distribution.

Our data reinforce the need for patient tracing and the use of nucleic acid sequencing techniques in order to explain the HCV epidemiology in our country, and to investigate the unidentified genotypes. We also believe, that studies targeting a specific population, like injecting drugs users or patients under haemodialysis, would provide better insights to explain their epidemiology.

Acknowledgments

We thank to the patients who participated in the study and hospital staff at Walter Cantidio University Hospital. We acknowledge the Health Secretary of Sobral and Fortaleza, also CAPES/Brazil for funding the study.

References

- Allain JP. Transfusion risks of yesterday and of today. *Transfus Clin Biol* 2003; 10(1):1-5.
- Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975; 2(7940):838-41.
- Ansaldi F, Bruzzone B, Salmaso S, Rota MC, Durando P, Gasparini R, Icardi G. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol* 2005; 76(3):327-32.
- Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Saccoccio G, Tiribelli C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Italy: the slowly unraveling mystery. *Microbes Infect* 2000; 2(14):1757-63.
- Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genet Mol Res* 2003; 2(1):117-23.
- Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(1):41-9.
- Chan SW, Mcomish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, Yap PL, Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73(Pt 5):1131-41.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.
- Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt 5):1197-204.
- Dev A, Sundararajan V, Sievert W. Ethnic and cultural determinants influence risk assessment for hepatitis C acquisition. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19(7):792-8.
- Dore GJ, MacDonald M, Law MG, Kaldor JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *Aust Fam Physician* 2003; 32(10):796-8.

- El Gohary A, Hassan A, Nooman Z, Lavanchy D, Mayerat C, el Ayat A, Fawaz N, Gobran F, Ahmed M, Kawano F, et al. High prevalence of hepatitis C virus among urban and rural population groups in Egypt. *Acta Trop* 1995; 59(2):155-61.
- Ghosn J, Leruez-Ville M, Chaix ML. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Presse Med*. 2005; 34(14):1034-8.
- Haushofer AC, Berg J, Hauer R, Trubert-Exinger D, Stekel HG, Kessler HH. Genotyping of hepatitis C virus-comparison of three assays. *J Clin Virol* 2003; 27(3):276-85.
- Hellard M, Aitken C, Mackintosh A, Ridge A, Bowden S. Investigation of infection control practices and knowledge of hepatitis C among body-piercing practitioners. *Am J Infect Control* 2003; 31(4):215-20.
- Hellard ME, Hocking JS, Crofts N. The prevalence and the risk behaviours associated with the transmission of hepatitis C virus in Australian correctional facilities. *Epidemiol Infect* 2004; 132(3):409-15.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244(4902):362-4.
- Leao JC, Teo CG, Porter SR. HCV infection: aspects of epidemiology and transmission relevant to oral health care workers. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006. [Epub ahead of print]
- Lo Re V 3rd, Kostman JR. Management of chronic hepatitis C. *Postgrad Med J* 2005; 81(956):376-82.
- Lyra AC, Ramrakhiani S, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Infection with hepatitis C virus genotype 4 in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38(1):68-71.
- Madhava V, Burgess C, Drucker E. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(5):293-302.
- McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EA, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4):884-92.
- Nishioka SA, Gyorkos TW. Tattoos as risk factors for transfusion-transmitted diseases. *Int J Infect Dis* 2001; 5(1):27-34.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72(Pt 11):2697-704.

Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, Paetzold U, Schreier E, Pauli G, Yoshida CF. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(3):279-82.

Parana R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcante A, Lyra L, Trego C. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol* 2000; 37(4):213-6.

Paternoster DM, Santarossa C, Grella P, Palu G, Baldo V, Boccagni P, Floreani A. Viral load in HCV RNA-positive pregnant women. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(9):2751-4.

Pawlotsky JM. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1):71-9.

Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 2004; 96(2):103-8.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(9):558-67.

Shustov AV, Kochneva GV, Sivolobova GF, Grazhdantseva AA, Gavrilova IV, Akinfeeva LA, Rakova IG, Aleshina MV, Bukin VN, Orlovsky VG, Besspalov VS, Robertson BH, Netesov SV. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Western Siberia. *J Med Virol* 2005; 77(3):382-9.

Silva GF, Nishimura NF, Coelho KI, Soares EC. Grading and staging chronic hepatitis C and its relation to genotypes and epidemiological factors in Brazilian blood donors. *Braz J Infect Dis* 2005; 9(2):142-9.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, Mcomish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74(Pt 11):2391-9.

Webster G, Barnes E, Brown D, Dusheiko G. HCV genotypes--role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000; 14(2):229-40.

Williams I. Epidemiology of hepatitis C in the United States. *Am J Med* 1999; 107(6B):2S-9S.

Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003; 13(1):57-68.

Tables**Table 1:** Relation between the risk factors to HCV infection and the result of the qualitative HCV PCR assay.

Risk factors	Result of the qualitative PCR assay				P value*
	Positive	(%)	Negative	(%)	
Surgery	70	(80)	17	(20)	NS †
Blood transfusion	44	(83)	9	(17)	NS
Drugs	24	(96)	1	(4)	0,04
Sexually transmitted disease	30	(88)	4	(12)	NS
Tattoo	10	(77)	3	(23)	NS
Dialyses	7	(70)	3	(30)	NS
Occupational risk	8	(80)	2	(20)	NS

* Fisher's exact test

† Not statistically significant

Table 2: Comparison of risk factors and HCV genotypes.

Risk factors §	HCV Genotypes								P value*	
	Type 1 (%) (n = 45)		Type 2 (n = 8)		Type 3 (%) (n = 33)		Indeterminate (%) (n = 9)			
Surgery										
Yes (n = 70)	32	(45.7)	5	(7.1)	27	(38.6)	6	(8.6)	NS †	
No (n = 25)	13	(52)	3	(12)	6	(24)	3	(12)	NS	
Blood transfused										
Yes (n = 43)	20	(46.5)	5	(11.6)	16	(37.2)	2	(4.7)	NS	
No (n = 52)	25	(48)	3	(5.8)	17	(32.7)	7	(13.5)	NS	
Drugs use										
Yes (n = 24)	11	(45.8)	2	(8.4)	8	(33.3)	3	(12.5)	NS	
No (n = 71)	34	(47.8)	6	(8.5)	25	(35.2)	6	(8.5)	NS	
Sexually transmitted disease										
Yes (n = 30)	13	(44.8)	4	(13.8)	10	(34.5)	2	(6.9)	NS	
No (n = 66)	32	(48.5)	4	(6.1)	23	(34.8)	7	(10.6)	NS	
Any tattoos										
Yes (n = 10)	6	(60)	0	(0)	4	(40)	0	(0)	NS	
No (n = 85)	39	(45.9)	8	(9.4)	29	(34.1)	9	(10.6)	NS	
Dialyses										
Yes (n = 7)	4	(57.1)	0	(0)	3	(42.9)	0	(0)	NS	
No (n = 88)	41	(46.6)	8	(9.1)	30	(34.1)	9	(10.2)	NS	
Occupational exposure										
Yes (n = 8)	7	(87.5)	0	(0)	1	(12.5)	0	(0)	0.01*	
No (n = 87)	38	(43.7)	8	(9.2)	32	(36.8)	9	(10.3)	NS	

§Totals vary according to the availability of data.

* Fisher's exact test

† Not statistically significant

Figure Legends

Figure 1. Age distribution of 96 patients with positive qualitative HCV PCR assay.

Figure 2. Restriction patterns obtained by restriction endonuclease digestion on 251 bp RT-PCR amplified 5'NCR sequences as described by Davidson et al., 1995 and McOmish et al., 1994. The digests were separated by electrophoresis through a 4% Metaphor agarose and the sizes obtained were determined by comparing the mobility of the DNA molecular size marker 25 bp. Genotype was deduced from the handling patterns produced by the two restriction enzyme patterns. Reactions were at 37°C in the presence of (A) *Hae*III and *Rsa*I and (B) *Mva*I and *Hinf*I. Lanes 1, 3, 8 and 10 – genotype 2; lanes 2 and 9 – genotype 1; lanes 4-6 and 11-13 – genotype 3.

Figures

Figure 1

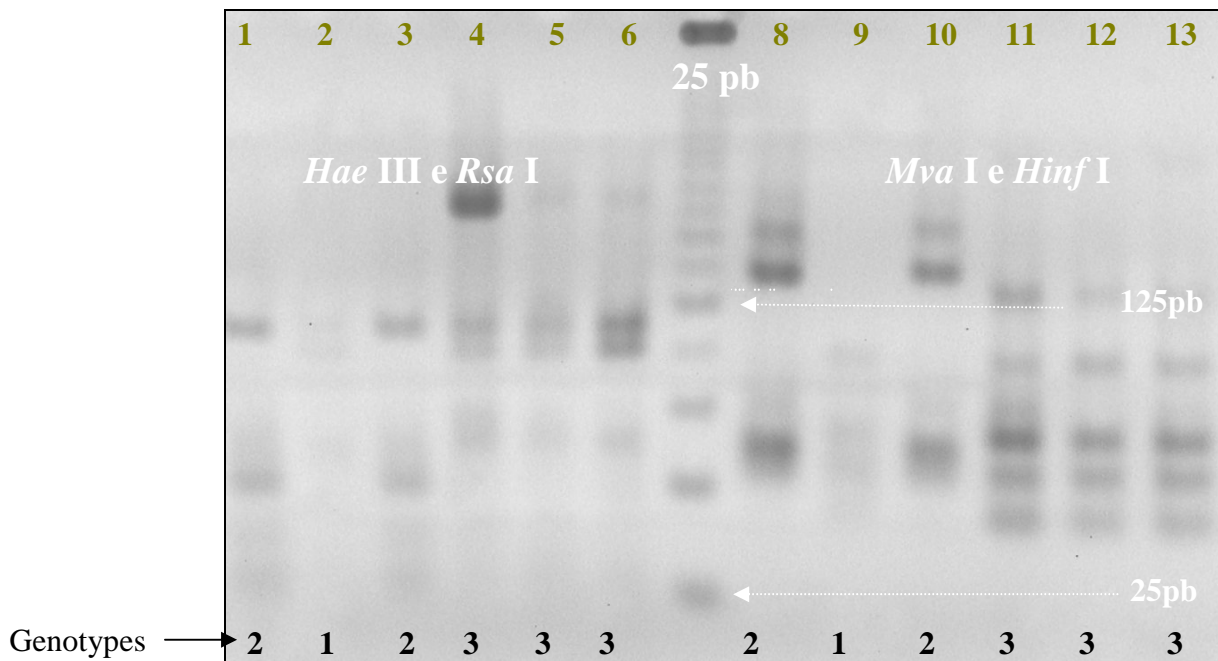


Figure 2

