

ROZANGELA VERLENGIA

**OTIMIZAÇÃO DA NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO NA
DETECÇÃO DO RNA-HCV**

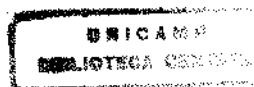
Tese apresentada a Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia e Patologia Buco-Dental.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Piracicaba
São Paulo
-1999 -



ROZANGELA VERLENGIA

**OTIMIZAÇÃO DA NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO NA
DETECÇÃO DO RNA-HCV**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Biologia e Patologia Buco-Dental.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução COMG-036/83


Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata

Piracicaba
São Paulo
- 1999 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	T/UNI CAMP		
	V589a		
V.	Es.		
TOMBO B7/	41581		
PROC.	278/00		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	14-07-00		
N.º CPD			

CM-00142370-1

Ficha Catalográfica

V549a

Verlengia, Rozangela.

Otimização da nested-PCR em tubo único na detecção do RNA-HCV. / Rozangela Verlengia. --del s. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
130f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Hepatite por vírus. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Otimização. I. Hirata, Mário Hiroyuki. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 10 de Dezembro de 1999, considerou a candidata ROZANGELA VERLENGIA aprovada.

1. Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA Mario Hirata

2. Prof. Dr. EDISON LUIZ DURIGON Edison Luiz Durigon

3. Prof. Dr. ANTONIO EDUARDO BENEDITO SILVA Antonio Eduardo Benedito Silva

4. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING Jose Francisco Hofling

5. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE Sergio Roberto Peres Line

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus pais, que nada sabem sobre ciência, mas que muito me ensinaram sobre a vida.

Aos meus irmãos, por terem compartilhado comigo todas as emoções, dúvidas, êxitos e tropeços durante toda minha vida, estimulando-me sempre a prosseguir

Ao Prof. Assoc. MÁRIO HIROYUKI HIRATA,

A quem respeito e admiro como pessoa e pesquisador, agradeço pela orientação segura, pelo carinho e atenção sempre presente, durante a realização deste trabalho. E sobretudo, por todas as oportunidades que me foram dadas proporcionando o meu crescimento profissional e individual.

Ao Prof. Assoc. EDISON LUIZ DURIGON

e

Profa. Dra. ROSÁRIO DOMINGUEZ CRESPO HIRATA,

Pela co-orientação criteriosa, excelentes ensinamentos e pelo carinho com que acompanhou a criação de cada fragmento deste todo. Mais ainda, pela evidente preocupação de não deixar o profissional destruir o ser humano que nele vive.

Ao Prof. Titular. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING,

Com quem aprendi os primeiros passos desta profissão e abracei como objetivo de vida. Embora este trabalho tenha sido desenvolvido fora do seu laboratório, a sua participação foi fundamental e decisiva para o estabelecimento das minhas atividades no caminho da consecução do presente trabalho. Meu especial agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Eduardo Benedito da Silva, pela sua importante contribuição para a realização do presente trabalho, pela sua amizade e apreço.

Ao Prof. Dr. Cristóvão Costa pelo apoio e dedicação com que acompanhou a redação final deste trabalho, e principalmente pelo carinho e otimismo transmitidos. A sua presença foi importante para o término deste trabalho.

À Profa. Dra. Regina Ayr. F. Cunha, que além de uma excelente profissional é uma amiga que esteve sempre presente ajudando-me a passar pelas dificuldades individuais e profissionais com otimismo, obrigado pela sua amizade.

Ao Sr. José Neres do Nascimento, pelo companheirismo e constante presença transmitindo o seu incentivo. É muito bom saber que posso contar sempre com você, obrigado pela sua amizade.

À Andrea Fernandes Vieira, pela valiosa colaboração na execução de experimentos envolvidos neste trabalho e ainda pelo carinho e amizade.

Ao Luis Antonio Salazar Navarrete, pelo apoio e dedicação com que sempre me ajudou. Obrigada pela amizade.

À Fernanda Abrahão, pela valiosa colaboração na execução de experimentos envolvidos neste trabalho, bem como pela amizade e incentivo.

Ao Christian Colin pela disposição em me ajudar nas inúmeras vezes que precisei e pela amizade.

À Adriana de Almeida Barreiro, Bibliotecária do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela competente orientação nas correções das referências bibliográficas, e principalmente pelo carinho e a alegria de viver transmitida a minha pessoa.

Aos funcionários, sobretudo amigos da Área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, Anderson Laerte Teixeira, Wilma Correa Ferraz e Elza Maria Thomazzini, os quais conheci quando iniciei este caminho. Obrigada pela preciosa colaboração e principalmente pelo carinho com que sempre me recebem.

A Sonia Maria Llordello Athur e Erica Alexandra Pinho da Coordenadoria da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP- UNICAMP pelo carinho e auxílio profissional.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Dárcio; Regina, Katlin, Fernanda, Valéria, Cecília, Sun, Silvério, Marcos, Emerson, Márcia, Adriana, Neuza, Selma, Jô, Thais, Tatiana, Mellinda, Dorra, Andréa, Heluih, Fabiana, Silvio, Carlos, Alexandre e Boni, que contribuíram, cada um da sua maneira, para a realização desse trabalho. Obrigado pelos momentos de descontração. Vocês são especiais.

Às amigas Ana Maria F. Inglez Souza, Luciana Morganti, Maria Antonieta Avilla, e Telma B. Ingrid, pelo carinho, amizade e companheirismo, valorizando-me como pessoa e profissional a cada instante desta jornada.

Ao Prof. Desidério, pela amizade e constante incentivo, é muito bom trabalhar com voce. Obrigado pela oportunidade.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas pelo carinho e auxílio profissional.

Ao CNPq (CONSELHO NACIONAL PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA), pelo apoio financeiro.

A todos que aqui não foram mencionados, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para que este trabalho fosse possível, a minha sincera gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirada
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
bDNA	<i>Branched DNA</i>
bp	Pares de base
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido dextrorribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ET-NANB	Vírus da hepatite não A e não B transmitido entericamente
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAV	Vírus da hepatite A
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da hepatite C
HDV	Vírus da hepatite D
HEV	Vírus da hepatite E
HGV	Vírus da hepatite G
HGBV-C	Vírus da hepatite G do paciente GB
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFNA- α	Interferon alfa
IFN α 2b	Interferon alfa 2b
Kb	Kilobases
LIPA	<i>Line Probe Assay</i>
NANB	Hepatite não A, não B
NASBA	Amplificação baseada na seqüência do ácido nucléico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pB-HCV-1	Plasmídeo clonado com fragmento da região 5' UTR do genoma do HCV
pB-HCV-2	Plasmídeo clonado com fragmento da região 5' UTR do genoma do HCV com remoção de 72 nucleotídeos
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
RIBA	<i>Recombinant immunoblot assay</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SEN-V	Denominação de um recente vírus implicado em hepatite crônica
SIA	<i>Strip immunoassay</i>

SOD	Superóxido dismutase
T _m	Temperatura de desnaturação
TTV	Vírus transmitido por transfusão
UNG	Uracil-N-Glicosilase
UTR	Região não transcrita

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUÇÃO.....	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 Hepatites Virais.....	5
4.2. Hepatite C.....	9
4.2.1. Características gerais.....	9
4.2.2. Agente etiológico.....	12
4.2.3. Genótipos do HCV.....	16
4.2.4. Epidemiologia.....	20
4.2.5. Via de transmissão.....	23
4.2.6. Tratamento.....	27
4.2.7. Diagnóstico.....	30
4.2.7.1. Diagnóstico sorológico.....	30
4.2.7.2. Diagnóstico molecular.....	37
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5.1. Material.....	51
5.1.1. Reagentes.....	51
5.1.2. Cepas de Bactéria.....	52
5.1.3. Vetor.....	52
5.1.4. Equipamentos e material descartável.....	52
5.2. MÉTODOS.....	54
5.2.1. Clonagem.....	54
5.2.2.1. Obtenção do fragmento da região 5'- UTR.....	54
5.2.2.2. Preparo das células <i>E.coli</i> DH5- α competentes.....	57
5.2.2.3. Transformação da <i>E. coli</i> DH5- α competente com plasmídeo <i>Bluescript KS</i>	58
5.2.2.4. Obtenção e purificação do DNA plasmidial.....	59

5.2.2.5. Digestão do vetor e do produto de PCR com as enzimas <i>Bam</i> H I e <i>Kpn</i> .I.....	60
5.2.2.6. Reação de ligação.....	61
5.2.2.7. Transformação da <i>E. coli</i> DH5-alfa com o plasmídeo recombinante pB-HCV-1.....	61
5.2.2.8. Análise do plasmídeo recombinante pB-HCV-1.....	62
5.2.2.8.1. Análise por restrição enzimática.....	62
5.2.2.8.2. Análise automatizada do inserto clonado.....	62
5.3. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pB-HCV-2 (Controle positivo).....	63
5.4. OTIMIZAÇÃO DA NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO.....	65
5.4.1. Avaliação dos <i>primers</i>	65
5.4.2. Avaliação dos parâmetros da PCR.....	67
5.4.3. Avaliação da concentração dos <i>primers</i> externos na <i>nested</i> -PCR em tubo único.....	70
5.4.4. Adequação do número de ciclos de amplificação na <i>nested</i> -PCR em tubo único.....	70
5.5. TESTE DE SENSIBILIDADE.....	71
5.6. AVALIAÇÃO DO MÉTODO.....	72
5.6.1. Reavaliação da concentração dos <i>primers</i> externos na <i>nested</i> -PCR em tubo único.....	72
5.6.2 Detecção do RNA-HCV em amostras clínicas.....	72
6. RESULTADOS.....	75
6.1. CLONAGEM.....	75
6.1.1. Obtenção do fragmento da região 5' UTR.....	75
6.1.2. Reação de ligação e obtenção do clone recombinante pB-HCV-1.....	75
6.2 AVALIAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO INSERTO CLONADO.....	76
6.3. REMOÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA.....	77
6.4. OTIMIZAÇÃO DA NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO.....	79

6.4.1. Determinação da temperatura de hibridação dos <i>primers</i> na PCR...	79
6.4.2. Determinação da concentração de cloreto de magnésio na PCR.....	79
6.4.3. Adequação do número de ciclos na PCR.....	81
6.4.4. Determinação da concentração dos <i>primers</i> externos e internos na PCR.....	83
6.4.5. Determinação da concentração dos <i>primers</i> externos na <i>nested</i> -PCR em tubo único.....	86
6.5. Estabelecimento dos parâmetros a serem utilizados na <i>nested</i> -PCR em tubo único.....	87
6.6. Número de ciclos na <i>nested</i> -PCR em tubo único.....	88
6.7. TESTE DE SENSIBILIDADE.....	89
6.8. AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZANDO AMOSTRAS CLÍNICAS..	92
6.8.1. Padronização da concentração dos <i>primers</i> externos para a avaliação de amostras clínicas.....	92
6.8.2. Detecção do RNA-HCV em amostras clínicas.....	93
7. DISCUSSÃO.....	97
8. CONCLUSÕES.....	107
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

1. RESUMO

No presente estudo foi otimizado uma metodologia de *nested-PCR* em tubo único para a detecção do RNA-HCV. As condições da *nested-PCR* em tubo único foram estabelecidas utilizando um controle recombinante, produzido pela amplificação da região 5'-UTR do genoma do HCV, clonado no vetor *pBluescript KS*, do qual removeu-se 72 nucleotídeos da região interna do fragmento clonado através da digestão com a enzima *PvuM I*. A amplificação de um único fragmento ao término da reação da *nested-PCR* em tubo único foi alcançado quando foram utilizadas as seguintes concentrações: 2 mM de $MgCl_2$, 5 nM e 200 nM de *primers* externos e internos respectivamente, e temperaturas de hibridação de 72°C e 46°C para a primeira e segunda etapas da reação. Foram utilizados 20 ciclos para a primeira etapa e 35 ciclos para a segunda etapa da reação. Ensaio de sensibilidade usando diferentes números de cópias do controle recombinante (pB-HCV-2), detectaram um mínimo de 900 cópias, que comparado com a *nested-PCR* convencional mostrou sensibilidade 10 vezes inferior. A diferença na sensibilidade observada entre as duas metodologias não interferiu na detecção do RNA-HCV quando amostras biológicas foram testadas. Nossos dados indicam que a *nested-PCR* em tubo único desenvolvida pode ser empregada para a detecção do RNA-HCV mostrando potencialidade para o uso na clínica, como um método alternativo para a detecção do RNA-HCV.

2. ABSTRACT

In the present study a methodology was optimized to a *nested-PCR* in single tube for the detection of RNA-HCV. The sequences of primers were chosen allowing different optimum annealing temperature between the first and second PCR reaction in single tube. PCR conditions were established using an control produced by amplification of 5' NCR from genome that is highly conserved deleting 72 nucleotides with the enzyme *PfuM I* and cloned into *pBluescript KS* vector. The amplification of a single fragment at the end of a single tube reaction in the *nested-PCR* was reached when concentrations of 2 mM of MgCl₂, 5 nM and 200 nM of external and internal *primers*, were used respectively. The temperature of annealing used was 72°C and 46°C for the first and second stage of the *nested-PCR* reaction, with 20 and 35 cycle of amplification respectively. Sensibility tests using different numbers of copies of the control (pB-HCV-2) were able to detect about 900 copies using our method. The conventional *nested-PCR* showed sensibility 10 times higher, detecting 90 copies. The difference in the sensibility observed between the two methodologies didn't interfere in the detection of RNA-HCV when biological samples were tested. Our data indicated that the *nested-PCR* in single tube developed can be used for the detection of RNA-HCV as an alternative method for the detection of RNA-HCV in clinical samples.

3. INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) é responsável pela maioria dos casos de hepatite crônica, como consequência da capacidade do vírus em replicar-se com uma alta taxa de mutação, produzindo uma série de variantes distintas imunologicamente. Devido a sua baixa antigenemia, o diagnóstico da hepatite C é realizado por meio de testes imunoenzimáticos que detectam anticorpos anti-HCV. Esses testes são correntemente utilizados na triagem em bancos de sangue, bem como na abordagem inicial do diagnóstico da hepatite na clínica médica. Entretanto, esses testes têm mostrado baixa eficiência quando utilizados para a triagem de amostras provenientes de populações de baixo risco, como é o caso de bancos de sangue, que representa uma importante via de transmissão, e ainda na população assintomática onde não possibilita a diferenciação entre infecções em curso e adquiridas anteriormente. Esses aspectos levavam a necessidade do uso de procedimentos mais invasivos como o exame histopatológico. Recentemente com o avanço tecnológico favorecendo a detecção do próprio vírus por meio da Biologia Molecular nas amostras biológicas, tem minimizado o uso dos testes sorológicos e histopatológicos. Além disso, a detecção genômica possibilita o diagnóstico da doença em pacientes imunossuprimidos como também nos recém-nascidos e ainda permite quantificar a carga viral auxiliando no monitoramento da terapia.

Dentre as metodologias de ampliações de gene pode-se salientar a *nested-PCR* que apresenta alta sensibilidade e especificidade, devido ao processo de dupla amplificação. Contudo, a alta sensibilidade da *nested-PCR*

pode aumentar a probabilidade de contaminação com produtos previamente amplificados, durante a transferência para a segunda etapa de amplificação.

Assim o objetivo do presente trabalho foi o de otimizar a técnica da *nested*-PCR em tubo único para a detecção do RNA-HCV, de maneira a reduzir o risco de contaminação por carreamento, o tempo de execução e os custos, através da produção de um controle recombinante para a padronização da *nested*-PCR em tubo único e o monitoramento da PCR.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. HEPATITES VIRAIS

Hepatite é um termo genérico que designa a inflamação do fígado com etiologia variável, tais como, infecções virais, bacterianas e parasitárias, bem como, intoxicações por medicamentos, álcool, entre outros. O agente causador da hepatite aguda mais comum é o de natureza viral.

Até o momento, foram identificados cinco tipos de vírus (A, B, C, D e E) causadores das principais hepatites virais, além de outros associados a esta patologia (HGV, TTV e SEN-V). Estes vírus se diferenciam em vários aspectos: na estrutura, conteúdo de ácidos nucleicos, nas vias de transmissão e quando infectam o homem a evolução clínica é significativamente diversa. As características desses vírus têm sido descritas por vários autores (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHERLOCK & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999).

O vírus da hepatite A (HAV) é um membro da família *Picornaviridae*, seu genoma é constituído por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com aproximadamente 7,5 Kb, apresentando-se como uma partícula cúbica de 27 a 32 nm desprovido de envoltório. O período de incubação varia de 2 a 7 semanas, com a maioria dos sintomas aparecendo entre 21 a 35 dias após a infecção. A transmissão ocorre por via fecal-oral. O vírus da hepatite A não causa hepatite crônica e raramente causa hepatite fulminante, sendo a taxa de fatalidade

associada ao HVA em torno de 0,1% (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHERLOCK & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999).

O vírus da hepatite B (HBV) é um membro da família *Hepadnaviridae*, seu genoma é constituído por ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla, circular (3,2 Kb), apresenta-se como uma partícula esférica de 42 nm e possui envoltório. O período de incubação da infecção pelo HBV é de 4 a 26 semanas, sendo que a transmissão ocorre principalmente por via parenteral. O vírus da hepatite B pode produzir hepatite aguda, hepatite crônica não progressiva, hepatite crônica progressiva, cirrose, hepatite fulminante com necrose maciça do fígado e condição de portadores assintomáticos com ou sem doença subclínica progressiva, e pode permitir a infecção pelo vírus da hepatite D (HDV) (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHERLOCK & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999).

O vírus da hepatite C (HCV), denominado anteriormente hepatite não A, não B (NANB) tem o seu genoma constituído por uma fita de RNA de polaridade positiva com um comprimento de 9,4Kb, com envoltório e pertence a família *Flaviviridae*. A hepatite causada pelo HCV tem um período de incubação de 5 a 12 semanas. O HCV tem sido implicado como o principal agente infeccioso da hepatite C transmitida parenteralmente. Em relação ao HBV, o HCV tem uma elevada taxa (superior a 50%) de evolução para a doença crônica, ou eventualmente cirrose (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHERLOCK & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999).

O vírus da hepatite D (HDV) é um vírus RNA incompleto, que necessita das funções do HBV para sua replicação e sobrevivência. Apresenta-se

como uma partícula esférica com aproximadamente 36 nm de diâmetro. O vírus da hepatite Delta é classificado como um agente subviral pertencente ao gênero flutuante Delta vírus. O HDV causa infecção somente quando é encapsulado pelo HBsAg (antígeno de superfície do vírus da hepatite B) do vírus da hepatite B. Embora taxonomicamente distinto do HBV, o HDV é absolutamente dependente das informações genéticas do HBV para sua multiplicação causando hepatite somente na presença do HBV. O período de incubação da hepatite causada pelo HDV é de 4 a 7 semanas (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHERLOCK & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999).

O vírus da hepatite E (HEV), previamente conhecido como hepatite não A, não B transmitida entericamente (ET-NANB), possui um genoma de RNA poliadenilado de 7,6 Kb com polaridade positiva e pertence a família *Caliciviridae*. A via de transmissão é fecal-oral. O HEV não está associado com doença crônica do fígado ou viremia persistente. Um aspecto característico da infecção é a alta taxa de mortalidade entre mulheres grávidas, sendo de aproximadamente 20%. O período médio de incubação após a exposição é de 2 a 8 semanas (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHERLOCK & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999).

O vírus da hepatite G (HGV) e/ou (HGBV-C) é um vírus RNA de fita simples de tamanho aproximado de 9,3 Kb e pertence à família *Flaviviridae*. É transmitido parenteralmente e está presente em aproximadamente 1% a 2% dos indivíduos saudáveis. Compartilha os fatores de risco e transmissão com HBV e HCV. Até o momento há poucas evidências sobre a participação do HGV no desenvolvimento da hepatite aguda. Uma associação entre o HGV e hepatite

aguda adquirida pela comunidade, aliada a falha hepática aguda ou crônica de forma fulminante é de rara ocorrência. Além disso, a co-infecção do HGV com o HCV provavelmente não altera o curso natural da evolução da doença. Há necessidade de estudos adicionais antes de se afirmar ser o HGV ou HGBV-C um vírus hepatotrópico. Assim, tem sido sugerido a denominação "hepatite GBV-C" para esse vírus, do que o prematuramente denominado "hepatite G" (BATTS, 1997).

Outro vírus também associado com hepatite pós-transfusional de etiologia desconhecida denominado TTV, pertence ao gênero Circovirus, possui um genoma de DNA de fita simples, circular, sem envoltório, e foi descrito em 1997 por NISHIZAWA. Semelhante ao "vírus G", com uma alta prevalência de infecção na população em geral, e com ausência de dano significativo do fígado, sugere que o TTV, possa ser um exemplo de um vírus que infecta o homem sem nenhuma associação clara com doença (NAOUMOW *et al.*, 1998).

Dados recentes (1999) reportam a descoberta de um novo vírus associado a hepatites aguda e crônica de etiologia até então desconhecida. O vírus foi denominado SEN-V, descoberto pela equipe do Dr. DANIELE PRIMI no centro de Pesquisa Biomolecular Diasorin na Bréscia, Itália. Em 31 casos de hepatites não-A a não-E, o vírus foi encontrado em 68% dos casos crônicos e 83% dos casos pós-transfusionais. A prevalência do vírus na população geral é menor do que 1% ([http:// www. diasorin. com/news/senv_discovery_white_paper.htm.](http://www.diasorin.com/news/senv_discovery_white_paper.htm))

Outros vírus podem também causar hepatites, porém não são hepatotrópicos. Nesse contexto, temos as infecções virais sistêmicas que podem acometer o fígado, tais como: a mononucleose infecciosa causada pelo vírus

Epstein-Barr, que causa uma hepatite branda durante a fase aguda; a infecção por *Citomegalovirus*, particularmente em recém-nascidos e pacientes imunossuprimidos e a febre amarela, que tem sido a causa mais freqüente das hepatites nos países tropicais. O fígado pode ser afetado também durante o desenvolvimento das infecções pelos vírus da rubéola, adenovírus e herpesvírus. Recentemente, o Parvovírus humano B19, foi associado com casos de hepatite fulminante em crianças na Europa (HOLLINGER & DREESMAN, 1997; SHEILA & DOOLEY, 1997; CRAWFORD, 1999; SOKAL *et al.*, 1998).

Em geral, as hepatites virais agudas estão associadas com um amplo espectro de manifestações clínicas e bioquímicas semelhantes entre si, que variam desde a ausência de evidências da doença e alterações mínimas das funções do fígado até doença fulminante, tornando os testes laboratoriais um recurso imprescindível na identificação do agente etiológico.

4.2. HEPATITE C

4.2.1. Características gerais

Das hepatites virais, a hepatite causada pelo HCV é caracterizada por altas taxas (60-80%) de cronificação em relação as demais, estando associada com o baixo grau de multiplicação viral e sua persistência no paciente (DUVOUX, 1995 e NOUSBAUM *et al.*, 1995).

A fase aguda da infecção por HCV, cujo período de incubação varia de 5 a 12 semanas, é usualmente anictérica e assintomática. Estima-se que 10-25% dos indivíduos infectados com o vírus são sintomáticos, observando-se icterícia (SHERLOCK & DOOLEY, 1997; HOLLINGER & DREESMAN, 1997). A

atividade das transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) estão, em geral, moderadamente elevadas em cerca de 15 vezes o valor de referência, que geralmente são detectados entre 7 e 8 semanas após a infecção. Conseqüentemente, na maioria dos casos, devido a ausência de sintomas ou outras indicações para a realização de teste laboratorial confirmatório, o diagnóstico da hepatite C não é solicitado ou realizado.

Após aproximadamente 6 semanas da infecção pelo HCV, os anticorpos anti-HCV podem ser detectados no soro quando se utiliza teste de segunda geração (WILBER & POLITO, 1995). O RNA-HCV é detectado no soro em uma ou duas semanas após a exposição, quando se utilizam técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (FARCI *et al.*, 1991).

A hepatite C raramente evolui para um quadro agudo fulminante. A principal conseqüência está relacionada à infecção crônica, presente em 80% dos casos de indivíduos infectados pelo vírus C (ESTEBAN *et al.*, 1991; GERBER, 1993). Além disso, dados obtidos em estudos longitudinais mostraram que 20-30% dos pacientes infectados com HCV desenvolveram cirrose (DI BISCEGLIE *et al.*, 1991; ALTER, M.J., 1995; TAKAHASHI *et al.*, 1993; TREMOLADA *et al.*, 1992).

A infecção por HCV está também associada com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) (TSUKUMA *et al.*, 1993). Análise retrospectiva de 21 receptores transfundidos que estavam associado a infecção com HCV no Japão, apresentaram respectivamente evolução para hepatite C crônica, cirrose e HCC após intervalos médios de 10, 19 e 29 anos pós-transfusão (KIYOSAWA *et al.*, 1990).

Os fatores que induzem à cronificação ainda não estão bem definidos. O mecanismo de persistência do vírus no organismo pode resultar da capacidade do vírus em replicar-se com uma alta taxa de mutação, produzindo uma série de variantes distintas imunologicamente ou *quasispecies* que permite ao vírus escapar do controle imunológico do hospedeiro (OGATA *et al.*, 1991; STUYVER *et al.*, 1996; TOKITA *et al.*, 1994). Esse fator está relacionado principalmente com a alta taxa de mutação no gene E2 do RNA-HCV, denominado de região hipervariável que codifica o envoltório viral e possibilita o aparecimento de *quasispecies* do HCV em um mesmo hospedeiro infectado (WEINER *et al.*, 1992; ENOMOTO *et al.*, 1994; KATO *et al.*, 1994; HOOFNAGLE, 1997). Nesse aspecto, um estudo longitudinal que comparou o genoma do HCV em um mesmo paciente com hepatite C crônica por um período de 13 anos, revelou que 28,2% dos nucleotídeos dessa região estavam alterados (OGATA *et al.*, 1991).

O conceito e a importância da hepatite C ganharam maior crédito após a caracterização dos vírus da hepatite A (HVA) e vírus da hepatite B (HVB), tornando possível descrever um outro vírus hepatotrófico (denominado vírus não-A e não-B) que estava implicado em um número significativo de casos de hepatite pós-transfusional (DIENSTAG, 1990). Imediatamente após a identificação do HCV, em 1989 por CHOO *et al.*, tornou-se evidente que esse vírus era o responsável pela maioria dos casos de hepatite não-A e não-B pós-transfusional (AACH *et al.*, 1991; KUO *et al.*, 1989; FEINMANN *et al.*, 1991). Em estudos retrospectivos, 90% dos pacientes com hepatite pós-transfusional apresentaram soro-conversão para anti-HCV e desses, 70-80% desenvolveram hepatite crônica (ALTER, H.J., *et al.*, 1989; AACH *et al.*, 1991; ESTEBAN *et al.*, 1990; TREMOLADA *et al.*, 1992).

4.2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

A descoberta do vírus da hepatite C foi descrita como um evento totalmente dependente das técnicas de Biologia Molecular. No final da década de 70, estudos de transmissão da hepatite C humana à chimpanzés utilizando plasma de pacientes portadores de hepatite C, sugeriam que o agente etiológico dessa doença fosse um vírus (BRADLEY, 1985; HE, 1987). Porém, dificuldades relacionadas principalmente com a baixa concentração do antígeno obtido, impediam de se obter resultados conclusivos nos ensaios imunológicos empregados. Isso levou CHOO *et al.*, 1989, a investigar prováveis ácidos nucléicos presentes no plasma de chimpanzés infectados com hepatite C. Esse estudo foi iniciado por ultracentrifugação de um grande volume de plasma de chimpanzés apresentando um alto título de infectividade (10^6 doses infecciosas/mL). A seguir os ácidos nucléicos foram extraídos, transcritos em cDNA e clonados no vetor (fago λ gT11) e expressos em *E. coli*. As proteínas expressas por indução dos vetores foram analisadas por imunoenaios utilizando soros provenientes de pacientes com hepatites não A e não B.

A análise da seqüência oligonucleotídica do HCV revelou que a organização genômica era similar a dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*. Conseqüentemente o HCV foi classificado como um novo gênero dentro desta família (CHOO *et al.*, 1991; HAN *et al.*, 1991; HOUGHTON *et al.*, 1991). Segundo estudos realizados por microscopia eletrônica por KAITO *et al.* (1994), o *virion* do HCV é uma partícula esférica de 55 a 65 nm de diâmetro com projeções

semelhantes a espículas e um núcleo de 30 a 35 nm mostrando similaridade com os *virions* dos *Flavivirus*, que apresentam um envoltório de 7 nm de espessura, com projeções finas na superfície, circundando um nucleocapsídeo esférico.

O genoma do HCV é uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples (CHOO *et al.*, 1989), com polaridade positiva, de aproximadamente 9.400 nucleotídeos. O genoma do HCV contém uma única e longa fase de leitura aberta (ORF - Open Reading Frame) que codifica uma poliproteína precursora de 3.010 a 3.033 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada em proteínas estruturais e não estruturais por enzimas virais e do hospedeiro. A região N-terminal codifica as proteínas estruturais do núcleo e duas proteínas do envoltório (E1 e E2), bem como, a proteína p7, codificada pela região E2 e processada a partir de um precursor E2-p7. A região C-terminal codifica as proteínas não estruturais NS2; NS3; NS4A; NS4B; NS5A e NS5B que estão envolvidas no ciclo de replicação viral (VAN DOORN, 1994; BRÉCHOT, 1996). A Figura 1 mostra um esquema simplificado da organização genética do genoma do HCV e as proteínas antigênicas utilizadas em testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HCV.

ESTRUTURA GENÔMICA DO HCV

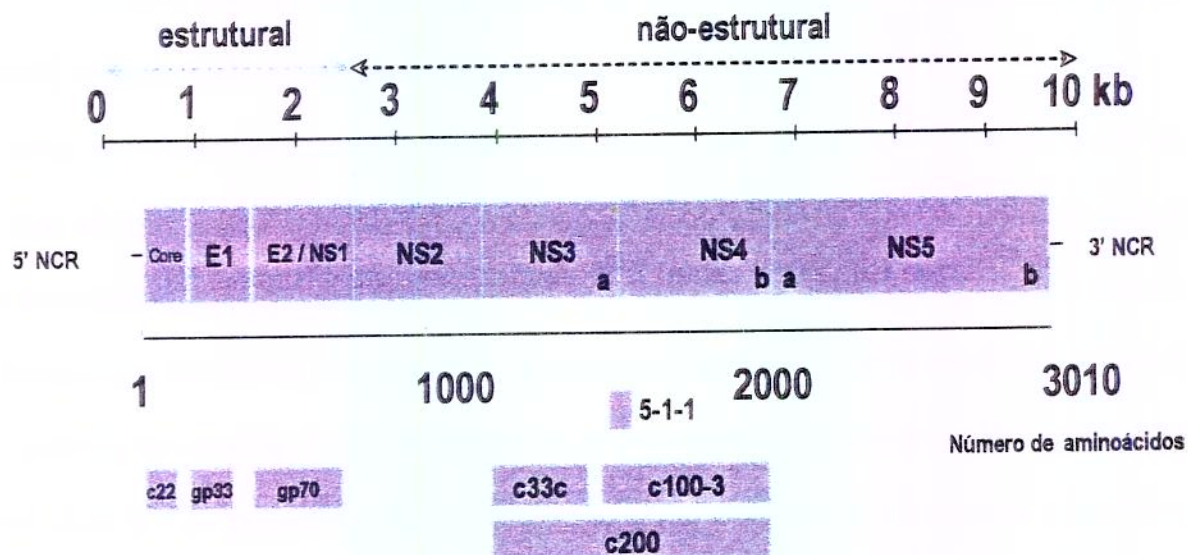


Figura 1- Representação esquemática do genoma do HCV com as regiões não codificadoras (NC), estruturais e não estruturais e as posições das proteínas utilizadas nos imunoenaios.

O genoma do HCV contém regiões não transcritas (UTR *untranslated region*) em ambas as extremidades. A UTR da extremidade 5' (5'-UTR) está envolvida na iniciação da tradução. A estrutura secundária funcional dessa região foi identificada e uma estrutura de *stem loop* foi caracterizada como sítio interno de entrada ribossomal (internal ribosomal entry site - IRES), permitindo tradução "cap"-independente do RNA viral. A UTR da extremidade 3' (3'-UTR) parece ter extensão e seqüência variáveis, estando provavelmente envolvida na terminação da tradução e início da replicação do RNA viral (VAN DOORN, 1994; BRÉCHOT, 1996).

Uma das características dos vírus RNA é a alta freqüência de mutações que ocorrem durante a replicação devido a perda da atividade da correção de leitura (*proof reading*) da polimerase dependente de RNA. Como resultado, os vírus RNA, *in vivo*, formam diversas populações, denominadas de *quasispecies* que contêm uma ou mais seqüências principais e um largo espectro de variantes completamente relacionados (STEINHAEUER & HOLLAND, 1987). As mutações na seqüência nucleotídicas são toleradas se as mesmas não prejudicarem o ciclo de vida do vírus. O vírus da hepatite C, apresenta uma diversidade genética, indicando uma alta freqüência de mutação (OSHIMA *et al.*, 1991, OKADA *et al.*, 1992). A heterogeneidade tem sido identificada em isolados de HCV de indivíduos de diferentes regiões geográficas, em isolados de HCV de diferentes indivíduos na mesma região e em isolados do mesmo indivíduo (CHAN *et al.*, 1992; TAKADA *et al.*, 1993). Alterações genéticas do HCV tem sido estudada por análise seriada de nucleotídeos em humanos e chimpanzés infectados pelo HCV (OKAMOTO *et al.*, 1992a). Esses estudos sugerem uma taxa de mutação de aproximadamente $1,44 \times 10^{-3}$ a $1,92 \times 10^{-3}$ substituições de base por ano.

Atualmente é aceito a existência de 6 principais tipos de HCV (SIMMONDS *et al.*, 1993a), com base em análises filogenéticas da região 5' UTR. Análise filogenética das regiões variáveis que codificam o nucleocapsídeo, o envoltório (E1) e a região não estrutural NS5, indicam que os tipos principais são compostos de no mínimo 30 subtipos (SIMMONDS *et al.*, 1993b; STUYVER *et al.*, 1993).

Algumas classificações para os diferentes isolados do vírus da hepatite C foram propostas (OKAMOTO *et al.*, 1991; CHAN *et al.*, 1992; SIMMONDS *et al.*, 1993a). Contudo, recentemente, a uniformização da nomenclatura desses genótipos que é aceita pela comunidade científica internacional (SIMMONDS *et al.*, 1994), baseia-se nas variações dos nucleotídeos na região NS5 e de outras regiões, tais como do nucleocapsídeo e do envoltório E1.

4.2.3. GENÓTIPOS DO HCV

Foram descritos vários genótipos, no entanto, os aceitos pela comunidade científica são seis, que são designados pelos números arábicos de 1 a 6, sendo os subtipos designados com a combinação das letras minúsculas de *a* até *f*, ou seja, temos 1a; 1b; 2a; 2b e etc. (SIMMONDS *et al.*, 1993a, SIMMONDS *et al.*, 1996; STUYVER *et al.*, 1993). A homologia da região genômica não estrutural do HCV é inferior a 68% entre os diferentes genótipos e, de 77-80% entre os diferentes subtipos de um mesmo genótipo (MAERTENS & STUYVER, 1997).

Vários métodos tem sido usados para genotipar o HCV. A PCR permite fazer a detecção dos genótipos: 1a, 1b, 2a, 2b, e 3a, utilizando 4 pares de *primers* para os subtipos específicos que amplificam um fragmento da região do nucleocapsídeo, previamente amplificado pelo uso de *primers* universais (OKAMOTO *et al.*, 1992b, SMITH *et al.*, 1995).

Outro método que tem sido empregado para a análise dos genótipos do HCV é o estudo de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphisms - RFLP) pós PCR da região 5'-UTR (CHAN *et al.*, 1992) e NS5 (NAKAO *et al.*, 1991), onde após a amplificação da região de interesse, o produto é digerido com as enzimas de restrição, os fragmentos gerados são separados por eletroforese e transferidos para membranas e nitrocelulose ou nylon onde são hibridados com sondas marcadas. Esse método permite a caracterização dos genótipos de 1 a 6, assim como diferenciam os subtipos do HCV.

A genotipagem do HCV pode também ser realizada pela técnica de hibridação reversa (LiPA - Line Probe Assay - Innogenetics, Zwijndrecht, Bélgica) (STUYVER *et al.*, 1993). Os produtos da PCR, gerados após a amplificação com *primers* marcados com biotina, são aplicados sobre fitas de nitrocelulose que possuem sondas imobilizadas. As sondas são sintetizadas com base nas seqüências específicas 5'-UTR que definem seqüências específicas de tipos e subtipos do HCV. A hibridação ocorre em condições de alta estringência e a revelação se faz adicionando o substrato, caso haja reação ocorre a formação de um produto colorido, que se precipita na membrana.

O método de detecção de genótipo do HCV mais eficiente é o seqüenciamento dos produtos de PCR das regiões 5'-UTR, do envoltório e NS5, diretamente ou após a subclonagem. A maioria dos procedimentos, avaliam as seqüências das regiões 3'-UTR e 5'-UTR e seqüências das regiões do núcleo, E1 e NS5.

A distribuição dos tipos e subtipos do HCV difere entre as várias áreas geográficas. Os genótipos tipos 1, 2 e 3 do HCV são distribuídos em todo mundo, predominando na Europa, Japão, Estados Unidos, China e Brasil (BUKH *et al.*, 1995; KLETER *et al.*, 1998; SIMMONDS, 1997; STUYVER *e al.*, 1995, STUYVER *et al.*, 1993 e BASSIT *et al.*, 1994; KRUG *et al.*, 1996). Por outro lado, outros genótipos parecem ser restritos a áreas mais específicas, como o genótipo tipo 4, na África Central e do Norte e Egito; e os genótipos 5 e 6 que são mais freqüentes na África do Sul e sudeste asiático, respectivamente (McOMISH *et al.*, 1994; SIMMONDS 1997).

Com relação aos subtipos, existe uma freqüência relativamente alta dos genótipos 1a e 3a nos países do noroeste europeu, em contraste com as infecções mais freqüentes com o tipo 1b em doadores de sangue na região da Hungria, Alemanha, Rússia e Turquia. Na América do Norte são encontradas maiores freqüências dos genótipos 1a e 1b. No Japão e Taiwan, os genótipos 1b, 2a e 2b são as variantes detectadas. Na África do Sul predomina o tipo 5a, e o genótipo 6a tem sido detectado em Hong Kong e Macau (EBELING, 1998).

No Brasil, observa-se com maior freqüência o genótipos 1b e 3a na população doadora de sangue, sendo também encontrados, os subtipos 1a, 2a, 2b (BASSIT *et al.*, 1994).

Estudos da distribuição e vias de transmissão, têm demonstrado que os genótipos 2 e 1b estão freqüentemente associados com a transmissão sangüínea, e os genótipos 1a e 3a, encontram-se associados com usuários de drogas endovenosas (EBELING, 1998). Esses dados, também foram semelhantes aos estudos prévios realizados na França e Itália, mostrando que usuários de

drogas são predominantemente infectados com os subtipos 1a e 3a (NOUSBAUM *et al.*, 1995).

A variação epidemiológica dos genótipos do HCV ao longo do tempo foi descrita na França, com a diminuição do número de pacientes infectados pelo HCV tipo 1b, que predominava no período anterior à introdução da triagem dos anticorpos anti-HCV nos bancos de sangue (POL *et al.*, 1995), aumentando a ocorrência do genótipo 1a e 3a, originado, principalmente, pelo uso de drogas (NOUSBAUM *et al.*, 1995; PAWLOSTSKY *et al.*, 1995).

Outro aspecto, também relacionado com a variação genética do HCV pode ser estimado pelas diferenças biológicas observadas em pacientes infectados frente a resposta ao tratamento com IFN α (interferon alfa). Em um estudo realizado por BELL *et al.*, 1997, a normalização sustentada da ALT e a eliminação da viremia foram alcançadas somente em 11% dos pacientes infectados pelo tipo 1 do HCV comparado com taxas de respostas de 60 e 33% para os tipos 2 e 3 do HCV, respectivamente. Elevado índice de respondedores, particularmente entre os indivíduos infectados com o tipo 1, tem sido atingidos com a utilização de altas doses de IFN α (6 MU, 3 vezes por semana, durante 12 meses) (CHEMELLO *et al.*, 1995) ou com a combinação com ribavirina (BRACONIER *et al.*, 1995; CHEMELLO *et al.*, 1995).

A proteína NS5 do genoma do HCV têm uma porção amino terminal denominada de NS5A e a porção carboxil terminal denominada de NS5B. A região NS5B codifica a RNA polimerase, que replica o genoma do HCV (VAN DOORN, 1994). Estudos de ENONOTO *et al.* (1995, 1996) têm sugerido que a

resistência do tipo 1b do HCV ao tratamento com IFN α está relacionada com alterações na seqüência de nucleotídeos na região NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈. A relação entre o tipo de seqüência NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ e o nível de RNA-HCV sugere que NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ tem uma importante função na replicação do HCV. Desse modo, mutações na NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ podem suprir a replicação do HCV e aumentar a suscetibilidade ao IFN α . Foi recentemente reportado que os resíduos de 2200 bp a 2250 bp que incluem a região NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈, são essenciais para a fosforilação da região NS5A. Alternativamente a NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ pode ser um alvo direto das proteínas anti-virais induzidas pelo IFN α . Consistente com esta hipótese, existem relatos de que a infecção pelo 1b está associado com a carga viral mais elevada do que os genótipos 2 ou 3 (SIMMONDS, 1997). Contudo, estudos usando ensaios de DNA ramificado (*branched-DNA* [bDNA]-Chiron Corporation) que são igualmente sensíveis para diferentes genótipos do RNA-HCV, têm mostrado que a carga viral dos genótipos 1 a 6 são similares (SMITH *et al.*, 1995; HAWKINS *et al.*, 1997). Esses achados mais recentes mostram que carga viral e o genótipo do HCV são fatores predisponentes, embora independentes para a resposta ao IFN α .

4.2.4. EPIDEMIOLOGIA

Revisão de dados epidemiológicos da hepatite C descrita por ALTER, M.J. (1995), mostrou que através da reavaliação de estudos prospectivos de indivíduos transfundidos, os quais contraíram hepatite não-A e não-B, 60 a 90% desses pacientes desenvolveram anticorpos anti-HCV. E ainda, segundo o

autor, uma taxa de incidência de hepatite C pós-transfusional variando de 5 a 13% foi observada em 1986, sendo detectado um declínio de 1,5% a 9% no período de 1986 a 1990. Subsequente a realização da triagem de anti-HCV no soro de doadores a partir de 1990, observou-se uma redução na taxa de hepatite pós-transfusional ao nível de 1%.

HEINTGES & WANDS, 1997 e TIBBS, 1997, em suas revisões demonstraram que o HCV tem distribuição cosmopolita. A taxa de prevalência varia entre 0,3% e 14,5% entre doadores de sangue, em diferentes regiões geográficas, quando os anticorpos anti-HCV são avaliados por imunoenaios de segunda e terceira geração. Observa-se uma prevalência relativamente baixa (0-1%) de anticorpos anti-HCV em doadores norte americanos e do norte da Europa, incluindo-se Alemanha, França e Reino Unido. Altas taxas de prevalência tem sido encontradas no Sudoeste Asiático, tais como Tailândia, Malásia e Índia. Prevalência entre 1,4% e 2,1% tem sido observadas no Norte da África e países Árabes, tais como, Líbia, Árabia-Saudita e Etiópia. Prevalência acima de 14,5% tem sido observada nos países da Ucrânia e países da África Central e Camarões, bem como Egito. No Brasil, a portaria 1.376 da Coordenadoria de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde (COSAH/MS) tornou obrigatória a realização do teste sorológico para anti-HCV na triagem de doadores de sangue, a partir de novembro de 1993. Dados dessa Coordenadoria, em 1995, mostraram que os percentuais de descarte de bolsas de sangue com reatividade para anti-HCV nas cinco macro regiões do Brasil foram: 2,1% no norte; 1,3% no nordeste e centro oeste; 1,2% no sudeste e 1,1% no sul (SÁEZ-ALQUÉZAR, 1996).

A infecção por HCV em alguns países tem sido associada a valores culturais como práticas de sacrifícios tradicionais e circuncisão cuja reutilização de instrumentos contaminados pode ser mais uma via de infecção. É importante ressaltar que a transmissão por esta via é muito difícil de comprovar (TIBBS, 1997).

Em Taiwan, foi demonstrada a associação entre a hepatite C e aplicação de tatuagem (KO *et al.*, 1992). No Japão há evidência de que a hepatite C é mais comum em vilas onde a prática tradicional de ventosas "cupping" é realizada (HONDA *et al.*, 1993). Nesta prática um recipiente de vidro é colocado sob a pele da pessoa doente, produzindo uma bolha de sangue que deve sangrar liberando o sangue para dentro do recipiente, o qual se reutilizado por outro indivíduo, pode ter como consequência a transmissão do HCV (HONDA *et al.*, 1993).

Estudos no Egito tem demonstrado que há implicação da prática médica na transmissão do vírus da hepatite C. Esse fato estaria relacionado com a observação de que a maioria das pessoas com mais de 40 anos residentes na área do Nilo e participantes da campanha de vacinação anti-esquistossomose na década de 50, eram portadoras do HCV. Isto possivelmente foi decorrente da reutilização de agulhas, inadequadamente esterilizada, o que teria propiciado uma contaminação em massa dos participantes da campanha (KO *et al.*, 1992).

A prevalência da infecção por HCV varia em diferentes países e está associada à detecção de anticorpos anti-HCV na população doadora de sangue que excluem indivíduos infectados por outros agentes que possuem a mesma via de transmissão. Segundo DHILLON & DUSHEIKO (1995), os

procedimentos de seleção dos doadores de sangue, influenciam os dados epidemiológicos em relação a ocorrência da hepatite C.

Segundo TIBBS, 1997, a composição demográfica da população doadora de sangue varia de um país para outro. Deste modo, no norte da Europa e na América do norte a maioria dos doadores de sangue são voluntários de origem caucasiana e predominantemente de classe média. Em contraste, em muitos países tropicais os doadores de sangue podem ser pagos e geralmente são provenientes de setores da sociedade com nível sócio-econômico mais baixo. Considerando que a infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem-se tornado um fator dominante na seleção de doadores, qualquer indivíduo que apresente algum fator de risco possível para a infecção por HIV é automaticamente excluído para a doação de sangue. Este fato promove um efeito seletivo do uso de doadores de sangue em estimar a prevalência da hepatite C na população. Outros autores também concordam que a prevalência do HCV em doadores de sangue não necessariamente refletem a prevalência do vírus em uma população geral (DHILLON & DUSHEIKO, 1995; EBELING, 1998).

4.2.5. VIA DE TRANSMISSÃO

O HCV é basicamente transmitido por via parenteral. O modo de transmissão mais comum envolve transfusões sangüíneas e/ou contato parenteral com hemoderivados (HEINTGES & WANDS, 1997). Antes que fosse possível iniciar a triagem de anticorpos anti-HCV nos hemoderivados, aproximadamente 10% a 20% dos indivíduos, que receberam transfusões múltiplas ou derivados do

plasma, tornaram-se anti-HCV positivos. Desse modo, o risco relativo de adquirir hepatite C foi de 0,45% por unidade transfundida (GUTENSOHN *et al.*, 1992; DONAHUE *et al.*, 1992). Contudo, o uso da detecção de anticorpos anti-HCV usando os procedimentos de triagem correntes para hemoderivados, têm reduzido a taxa de transmissão do HCV. O risco de adquirir HCV pela transfusão sangüínea é de 1/100.000 de unidades transfundidas (SCHREIBER *et al.*, 1996).

As intervenções odontológicas e cirúrgicas, especialmente as cirurgias obstétricas e ginecológicas, foram fortemente associadas com a positividade para o anti-HCV em estudo realizado na Itália. (MELE *et al.*, 1994). A associação de cirurgias odontológicas com o aumento de risco de transmissão do HCV, têm sido relacionada com a contaminação pelo sangue, como foi demonstrado pelos achados de RNA-HCV em diferentes instrumentos cirúrgicos odontológicos (ABE & INCHAUSPE, 1991).

Os fatores de risco para infecção por HCV incluem também o uso de drogas intravenosas, transfusão de hemoderivados, hemodiálise, aplicação de tatuagem, comportamento sexual de alto risco, exposição ocupacional e o transplante de órgãos provenientes de doadores RNA-HCV positivos (ALTER, M.J. 1990; EBELING, 1998; TIBBS, 1997).

Em determinadas populações o uso de drogas injetáveis têm-se apresentado como fator de risco superior a 50%, chegando a 100% para a infecção com HCV (FINGERHOOD *et al.*, 1993; WOODFIELD *et al.*, 1993). A prevalência de anticorpos anti-HCV em usuários de drogas que empregam vias de administração oral e/ou nasal, ao invés da via intravenosa, é substancialmente menor (5%) porém é mais elevada do que em doadores de sangue (WOODFIELD

et al., 1993). Desse modo, provavelmente a transmissão não parenteral do HCV em usuários de droga parece possível.

A infecção por HCV em hemofílicos é comum. As taxas de prevalência de anti-HCV positivo excedem a 90% em pacientes hemofílicos, que são freqüentemente transfundidos com concentrados de fatores da coagulação não tratados (ALTER M.J., 1995). Pacientes hemofílicos que recebem tais preparados pelos procedimentos atuais de inativação de vírus, são raramente positivos para anticorpos anti-HCV (MAUSER-BUNSCHOTEN *et al.*, 1995). Todavia, a média de positividade de anticorpos anti-HCV é ainda de aproximadamente 76% entre os hemofílicos (WAGNER & ROTTHAUWE, 1994; MAUSER-BUNSCHOTEN *et al.*, 1995).

A infecção por HCV é freqüente entre os pacientes sob hemodiálise, sendo de 20%, em média, a prevalência de anticorpos anti-HCV varia porém, entre as diferentes regiões geográficas (ALTER, M.J., 1995, HEINTGES & WANDS, 1997). Índices menores de prevalência têm sido relatados no Reino Unido (1% a 2%), África do Sul (5%) e Escandinávia (5%-15%) e índices maiores de prevalência têm sido relatados no leste Europeu (20% a 91%). Os fatores que estão associados com as altas taxas de infecção por HCV nesses pacientes não foram precisamente definidos. O uso compartilhado de equipamento de diálise parece não ser o principal meio de transmissão, uma vez que centros que utilizam equipamentos individuais também apresentam pacientes anti-HCV positivo (HEINTGES & WANDS, 1997). Contudo, a transfusão sangüínea dos hemodializados é freqüente, e a transmissão indevida do HCV de paciente a paciente por outros procedimentos médicos também é possível. Por exemplo,

existem relatos em que os investigadores observaram diminuição da incidência da infecção por HCV quando se instituiu a troca de luvas durante a manipulação de soluções de diálise entre os pacientes (OKUDA *et al.*, 1995).

A transmissão do HCV por outros fluidos biológicos, tais como, saliva, lágrima, urina, sêmen e secreção vaginal ocorre com menor freqüência, provavelmente devido ao baixo título (10^2 - 10^7 cópias /mL) do vírus C, na maioria dos portadores de HCV (REICHARD, 1994).

A transmissão sexual da infecção por HCV é menos freqüente. Estudos nos Estados Unidos e Europa tem revelado baixas taxas de infecção (0% a 6,3%) entre parceiros heterossexuais de indivíduos com hepatite C crônica (MEISEL *et al.*, 1995; GORDON *et al.*, 1992; SOTO *et al.*, 1994).

Os fatores que podem levar a um aumento do risco de contaminação por HCV através de contato sexual incluem: múltiplos parceiros, doença sexualmente transmissível, comportamento homossexual, casal com convivência prolongada e com viremia elevada (GSHI & LAU, 1997).

A transmissão do HCV de mãe para filho teve seu primeiro caso relatado após a identificação da homologia na seqüência do HCV entre a avó, a mãe e a criança (INOUE *et al.*, 1991). Isto também indica que a infecção pode persistir por décadas sem causar nenhum sintoma (INOUE *et al.*, 1992). Recentemente, foi mostrado que a transmissão do HCV de mães infectadas para crianças, estava relacionada a viremia das mães (OTHO *et al.*, 1994). Nesse estudo, as mães que apresentaram anticorpos anti-HCV e que eram RNA-HCV negativas não transmitiram HCV para seus bebês. Mães RNA-HCV positivas, cujas crianças tornaram-se infectadas, mostraram uma tendência de desenvolver

títulos 100 vezes maior de viremia do que mães RNA-HCV positivas cujas crianças não adquiriram o HCV.

Cabe salientar que a exposição a uma quantidade relativamente pequena de sangue ou de outros fluidos biológicos pode tornar-se um fator de risco significativo para a infecção por HCV nos casos em que os níveis de vírus circulantes sejam elevados (ALTER, M.J., 1994).

4.2.6. TRATAMENTO

Nos últimos 40 anos, ensaios clínicos aleatórios, duplo cego e controlados tem sido amplamente aceitos como padrões eficazes em avaliar a eficácia terapêutica. Tais ensaios, algumas vezes, tem limitado a generalização quando a freqüência dos eventos é baixa ou quando os eventos ocorrem em um período de tempo prolongado. Esses ensaios requerem um número substancial de pacientes ou longo tempo de seguimento, resultando em alto custo. Em casos onde o prognóstico é ruim como no caso da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) há unanimidade no reconhecimento de que a manutenção de um grupo placebo controlado ou o acesso limitado a um medicamento, até que as avaliações sejam concluídas, é anti-ético (BENNETT *et al.*, 1996).

Apesar de dificultar o desempenho dos ensaios clínicos e aumentar a controvérsia entre a comunidade de pesquisa clínica, a *Food and Drug Administration (FDA)* tem permitido rapidamente a aprovação de medicamentos que são usados nesses ensaios com base nos marcadores de prognóstico intermediário, em vez de esperar por critérios clínicos de longo prazo como a

sobrevivência (BENNETT *et al.*, 1996). No caso da hepatite C, o primeiro estudo multicêntrico randômico controlado para avaliar o tratamento dos pacientes com hepatite C crônica, foi realizado por DAVIS *et al.* em, 1989. Nesse estudo, foram avaliados 166 pacientes, dos quais 51 não receberam tratamento. Os demais receberam tratamento com interferon alfa 2b recombinante (IFN α 2b) (Intron A, Schering-Pecugh, Kenilwork N.J.), administrado por via subcutânea, 3 vezes por semana, durante 24 semanas. O esquema de tratamento envolveu dois grupos, um que recebeu 3 milhões de unidades (MU) de IFN α 2b por dose e outro que recebeu 1 MU por dose. Os resultados do estudo mostraram redução na atividade sérica da enzima ALT e melhora dos parâmetros histológicos no grupo de pacientes que receberam tratamento quando comparados com os do grupo controle. Dentre os grupos tratados, os melhores resultados foram obtidos com os pacientes submetidos ao tratamento com 3 MU de IFN α 2b. Resultados similares também foram encontrados por DI BISCEGLIE *et al.*, 1989, ao realizar um estudo randômico com pacientes tratados e não tratados. Nesse estudo, o grupo que recebeu a dose de 2 MU de IFN α 2b mostrou melhores resultados terapêuticos do que o grupo que recebeu 1 MU e o grupo controle (não tratado).

Em 1993, a FDA, nos Estados Unidos, com base nos resultados obtidos nos estudos de eficácia do uso do interferon alfa (IFN α) no tratamento da hepatite C aprovou o IFN α 2b (Intron A, Schering-Plough; IFN) para o tratamento da hepatite C crônica (DAVIS *et al.*, 1989; DOUGLAS *et al.*, 1993). O esquema terapêutico padrão é de 3 MU IFN α 2b, três vezes por semana, administrado por

via subcutânea, durante 12 meses, medida essa também aprovada pela *FDA*, nos Estados Unidos em 1996 (LINDSAY, 1997).

A resposta ao tratamento geralmente é avaliada pela normalização da atividade sérica da ALT e viremia indetectável do HCV por transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), no término do tratamento (resposta completa) e no sexto mês após o término do tratamento (resposta sustentada) (CRAXI *et al.*, 1996).

Cerca de 50% dos pacientes apresentam normalização das enzimas hepáticas durante o tratamento, o RNA viral torna-se indetectável e a atividade inflamatória diminui no fígado (HOOFNAGLE *et al.*, 1986; MARCELIN *et al.*, 1991). Contudo, somente 10% a 25% dos pacientes tem resposta sustentada (TINÉ *et al.*, 1991; HOOFNAGLE *et al.*, 1993).

Vários aspectos clínicos e laboratoriais podem ser avaliados antes de iniciar a terapia e podem predizer uma menor resposta ao tratamento com o IFN α . Entre eles, evidência histológica de cirrose; período longo de duração da infecção e/ou idade avançada; alto valor de viremia do HCV e infectividade com HCV tipo 1b, são amplamente reconhecidos como indicadores de falha na resposta terapêutica ao IFN α . Outros fatores como o número de mutações na região NS5A e a variabilidade viral, também são propostos como indicadores de mau prognóstico (CRAXI *et al.*, 1996; GERVAIN & GÓGL, 1998).

Pelo fato da resposta sustentada ocorrer em uma taxa menor que 25%, tratamentos alternativos tem sido investigados. Dados preliminares indicam resultados promissores para tratamento combinado de IFN α com Ribavirina

(análogo de guanosina) (BRILLANTI *et al.*, 1994). Cerca de 50% dos pacientes poderão alcançar uma resposta sustentada com este tratamento combinado, quando tratados por 6 meses ou mais (DI BISCEGLIE *et al.*, 1992; KAKUMU *et al.*, 1993).

A monoterapia com Ribavirina parece ser incapaz de eliminar o vírus HCV (REICHARD *et al.*, 1991; BODENHEIMER *et al.*, 1997) e o aspecto histológicas do fígado não demonstra regressão da infecção. A monoterapia com Ribavirina poderá ser de interesse somente em pacientes com contra indicação para a terapia com IFN α . GANE *et al.* (1996) reportaram sua experiência com Ribavirina em 7 pacientes após transplante de fígado, mostrando redução nos valores das transaminases séricas e melhora do aspecto histológico do fígado, embora a eliminação do vírus não tenha sido observada.

4.2.7. DIAGNÓSTICO

4.2.7.1. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O diagnóstico sorológico da hepatite C é basicamente realizado pela detecção de anticorpos anti-HCV, uma vez que a detecção do antígeno não é possível devido a baixa antigenemia do HCV.

A clonagem e a caracterização completa do genoma do HCV (CHOO *et al.*, 1989; CHOO *et al.*, 1991) possibilitou a produção de grandes quantidades de proteínas virais recombinantes em microorganismos. Quando purificados, os polipeptídeos recombinantes foram usados para produzir ensaios

de captura sensíveis para anticorpos específicos, indicando a exposição dos indivíduos ao HCV.

O primeiro antígeno viral recombinante a ser utilizado foi o c100-3, que corresponde a fusão do clone 5-1-1, primeiro clone isolado por CHOO *et al.* em 1989, com clones *overlapping*, correspondendo a região genômica NS3 e NS4 (Fig.1). O antígeno c100-3 foi associado com o gene da superóxido dismutase humana (SOD) e expresso em levedura como uma grande proteína de fusão recombinante. O antígeno c100-3 foi usado pela Ortho Diagnostic Systems (Raritan,NJ) e Chiron Corporation (Emeryville,CA) para desenvolver um ensaio imunoenzimático (Enzyme immunoassay-EIA) em microplaca, que foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), em maio 1990. O teste foi instituído como rotina na triagem de doadores nos bancos de sangue dos Estados Unidos. Em julho de 1990, a Abbott Laboratories (Chicago, IL) desenvolveu um EIA utilizando o mesmo antígeno em micro pérolas, que também foi aprovado pela FDA (WILBER & POLITO, 1995).

Os ensaios imunoenzimáticos de primeira geração, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), apresentaram eficiência de 80% a 90% , na detecção do anti- HCV em pacientes com hepatite crônica portadores de HCV (ALTER, H.J. *et al.*, 1989; ALBERTI, 1991). Por outro lado, o teste anti-HCV (anti-c100-3) mostrou-se um marcador pouco eficiente para o diagnóstico de hepatite C aguda, devido a janela imunológica ter um período de 10 a 15 semanas podendo ser de 6 a 12 meses em alguns casos (RUBIN,1994; WILBER & POLITO, 1995).

Os testes anti-HCV (anti-c100-3) mostraram também baixa sensibilidade, principalmente na triagem de indivíduos de baixo-risco, como por

exemplo doadores de sangue, produzindo um grande número de reações falso-negativas. Segundo FEINAMAN *et al.* (1991) doadores anti-HCV positivo sempre transmitem a hepatite C, porém, foram detectados alguns receptores que desenvolveram hepatite, após serem transfundidos com doadores anti-HCV negativo. Achados similares foram reportados por ESTEBAN *et al.*, 1990, que concluíram que a triagem de doadores de sangue para anti-HCV (anti c100-3) pode somente prevenir metade dos casos de hepatite C pós-transfusional.

Outras limitações da utilização dos ELISA de primeira geração para anti-HCV é a reatividade falso-positiva devido à presença de anticorpos anti-SOD que podem ocorrer em pacientes com doença hepática ou com hepatite crônica autoimune ativa, assim como os positivos para fator reumatóide, hiperglobulinemia, e paraproteinemia (ALBERTI, 1991).

Para auxiliar na identificação de anticorpos anti-HCV foram desenvolvidos ensaios complementares, baseados na metodologia de *Immunoblot*. Os antígenos são imobilizados individualmente em tiras de nitrocelulose, reconhecendo a especificidade dos anticorpos para cada fração antigênica do HCV. O primeiro teste complementar foi o imunoensaio em fita (*Strip Immunoassay-SIA*), desenvolvido pela Chiron Corporation, Emeryville, CA, e denominado RIBA (*recombinant immunoblot assay*). A primeira versão disponível apresentava o antígeno original 5-1-1 produzido em *E. coli*, o antígeno c100-3 produzido em levedura, uma fragmento SOD e bandas controles de IgG, fixados em uma membrana de nitrocelulose. A amostra era considerada reativa quando reagia com ambas as bandas do HCV com intensidade igual ou maior do que com a banda controle de IgG e não com a banda da SOD, que representa a proteína

carreadora (WILBER & POLITO, 1995). Resultados similares de sensibilidade foram observados entre os métodos de ELISA e RIBA. Contudo, alguns soros anti-HCV ELISA positivos mostraram um padrão de RIBA inconclusivo. Todavia, o RIBA anti-HCV é mais específico do que o ELISA para estabelecer a infecção pelo HCV (EBELING *et al.*, 1990).

Novos testes foram desenvolvidos adicionando outros antígenos, os quais passaram a apresentar maior sensibilidade do que os testes de primeira geração. Os ELISAs utilizando antígenos múltiplos (ELISA de segunda geração) foram aprovados pela FDA em 1992 (ALTER, H., 1992). Os novos antígenos incorporados foram c22-3 (região do core), c33c (região não estrutural NS3). O c33c foi combinado com o c100-3 para formar uma única proteína de expressão codificada pelas regiões NS3 e NS4, denominada c-200.

A adição dos antígenos c22-c e c33c resultou na detecção mais precoce de anticorpos anti-HCV e a identificação de um maior número de pacientes com HCV do que os ensaios de primeira geração, reduzindo o período da janela imunológica para 6 semanas (VAN DER POEL, 1991; CHEMELLO, 1993).

ALBERTI, 1991, estudando a especificidade dos testes em amostras de soro de 27 pacientes com hepatite grave, avaliados semanalmente durante a fase aguda, demonstrou que os anticorpos anti-c-33c e anti-c22 precedem ao aparecimento do anti-c100-3. Como resultado dessas avaliações foi possível diagnosticar a hepatite C no primeiro mês da doença em cerca de 50% dos casos.

O RIBA HCV (versão 2.0) foi aprovado pela FDA em junho de 1993, desenvolvido com os mesmos antígenos, presentes no ELISA de segunda geração, ou seja, 5-1-1, a partir de *E coli*; c100-3, e os antígenos c22-3 a partir de levedura, c33-c a partir de *E. coli*; SOD e os fragmentos de IgG controle (WILBER & POLITO, 1995). A interpretação dos resultados faz-se através do seguinte procedimento: positivo (reação com dois ou mais antígenos), inconclusivo (reação com um antígeno) ou negativo, ausência de reatividade. (YOUNOSSI & McHUTCHISON, 1992). A interpretação da sorologia do HCV depende da condição de risco do paciente. Na triagem de banco de sangue (população de baixa prevalência), aproximadamente 40% a 50% das amostras com resultados positivos para a presença do HCV pelo ELISA são negativos para o RIBA-2, indicando um valor preditivo para o EIA-2 de 50% a 60%. Considerando essa população ainda, poucas amostras com resultados RIBA-2 inconclusivo são RNA-HCV positivo (EVANS *et al.*, 1992; ALTER H, *et al.*, 1991). Em contraste, na população de alto risco, aproximadamente 93% das amostras positivas para EIA-2 são também positivas para o RIBA-2 e menos do que 1% das amostras positivas para HCV pelo método EIA-2 são negativas para o RIBA-2 (EVANS *et al.*, 1992; ALTER, H. *et al.*, 1991). Tais resultados indicam que os testes anti-HCV complementar não são necessários na triagem de populações de alto risco.

Uma terceira versão do teste de triagem anti-HCV (ELISA 3.0) foi introduzido na Europa em 1993 (WILBER & POLITO, 1995; GRETCH, 1997) e aprovado pela FDA em 1996 (<http://www.FDA.gov/cber>). Esse teste contém antígenos sintéticos do nucleocapsídeo reconfigurado, o antígeno da região NS3, o c-200 e a adição do antígeno da região NS5 não presente no teste de ELISA

2.0. O tempo de soro-conversão em receptores de transfusão sangüínea foi mais curto de 2 a 3 semanas em relação aos testes de ELISA anteriores (BARRERA *et al.*, 1995; UYTENDAELE *et al.*, 1994). A sensibilidade para a detecção anti-HCV em grupos de alta prevalência foi melhorado para 97% (KAO *et al.*, 1996).

Segundo GRETCH, 1997, embora tenha havido um aumento na sensibilidade do ensaio de ELISA versão 3.0, isso não foi o suficiente para sua classificação como um teste de terceira geração pela FDA, assim como também a especificidade do EIA no diagnóstico de alta prevalência não tenha sido estabelecido. Adicionado as essas observações, também não se tem verificado uma utilidade clínica para a reatividade da NS5 isolada, na capacidade de determinar a viremia do HCV (DAMEN *et al.*, 1995; GRETCH, 1997).

Uma terceira geração de teste complementar (RIBA 3) foi introduzido na Europa em 1993 (WILBER & POLITO, 1995 e GRETCH, 1997; DAMEN *et al.*, 1995) e aprovado no FDA em 1999 (<http://www.FDA.gov/cber>). Nesse teste de terceira geração, dois antígenos recombinantes (c33c e NS5) e peptídeos sintetizados a partir do nucleocapsídeo (c22) e regiões NS4 (c100-3) foram usados. Os peptídeos sintéticos foram escolhidos para evitar a reatividade cruzada (não específica) e para promover aumento da sensibilidade. O novo teste é capaz de identificar corretamente RNA-HCV positivo e RNA-HCV negativo em indivíduos, que apresentaram resultados de RIBA 2 inconclusivo (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1993; ZAAIJER, 1994). Estudos realizados por esses pesquisadores mostraram que o teste de RIBA 3 resolveu 33 dos 39 (85%) pacientes RIBA 2 inconclusivos com suspeita da doença. Vinte e cinco dos 32

(78%) dos c22 e c33 inconclusivos foram positivos para o RIBA 3, bem como para o RNA-HCV.

Atualmente os testes sorológicos para anti-HCV apresentam sensibilidade de 97% e especificidade de 95% e de 100% para população de baixo risco e de alto risco, respectivamente (GRETCH, 1997). Porém, os resultados falso-negativos, principalmente na população de baixo risco, que são ainda observados nos ensaios atuais tem sido atribuídos a existência de diferentes tipos de vírus da hepatite C, isto se deve principalmente porque os testes são produzidos a partir de seqüências de genótipos predominantes de HCV do tipo 1a, não detectando anticorpos de pacientes infectados com genótipos menos comuns (SALMERON *et al.* 1996; SIMMONDS, 1997). Resultados falso-negativos podem também ser observados em pacientes imunocomprometidos que perdem marcadores sorológicos de infecção para qualquer agente etiológico. Outro aspecto, é o fato de que os imunoenaios podem determinar a exposição ao HCV, porém são incapazes de diferenciar entre uma infecção presente ou passada (GARSON & TEDDER, 1993). A perda da capacidade de determinar a infecção por meio dos imunoenaios é observada também em amostras que apresentam baixos níveis de indicadores sorológicos no início da infecção passando despercebidas ou evidenciando reações fracas com resultados inconclusivos. (GARSON & TEDDER, 1993).

4.2.7.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Na ausência de um sistema de cultura celular *in vitro* para o isolamento do HCV, os métodos de detecção do genoma viral tornaram-se um importante instrumento de diagnóstico da hepatite C, assim como no acompanhamento terapêutico com IFN α . Os testes de RNA-HCV tem sido particularmente úteis em pacientes soro-negativos com hepatite C crônica, especialmente nos indivíduos imunocomprometidos, que perdem a capacidade de resposta imune, apresentando resultados sorológicos inconclusivos para infecção por HCV, apesar das evidências clínicas e moleculares da hepatite C. A pesquisa de RNA-HCV é particularmente útil nos pacientes anti-HCV positivo que apresentam valores séricos normais da enzima ALT. Esses pacientes, tanto podem ter eliminado o vírus (RNA-HCV negativo) quanto podem manter a viremia (RNA-HCV positivo), apesar dos valores normais das enzimas hepáticas. O teste RNA-HCV permite também avaliar a transmissão do vírus entre mães e filhos, onde a transmissão perinatal do HCV é verificada pela presença do RNA-HCV no sangue do recém-nascido. Outra aplicação é a quantificação da viremia antes do início da terapia e no monitoramento da resposta terapêutica anti-viral. Os testes de RNA-HCV são portanto, os mais adequados para determinar o diagnóstico diferencial entre presença e ausência de infecção (GRETCH, 1997; MEDINA & SCHIFF, 1995).

Os testes de amplificação do genoma viral por reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram os primeiros a serem introduzidos para o diagnóstico do RNA-HCV. Neste método há necessidade de produzir um DNA complementar

(cDNA) por transcrição reversa (RT), antes da amplificação por PCR, denominado de RT-PCR (WEINER *et al.*, 1990; GARSON *et al.*, 1990a).

O uso da RT-PCR possibilitou a redução do tempo de diagnóstico da infecção pelo HCV, devido a alta sensibilidade da técnica. FARCI *et al.* (1991), demonstraram a presença do RNA-HCV no soro de indivíduos, uma a duas semanas após a transfusão sanguínea, antes da manifestação clínica da infecção pós-transfusional pelo HCV.

A primeira investigação da detecção do RNA-HCV usando RT-PCR foi descrita por WEINER *et al.* (1990), usando *primers* específicos para a região NS3 do genoma viral. Os autores avaliaram amostras de soro, plasma e de biópsia de fígado provenientes de pacientes e chimpanzés infectados. A detecção do RNA-HCV foi realizada pela hibridação dos produtos de PCR com um fragmento de cDNA do HCV marcado radioisotopicamente com ³²P.

Na detecção do RNA-HCV a escolha dos *primers* adequados para fins diagnósticos é de fundamental importância, esses devem reconhecer seqüências genômicas bem conservadas para as diferentes variantes do genoma do HCV, de modo a garantir boa sensibilidade (GARSON *et al.*, 1990; OKAMOTO *et al.*, 1990; BUKH *et al.* 1992; SCHLAUDER *et al.*, 1992). O estudo mais abrangente foi realizado por OKAMOTO *et al.* (1990) que avaliaram 10 grupos de *primers*. Os resultados indicaram que os *primers* derivados da região 5'-UTR e da região do "core", foram equivalentes na sua capacidade de detectar o RNA-HCV em 10 soros anti-HCV positivos provenientes de indivíduos japoneses. Resultados de maior eficiência no uso dos *primers* da região 5'-UTR para RT-PCR, também foram obtidos por SCHLAUDER *et al.*, 1992. Os autores avaliaram *primers* da

região NS3 e 5'UTR em 14 amostras, sendo que 3 dessas foram positivas quando analisadas com 5'UTR e negativas para os *primers* NS3. Outros estudos também têm demonstrado maior sensibilidade na detecção do RNA-HCV utilizando *primers* da região 5'-UTR comparada com aqueles específicos para outras regiões (CRISTIANO *et al.*, 1991; FARCI *et al.*, 1991; KANEKO *et al.*, 1990). Esses resultados demonstram que *primers* provenientes da região 5'-UTR do genoma do HCV são os mais efetivos na detecção do RNA viral usando a técnica do RT-PCR. A possibilidade em detectar diferentes tipos de HCV, por RT-PCR da região 5'-UTR, se deve ao fato que os primeiros 330 nucleotídeos desta região apresentam 98% de homologia entre os diferentes isolados (OKAMOTO *et al.*, 1990). Usualmente os produtos de PCR são revelados por hibridação com sondas marcadas radioativamente ou enzimaticamente. No caso das sondas marcadas radioativamente, após a transferência do DNA a uma fase sólida, como membranas de nylon ou nitrocelulose, estas são hibridadas com sonda específica marcada radioativamente e submetidas à autoradiografia. No caso de sondas marcadas enzimaticamente, as membranas contendo o ácido nucléico são hibridadas com a mesma e visualizadas tanto pela emissão de luz quanto pela produção de cor (TANG *et al.*, 1997).

Outros pesquisadores (GARSON *et al.*, 1990b; SHINDO *et al.*, 1990) têm utilizado, além da amplificação convencional, uma amplificação adicional com a utilização de *primers* internos específicos que reconhecem seqüências de nucleotídeos do produto previamente amplificado na PCR, denominada *nested-PCR*. Essa técnica tem a vantagem de aumentar a sensibilidade da PCR, devido ao duplo processo de amplificação. A amplificação

pelo segundo grupo de *primers*, conseqüentemente, verifica a especificidade do produto da primeira reação (TANG *et al.*, 1997). A aplicação da técnica da RT-nested-PCR no diagnóstico do RNA-HCV foi introduzido por GARSON em 1990a.

A detecção do RNA-HCV por RT-PCR também pode ser realizada por meio de produto comercial disponível no mercado, introduzido pela Roche Molecular Diagnostics (AMPLICOR™ HCV), em 1993. Esse ensaio baseia-se na reação de RT-PCR, utilizando a enzima *rTth* DNA polimerase, proveniente do *Thermus thermophilus*, que possui eficiente atividade na transcrição reversa do DNA pela polimerase. Para prevenir a contaminação por carreamento foi incorporado ao método, a enzima uracil-N-glicosilase (UNG). A detecção do produto amplificado biotinilado é feita por imunensaio enzimático, realizado em cavidade cobertos com sonda de captura. O teste de primeira geração AMPLICOR™ HCV foi desenvolvido para amplificação manual no termociclador 9600 da Perkin-Elmer (Norwalk, Conn.). O sistema de segunda geração, denominado sistema HCV COBAS AMPLICOR, foi desenvolvido também pela Roche Molecular Systems para automação do processo de amplificação (DI DOMENICO *et al.*, 1996).

Outra tecnologia de amplificação disponível no mercado para a detecção do RNA-HCV é a NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) desenvolvida pela Organon Teknika (Boxtel, Netherlands). É um método de amplificação de ácido nucléico em condições isotérmicas que envolve a atividade seqüencial das enzimas transcriptase reversa, T7 RNA polimerase e RNase H. A amplificação inicia-se com a hibridação de um *primer* (que contém a seqüência promotora da T7 RNA polimerase) à seqüência alvo e extensão da cadeia

nucleotídica por ação da transcriptase reversa, gerando cópias de cDNA. A molécula de RNA do híbrido RNA-DNA gerado é degradada pela RNase H. Segue-se a hibridação do *primer antisense* e uma nova fita de DNA é sintetizada a partir do sítio de hibridação desse *primer*. Cada fita de cDNA produzida serve de molde para a síntese de várias cópias de RNA por ação da T7 RNA polimerase. As cópias de RNA geradas servirão de molde para produção de mais cópias de cDNA que se acumulam e podem ser quantificadas. Esta fase cíclica da NASBA é conduzida em condições isotérmicas a 41°C (HODINKA, 1998).

Outro método disponível comercialmente é denominado DNA ramificado (*branched DNA* - bDNA) desenvolvido pela Chiron Corporation (Emeryville, CA). O bDNA é um ensaio de hibridação tipo "sanduíche" que compreende as etapas de: lise dos virions, captura e hibridação do RNA-HCV e amplificação do sinal. Fundamenta-se na amplificação do sinal emitido por sondas ramificadas (bDNA), hibridadas a sondas oligonucleotídicas (captura) fixada em um suporte sólido. Posteriormente, sondas sintéticas conjugadas com fosfatase alcalina (ALP) são hibridadas com as moléculas de bDNA. A ALP presente no complexo atua sobre um substrato quimioluminescente (dioxetano) e o produto formado emite luz que é proporcional a quantidade de moléculas hibridadas, sendo medida em um luminômetro (HODINKA, 1998).

Os métodos moleculares também tem sido empregados na quantificação do valor de RNA-HCV circulante, denominado carga viral, em pacientes submetidos ao tratamento com $INF\alpha$, representando um instrumento potencial para avaliar e monitorar a infecção por HCV (GRETCH, 1997). A quantificação do RNA-HCV pode ser realizada por ensaios de diluição do RNA-

viral ou pela co-amplificação do RNA alvo recombinante sintético, usado para construir uma curva de calibração determinando a concentração do ácido nucléico na amostra (HODINKA, 1998; MEDINA & SCHIFF, 1995).

A sensibilidade dos ensaios moleculares para a detecção do RNA-HCV tem-se mostrado variável entre as diferentes metodologias disponíveis. Na técnica da PCR a sensibilidade tem variado de acordo com o método de detecção dos produtos amplificados. Valores de aproximadamente 100 cópias por mL de soros de pacientes foram alcançados usando a hibridação dos produtos com sondas marcadas radioisotópicamente (GRETCH *et al.*, 1993). O limite de detecção de 40 cópias de RNA-HCV por esse método foi observado por RUIZ-PERÉZ *et al.*, 1997, utilizando *primers antisense* marcados na extremidade 5' com ³²P. Esse procedimento permite a quantificação direta da carga viral pela análise radioisotópica do produto de PCR derivado da amostra clínica.

A sensibilidade dos ensaios de *nested*-PCR permite detectar menos que 100 cópias por mL (1 a 10 cópias por reação), usando o método de detecção com coloração de brometo de etídeo ou hibridação com sonda radioativa (GRETCH *et al.*, 1993). Em teste comparativo, diluindo-se as amostras clínicas, foi observado que a *nested*-PCR permitiu detectar RNA-HCV em amostras diluídas 1/10.000, enquanto na PCR observou-se resultados positivos somente em amostras com diluições inferiores a essas (LUNEL *et al.* 1995).

A sensibilidade analítica do ensaio Amplicor/Roche é de 700 cópias por mL, que é 4 a 10 vezes menos sensível do que os ensaios de *nested*-PCR otimizados em laboratório de pesquisa. O aumento na quantidade da

amostra (1 mL do soro) permite detectar menos que 100 cópias por mL no soro, com especificidade de 97% a 99% (GRETCH, 1997).

A sensibilidade da metodologia do bDNA na detecção do RNA-HCV tem mostrado um limite inferior de $2,0 \times 10^5$ eq/mL e um limite de detecção superior de $1,2 \times 10^6$ eq/mL (HODINKA, 1998; LUNEL *et al.*, 1999).

A sensibilidade da metodologia NASBA na detecção do RNA-HCV tem mostrado ser de 3×10^3 cópias/mL (LUNEL *et al.*, 1999).

De modo geral, os diferentes métodos moleculares existentes para a quantificação do RNA-HCV não se mostram equivalentes e possuem vantagens e desvantagens próprias, relacionadas ao número de amostras processadas, o tempo de execução do ensaio, automatização do processo, sensibilidade e intervalo de linearidade (PAWLOTSKY, 1997).

Um problema relacionado com os testes de RNA-HCV, é a variabilidade nos resultados obtidos entres diferentes laboratórios quando amostras clínicas são analisadas. Padronização de ensaios de PCR *in house* (desenvolvido em laboratório) para detecção de RNA-HCV têm mostrado algumas dificuldades. Este fato foi evidenciado no primeiro estudo de controle de qualidade realizado pelo "EUROHEP - *European Expert Group on Viral Hepatitis*" - em 1992. O estudo envolveu 31 laboratórios europeus, onde apenas 16% dos laboratórios concluíram os exames de forma correta utilizando um painel de testes padronizado. Onze desses laboratórios reportaram, nas suas análises de diluições em série, diferenças de 100 vezes na sensibilidade (ZAAIJER *et al.* 1993).

Em 1996, um segundo estudo de controle de qualidade foi novamente realizado pelo "EUROHEP" com a finalidade de analisar a melhoria

dos testes moleculares da detecção do RNA-HCV. O painel de referência compreendeu 4 amostras de plasmas RNA-HCV positivas (primeira semana de infecção), 6 amostras de plasmas negativos para RNA-HCV e duas séries de diluições de amostras padrão dos genótipos 1 e 3. Participaram do estudo 86 laboratórios. As informações fornecidas pelos laboratórios resultaram em 99 dados obtidos pelo ensaio da PCR *in house*, 28 dados obtidos pelo teste comercial PCR-HCV (AMPLICOR, Roche diagnostic System) e 9 dados, usando outros métodos. Os dados mostraram que 16% executaram corretamente os testes, 29% fracassaram em detectar as amostras fracamente positivas e 55% obtiveram resultados falso-positivos e falso-negativos. Entre os laboratórios com resultados satisfatórios houve uma diferença de 10.000 vezes na sensibilidade quando as amostras foram submetidas a diluições em série (DAMEN *et al.*, 1996).

Testes de proficiência para o RNA-HCV por PCR realizados pelo *College of American Pathologists (CAP)* envolvendo 40 laboratórios, mostraram uma concordância, com variação de 95,2% a 12,5% entre as respostas emitidas pelos laboratórios participantes e a resposta relatada pelo "CAP", em 5 levantamentos realizados. O erro mais freqüente foi o registro de resultados falso-negativos para espécimes verdadeiramente positivos, enfatizando a necessidade de processamento e manipulação cuidadosa das amostras nos testes de RNA-HCV (GRETCH, 1997).

Os fatores que contribuem para o aparecimento de resultados falso-negativos na detecção do RNA-HCV por métodos moleculares são: variabilidade do genoma viral, presença de diferentes genótipos, condições de

armazenamento e obtenção da amostra clínica, entre outros (BUKH *et al.*, 1992; TRAUBAUD *et al.*, 1996; HALFON *et al.*, 1996; DAMEN *et al.*, 1998).

O polimorfismo na região dos *primers* impede a ligação dos mesmos e conseqüentemente a amplificação. Considerando a existência de diferentes genótipos do HCV, a escolha dos *primers* a serem utilizados na detecção do RNA-HCV por métodos moleculares têm-se mostrado um fator limitante, gerando resultados falso-negativos. Os *primers* com localização na região 5'-UTR do genoma do HCV são descritos como sendo os mais indicados (BUKH *et al.*, 1992; CRISTIANO *et al.*, 1991; KANEKO *et al.*, 1990).

A influência do manuseio e do processamento das amostras clínicas para obtenção de resultados falso-negativos pelas técnicas de amplificação para a detecção do RNA-HCV tem sido mostrado por vários autores (CUYPERS *et al.* 1992; WANG *et al.*, 1992; FONG *et al.*, 1993; TRAUBAUD *et al.*, 1996; HALFON *et al.*, 1996). Os experimentos foram realizados avaliando-se a quantidade do RNA-HCV de amostras clínicas por diferentes métodos quando submetidas a diferentes condições e períodos de armazenamento. As temperaturas testadas variaram de -80°C, -20°C, 4°C e temperatura ambiente, sendo que o tempo de armazenamento variou de algumas horas até meses. Embora, os métodos de quantificação utilizados fossem diferentes (PCR competitivo, PCR com diluição seriada, bDNA e NASBA), as mesmas conclusões foram obtidas pelos autores. A maior estabilidade do RNA-HCV é alcançada com a separação imediata do soro e congelamento a temperatura de -80°C. A medida

em que eleva-se a temperatura até a temperatura ambiente observa-se uma perda significativa na quantidade de RNA-HCV circulante.

Um outro fator que influência é o tipo de anticoagulante usado para a obtenção do plasma. WANG *et al.*, 1992, avaliando o emprego da heparina e do citrato de sódio na obtenção do plasma, mostraram que a heparina interfere na PCR, gerando resultados falso-negativos, não tendo sido observada nenhuma interferência com o uso do citrato de sódio. No sistema de amplificação NASBA, o uso dos anticoagulantes tanto EDTA quanto heparina, não interferiu na reação de amplificação (DAMEN *et al.*, 1998).

A possibilidade da obtenção de resultados errôneos na detecção do RNA-HCV por técnicas de amplificação, torna indispensável o uso de um controle na PCR que promova o monitoramento do processamento da amostra clínica e do desempenho da reação. O controle é constituído de fragmentos de DNA ou RNA que podem ser obtidos por clonagem da região de interesse e amplificados simultaneamente, no entanto, devem ser distinguíveis da seqüência alvo (ZIMMERMANN & MANNHALTER, 1996).

A construção de controle pode ser obtida utilizando diversos procedimentos, como mutagênese sítio-dirigido ou alteração do tamanho da molécula sintética por meio de deleção ou inserção de seqüências de bases (ZIMMERMANN & MANNHALTER, 1996). Após a amplificação, o produto da PCR de ambas as metodologias mostram perfil eletroforético distinto da seqüência de interesse (ZIMMERMANN & MANNHALTER, 1996).

A viremia do HCV é freqüentemente baixa (BRADLEY, 1985; FARCI *et al.*, 1991; BRILLANT *et al.*, 1991) e por essa razão ensaios de

amplificação do gene têm sido utilizados para a detecção do RNA viral em amostras clínicas. Entre as metodologias de amplificação, a técnica *nested-PCR* é a que apresenta características que a tornam útil principalmente pela sua maior sensibilidade devido ao processo de dupla amplificação. O produto de amplificação da primeira reação, gerado por um grupo de *primers* específicos é submetido a uma segunda etapa de amplificação utilizando outros grupos de *primers* que são complementares à seqüência interna amplificada na etapa inicial (TANG *et al.*, 1997). A alta sensibilidade da *nested-PCR*, por outro lado, pode aumentar a probabilidade de contaminação com os produtos previamente amplificados (*amplicons*), no procedimento em que são transferidos para a segunda amplificação (TANG *et al.*, 1997).

Vários procedimentos têm sido descritos para evitar a obtenção de resultados falso-positivos, minimizando a contaminação por carreamento. Entre esses procedimentos temos: a separação física das principais áreas envolvidas no procedimento da técnica de amplificação (KWOK & HIGUCHI, 1989; NEUMAIER *et al.*, 1998); a esterilização de superfícies antes e após o início do trabalho, bem como os reagentes, com exceção dos primers, DNA polimerase e molécula alvo utilizando luz ultravioleta (254 nm a 300 nm) (CIMINO *et al.*, 1990a; SARKAR & SOMMER 1990; FOX *et al.*, 1991). O uso de enzimas, nucleases, como a UNG, para o pré-tratamento de produtos de PCR, os quais foram amplificados previamente com dUTP em substituição ao dTTP, representa um método de descontaminação, devido ao fato desta nuclease eliminar toda molécula contendo UTP (FURRER *et al.*, 1990; RYA & PERSING, 1993; LONGO *et al.*, 1990). O uso de reagentes fotoquímicos, principalmente os psoralém e seus derivados, quando

incorporados durante a reação de amplificação com subsequente fotoadição desses reagentes na fita de DNA sob a incidência de luz de comprimento de onda de 320-400 nm, não permite que esta molécula seja usada como molde em novas reações de amplificações, evitando a contaminação (CIMINO *et al.*, 1990b; ISAACS *et al.*, 1990) e o uso de reagentes químicos, para esterilização de superfícies (PRINCE & ANDRUS, 1992).

Minimizar a manipulação durante o procedimento nas reações de amplificações, reduzindo etapas, é uma alternativa que tem sido descrita para evitar contaminações por carreamento principalmente para *nested-PCR* (ERLICH *et al.*, 1991) sendo uma dessas alternativas a realização da reação da *nested-PCR* em um único tubo. Este método utiliza uma estratégia denominada *drop-in - drop-out nested priming*, onde os *primers* externos possuem uma temperatura de desnaturação (T_m) maior que a dos *primers* internos, possibilitando que ambos os grupos de *primers* sejam adicionados simultaneamente no início da reação de amplificação e que durante a primeira etapa de amplificação somente os *primers* externos hibridem, e na segunda reação de amplificação ocorra a hibridação dos *primers* internos. Dessa forma o tubo de reação de amplificação não necessita ser aberto uma vez iniciada a reação, evitando a contaminação cruzada provenientes de fragmentos amplificados previamente na primeira etapa da reação (ERLICH *et al.*, 1991, PECHARATANA *et al.*, 1995; CHAN *et al.*; 1996, ZHANG, 1996; LIN *et al.*, 1992).

No decorrer da revisão da literatura pode-se observar a importância do vírus da hepatite C como agente responsável pela maioria das hepatites crônicas. Dessa forma os métodos para a detecção do vírus da hepatite

C são fundamentais para determinar os indivíduos portadores da infecção, bem como o início do tratamento clínico. Por outro lado também, pode-se observar que os ensaios empregados no diagnóstico da hepatite C têm mostrado limitações. Os testes sorológicos apresentam baixa eficiência em vários casos: quando usados para a triagem de amostras provenientes de populações de baixo risco (triagem em banco de sangue) onde se observa a presença de resultados inconclusivos; na detecção de anticorpos anti-HCV em pacientes imunossuprimidos e na diferenciação entre infecções presentes e passadas. Dentre os métodos moleculares, a PCR é a mais utilizada, embora possua sensibilidade moderada, sendo necessário a utilização da reação de *nested-PCR*. O uso da *nested-PCR* tem sido restrito devido a possibilidade de apresentar resultado falso-positivo. Essas observações motivaram a realização do presente trabalho, que teve como objetivo a otimização da técnica da *nested-PCR* em tubo único para a detecção do RNA-HCV, de maneira a reduzir o risco de contaminação por carreamento, o tempo de execução e os custos, através da produção de um controle recombinante para a padronização da *nested-PCR* em tubo único e o monitoramento da PCR.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1. Reagentes

Os seguintes reagentes: cloreto de cálcio, dimetilsulfóxido (DMSO), glicose, xilenocianol foram obtidos da SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos), o cloreto de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de potássio, álcool isoamílico, clorofórmio, ácido acético glacial, etanol absoluto, azul de bromofenol foram adquiridos de MERCK, S.A. (Ind. Química, Rio de Janeiro, Brasil). A ampicilina, isópropil tio- β -D-galatosídeo (IPTG) foram obtidos de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, cidade, Alemanha). Kit Glass Pac/GS™- DNA Purification Kit (National Scientific Supply Company Inc., EUA), e o dodecilsulfato de sódio foi obtido de SERVA Finbiochimica (Heidelberg, N.I., Estados Unidos). O tris (hidroximetil) aminometano ultra puro, EDTA, acetato de potássio, fenol ultrapuro, enzimas *BamH* I, *Kpn* I, marcador de tamanho de peso molecular de 100 bp, agarose ultra pura, ácido bórico ultra puro, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidase (X-gal) e os *primers* para a amplificação da região 5' URT do genoma do HCV foram obtidos da Gibco-BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). O brometo de etídeo, Taq DNA polimerase, inibidor de Rnase RNAGuard®, ReproGel™, Kit comercial "ALFespress Auto Read sequencing Kit" e soluções de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ultrapuras foram adquiridos da Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia).

Os meios de cultura: Bacto-triptona; Extrato de levedura; Bacto-ágar foram adquiridos da Difco (Detroit, Michigan, USA).

5.1.2. Cepas de Bactéria

As cepas de DH5 α [F, 80d *lacZAM15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *rsdR17*, (*r_k⁻*, *m_k⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, (*lacZA-argF*)U169.] foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Hamza El-Dorry responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP.

5.1.3. Vetor

O vetor utilizado para a clonagem foi o *pBluescript KS⁻* cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Hamza El-Dorry responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP.

5.1.4. Equipamentos e material descartável

As placas de Petri e pipetas descartáveis de 1, 2, 25 mL foram obtidas da Falcon (Franklin Lakes, N.J., Estados Unidos). Os tubos de 50 mL e de 15 mL foram adquiridos da Costar Corporation (Cambridge, MA, Estados Unidos). Os tubos de centrífuga tipo eppendorf de 0,5 e 1,5 mL e as ponteiras com filtro e sem filtro de 0,5 a 10 μ L; 10 a 200 μ L e 100 a 1000 μ L foram adquiridas da Uniscience do Brasil (São Paulo – SP, Brasil). Os tubos de 0,2 mL foram adquiridos da Gibco-BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, Estados Unidos).

As pipetas P1000, P200, P100, P20 e P10 foram obtidas da Gilson (Emeryville, CA, Estados Unidos). O termociclador modelo GeneAmp PCR system 2400 foi adquirido da Perkin-Elmer Inc. (Norwalk, Connecticut, Estados Unidos). As centrífuga Eppendorf modelo 5415 e a centrífuga Eppendorf refrigerada modelo 5414 foram adquiridas da Brinkmann Instruments, Inc., (Westbury, Alemanha). O fluxo laminar modelo ULFS-12 foi adquirido da Veco, (Campinas, SP, Brasil). A cuba horizontal para eletroforese Gibco Horizont® 11-14 foi adquirida da Gibco-BRL, Life Technologies Inc., (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Incubadora orbital com agitação para cultura bacteriana modelo TE 420 foi obtida da Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil). O equipamento utilizado no seqüenciamento foi ALFexpress II DNA Analysis System, a fonte de eletroforese utilizada foi a EPS 200 da Pharmacia LKB e o transiluminador UV modelo Macrovue da Pharmacia LKB foram obtidos da Pharmacia Biotech, Inc., (Uppsala, Suécia). A autoclave vertical modelo 415, estufa de cultura modelo 002 CB, banho de água modelo 102/N e o agitador de tubos foram obtidos da Fanem (São Paulo, SP, Brasil). O forno de microondas modelo NN 7852 BH foi obtido da Panasonic (Manaus, AM, Brasil). O aparelho Milli-Q modelo academic foi obtido da Millipore (São Paulo, SP., Brasil). A balança semianalítica digital modelo HM 5000 foi obtido da Helmac (São Paulo, SP., Brasil). A balança analítica modelo H15 foi obtida da E. Mettler (Switzerland, Suíça). A centrífuga refrigerada modelo himac CR 20B2 foi obtida da Hitachi (Japão). O espectrofotometro DU 640® foi adquirido da Beckman (Califórnia, Estados Unidos). O aparelho de visibilização e foto-documentação utilizado foi o Gel doc 100 obtido da BIO RAD (Califórnia, Estados Unidos)

5.2. MÉTODOS

5.2.1. CLONAGEM

Na Figura 2 observa-se as etapas utilizadas para a obtenção do fragmento da região 5'-UTR do HCV e clonagem no *pBluescript KS*⁻. A amostra de RNA-HCV foi amplificada, e o produto da PCR foi reamplificado com iniciadores contendo a seqüência para reconhecimento das enzimas de restrição: *Bam*H I e *Kpn* I. Os fragmentos (produto de PCR) foram digerido, assim como o vetor. Estes foram incubados a 25°C por 1 hora em tampão contendo T4 ligase. Os clones foram identificados pela transformação em bactérias competentes DH5- α e selecionados em Ágar LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina. A análise dos clones foi feita por seqüenciamento e pela presença do fragmento clonado, após digestão com enzima de restrição *Bam*H I e *Kpn* I (VERLENGIA *et al.*, 1997).

5.2.2.1. Obtenção do fragmento da região 5' UTR

O fragmento a ser clonado foi obtido a partir da amplificação da região 5'-UTR pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os primers utilizados na PCR foram sintetizados com base na seqüência da 5'-UTR do genoma do HCV conforme descrito por OKAMOTO *et al.*, (1990). (*sense* 5'-GGCGACACTCCACCATAGATC-3' - número dos nucleotídeos: 1 ao 21), (*antisense* 5'-GGTGCACGGTCTACGAGACCT-3' - número dos nucleotídeos: 304 ao 324).

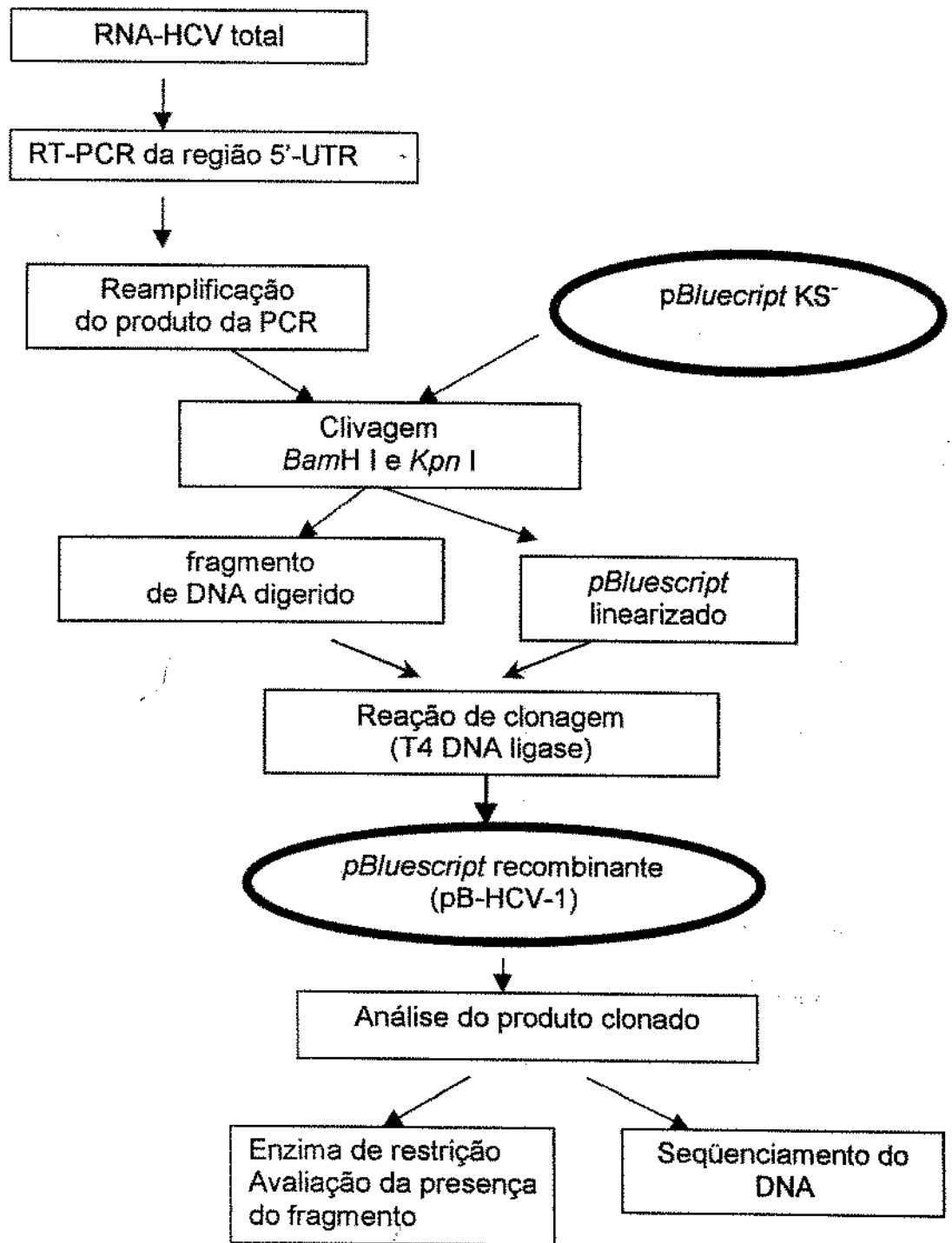


Figura 2. Fluxograma mostrando as etapas envolvidas na construção e obtenção do controle recombinante pB-HCV-1. Após a extração do RNA-HCV total, este foi amplificado por RT-PCR e posteriormente submetido a nova amplificação e o produto amplificado bem como o vetor foram clivados com as enzimas de restrição *BamH I* e *Kpn I* e submetidos a reação de ligação com T4 DNA ligase. O controle assim obtido foi analisado por seqüenciamento e digestão enzimática.

Para possibilitar a clonagem foram adicionadas na extremidade 5' dos *primers* seqüência de reconhecimento da enzima *BamH I* e *Kpn I*, nos *primers sense* e *antisense*, respectivamente. A amostra de RNA-HCV utilizada foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Antonio Eduardo Benedito Silva, do laboratório de hepatites virais da disciplina de Gastroenterologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

A reação de amplificação foi realizada a partir de 10µL da solução de RNA extraído, adicionados de 0,2 µM de cada *primer*, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Suécia) e tampão da PCR contendo: Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, MgCl₂ a 1,5 mM e de 48 U de transcriptase reversa AMV (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, Estados Unidos) (SHINDO et al., 1990). O termociclador foi programado para 60 minutos a 42°C para a reação inicial da transcrição reversa (RT), 5 minutos a 95°C; seguido de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos; 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 10 minutos de polimerização final (SHINDO et al., 1990). Os produtos da reação de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo.

Para se evitar contaminação por carreamento os experimentos foram realizados segundo as recomendações que segue a separação físicas das áreas, para cada etapa de amplificação. O uso de reagentes químicos anti-contaminação e luz ultravioleta foram empregados antes dos procedimentos para evitar o risco de contaminação cruzada. Para monitorar a presença de possíveis

contaminações por reagentes na PCR, todas as amplificações realizadas, foram controladas utilizando-se um branco de reação. Esse controle consistiu de um tubo no qual foram adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto o ácido nucléico (KWOK & HIGUCHI, 1989; NEUMAIER *et al.*, 1998).

5.2.2.2. Preparo das células *E. coli* DH5- α competentes.

As células de *E. coli* DH5- α foram preparadas, segundo COHEN *et al.*, (1972). A partir de uma colônia obtida do meio ágar LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de cloreto de sódio em q.s.p. 1000 mL, pH 7.0, 15 g de agar) da cepa *E. coli* DH5 α , incubou-se a 37°C em 50 mL LB líquido contido em um Erlenmeyer de 250 mL (\cong 4 horas) sob agitação de 250 rpm (Incubadora orbital, modelo TE 420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), até obtenção de densidade óptica (D.O. ₆₀₀) \cong 0,5. A cultura foi transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon 2098), previamente refrigerados (banho de gelo). A seguir, centrifugou-se a 7.000 g, por 10 minutos a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas cuidadosamente em 5,0 mL de CaCl₂ a 50 mM gelado, incubando-se em banho de gelo por 30 minutos, e então foram centrifugados a 7.000 g, por 10 minutos a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 2 mL de CaCl₂ a 50 mM gelado e mantidas em gelo. Para o armazenamento das bactérias competentes acrescentou-se 140 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizando cuidadosamente e distribuindo-se em alíquotas de 100 μ L, seguido de congelamento rápido em gelo seco com etanol. As células foram estocadas a -70°C.

5.2.2.3. Transformação da *E. coli* DH5- α competente com plasmídeo *Bluescript*.

As células competentes em um volume de 100 μ L foram colocadas em um tubo de polipropileno de 15 mL (Falcon 1509) previamente gelado, acrescentado-se 2 μ L do plasmídeo *pBluescript*. Após homogeneização, os tubos foram mantidos em gelo durante 30 minutos e, logo após, levados para um banho de água a 42°C durante 2 minutos seguido de incubação em gelo por mais 2 minutos. A seguir adicionou-se 1 mL de meio SOC (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de cloreto de sódio, 2,5 mM de cloreto de potássio, 10 mM de cloreto de magnésio e 20 mM de glicose em q.s.p. 1000 mL, pH 7.0), incubando-se a 37°C durante 5 minutos, seguido por 60 minutos sob agitação a 200 rpm (Incubadora orbital, modelo TE 420, Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil).

As células transformadas foram semeadas em meio sólido (LB/ágar) contendo 100 μ g/mL de antibiótico (ampicilina) e incubadas por uma noite a 37°C em estufa. Para avaliar a viabilidade das células competentes utilizadas, estas foram semeadas em meio LB/ágar sem ampicilina. Posteriormente, as colônias de células transformadas foram recuperadas das placas de Petri com auxílio de uma alça de platina, e semeadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 μ g/mL ampicilina. Os tubos foram incubados sob agitação de 200 rpm a 37°C por uma noite. Após esse período, as células cultivadas foram utilizadas para isolamento do DNA plasmidial.

5.2.2.4. Obtenção e purificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi obtido pelo método de lise alcalina, seguido de purificação através de precipitação por etanol 100% (SAMBROOK *et al.*, 1989). As colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo *pBluescript KS* foram cultivadas em tubos contendo 5 mL de meio de cultura líquido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, durante 18 horas, a 37°C, sob agitação de 180 rpm (Incubadora orbital, modelo TE 420, Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil). A seguir as suspensões bacterianas foram centrifugadas (7.000 g, temperatura ambiente, 15 minutos) e as células bacterianas ressuspensas em 1 mL de meio LB, sendo posteriormente transferidas para tubos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL.

Em seguida, nova centrifugação foi realizada desprezando-se o sobrenadante e as bactérias foram submetidas à lise alcalina (Glicose a 50 mM, EDTA a 10 mM, Tris-HCl a 25 mM, pH 8,0, NaOH a 0,2 N, SDS a 1%, ácido acético glacial e acetato de potássio a 5 M).

Após centrifugação a 8.000 g, por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos novos tipo *eppendorf* de 1,5 mL. Removeu-se as proteínas com a solução fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico e, a seguir, purificou-se o DNA por precipitação com etanol absoluto a 4°C e centrifugação a 8.000 g, a -10°C, por 20 minutos. O DNA plasmidial foi lavado por duas vezes com etanol a 70%, gelado, o qual após secagem foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e mantido a -20°C.

5.2.2.5. Digestão do vetor e do produto de PCR com as enzimas *BamH I* e *Kpn I*

Obtido o plasmídeo e o produto de PCR, ambos foram digeridos com as enzimas de restrição *BamH I* e *Kpn I* (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA). A digestão enzimática foi realizada em 2 etapas, ou seja, primeiro digeriu-se o DNA com a enzima de restrição *BamH I*, após o período de incubação a amostra foi purificada e em seguida realizada a digestão com a segunda enzima de restrição, a *Kpn I* e posterior purificação. As purificações do DNA plasmidial, bem como, dos produtos da PCR foram realizadas utilizando-se o Kit Glass Pac/GS[™] - DNA Purification Kit (National Scientific Supply Company Inc., EUA). As amostras foram submetidas à separação eletroforética, utilizando-se gel de agarose a 1,2% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo. Em seguida, os fragmentos de DNA foram visibilizados em transiluminador de luz UV e o fragmento foi retirado do gel com o auxílio de um estilete e transferidos para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL. A esses foram acrescentados 2 volumes da solução de eluição em relação ao fragmento do gel obtido, seguido de incubação a 65°C, permitindo a dissolução da agarose em aproximadamente 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 µL da resina Glass/Pac incubando-se durante 5 minutos a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Após esse período centrifugou-se (13.800 g) e os sobrenadantes foram desprezados. Os sedimentos foram lavados com tampão adequado por três vezes e ressuspensos com um volume de água não inferior ao da resina adicionada. A seguir foram deixados em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, período esse em que as amostras foram

ressuspensas várias vezes por homogeneização com o auxílio de uma pipeta automática. Centrifugou-se a 2.040 *g* e os sobrenadantes, contendo DNA, foram transferidos para tubo com capacidade de 1,5 mL.

5.2.2.6. Reação de Ligação

O plasmídeo e produto da PCR digeridos foram incubados em tampão adequado (Tris-HCl a 250 mM (pH.7.6); MgCl₂ a 50 mM; ATP a 5 mM; DTT a 5 mM; 25% (w/v) polietileno glicol-8000 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA.), contendo 2 U de T4 DNA ligase (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA.) por 1 hora a 25°C, utilizando-se a relação molar vetor/inserto (1:7), para um volume final de 20 µL.

5.2.2.7. Transformação da *E. coli* DH5-α com plasmídeo recombinante pB-HCV-1

O procedimento envolvido nesta etapa já foi descrito no item 5.2.2.3.. As bactérias *E. coli* DH5-α transformadas foram preparadas da seguinte forma: em 3 diferentes tubos foram adicionados 40 µL X-gal 2% e 40 µL de IPTG (isopropil tio-β-D-galatosídeo) 100 mM seguido da adição de 100 µL, 250 µL e 500 µL das células bacterianas transformadas respectivamente. A presença do IPTG induz a expressão do gene LacZ, que na presença do substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactosidase (X-gal) promove a formação de colônias azuis. Por outro lado, a inserção de um fragmento de DNA externo na região do *polylinker* interrompe a fase de leitura, gerando colônias recombinantes de cor

branca. Os plasmídeos recombinantes foram isolados conforme descrito no item 5.2.2.4.; a seguir foi avaliada a presença do inserto, após digestão com as enzimas *BamH I* e *Kpn I* e posterior análise por separação eletroforética em gel de agarose a 1,2 % pré-corado com 0,5 ug/mL de brometo de etídeo, assim como por seqüenciamento.

5.2.2.8. Análise do plasmídeo recombinante pB-HCV-1

5.2.2.8.1. Análise por Restrição enzimática

As enzimas de restrição *BamH I* e *Kpn I* foram utilizadas para digerir o plasmídeo recombinante (pB-HCV-1). A digestão enzimática foi realizada em 2 etapas, ou seja, primeiro digeriu-se o pB-HCV-1 com a enzima de restrição *BamH I*, após o período de incubação a amostra foi purificada conforme descrito no item 5.2.2.5. e em seguida realizada a digestão com a segunda enzima de restrição *Kpn I*. Os fragmentos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %, contendo 0,5 ug/mL de brometo de etídeo e visibilizado sob luz ultravioleta em transiluminador (Pharmacia. Biotech, Inc., Uppsala, Suécia).

5.2.2.8.2. Análise automatizada do inserto clonado

O método de seqüenciamento de DNA foi baseado na terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos, segundo SANGER *et al.*, (1977), utilizando-se o *Kit* comercial "ALFespress Auto Read sequencing kit" (Pharmacia. Biotech, Inc.

Uppsala, Suécia) utilizando os procedimentos recomendados e a concentração de 5µg do pB-HCV-1 purificado. O método de marcação empregado pelo *Kit* é a incorporação de "Cy5 indodicarbocyanine" na extremidade 5' dos *primers* universais empregado para o sequenciamento. O equipamento utilizado no seqüenciamento foi ALFexpress II DNA Analysis System (Pharmacia. Biotech, Inc. Uppsala, Suécia). O gel utilizado foi o ReptoGel™ (Pharmacia. Biotech, Inc. Uppsala, Suécia), preparado e transferido para a placa, conforme instruções do fabricante. A polimerização foi realizada sob luz ultravioleta. A separação eletroforética foi realizada durante 600 minutos à 1500 volts. (60 mA/ 25-30W), com tampão TBE (Tris-HCl a 0,45 mM, ácido bórico a 0,45 mM e EDTA a 2,5 mM, pH 8,0). O *software* de controle de equipamento, processamento e edição das seqüências utilizado foi ALFWin versão 2.0. As seqüências obtidas foram confrontadas com seqüências depositadas no banco gênico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando o programa BLAST, acessado via internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

5.3. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pB-HCV-2 (Controle positivo)

A estratégia para a construção do controle positivo usado na padronização e monitoramento das reações de detecção do HCV-RNA pela *nested-PCR* em tubo único, denominado pB-HCV-2, foi realizada por remoção de uma seqüência de bases localizadas internamente ao fragmento clonado pB-HCV-1 utilizando enzima de restrição (Fig. 3) (VERLENGIA *et al.*, 1997).

A partir da seqüência de DNA definida e utilizando o programa PC Gene (ABI) foram localizados os diversos sítios de restrição presente no fragmento para várias endonucleases. Selecionou-se a enzima *PpuM* I com sítios de restrição localizados nos nucleotídeos 98 e 170 (5'- A/G G↓G (T/A) CC (T/C) - 3'), possibilitando a remoção de 72 bp, na região central do fragmento, preservando-se a região onde estão localizadas as seqüências complementares dos *primers* utilizados na PCR.

O plasmídeo pB-HCV-1 foi digerido com a *PpuM* I e purificado conforme descrito no item 5.2.2.5.. Em seguida a reação de ligação foi realizada de acordo com o item 5.2.2.6..

O produto de reação de ligação foi utilizado para transformação da bactéria *E. coli* DH5- α competente conforme descrito no item 5.2.2.3..

A seqüência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pB-HCV-2 foi analisada utilizando-se a metodologia de seqüenciamento, já descrita no item 5.2.2.8.2..

O plasmídeo recombinante (pB-HCV-2) foi obtido através da extração com lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) de 500 mL de cultura bacteriana como descrita no item 5.2.2.4.. A purificação foi realizada por meio de cromatografia líquida em sistema FPLC Fast Protein Liquid Chromatographic (Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Suécia) (HINES *et al.*, 1992) e coluna de troca iônica Mono Q HR 5/5 1 mL (Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Suécia).

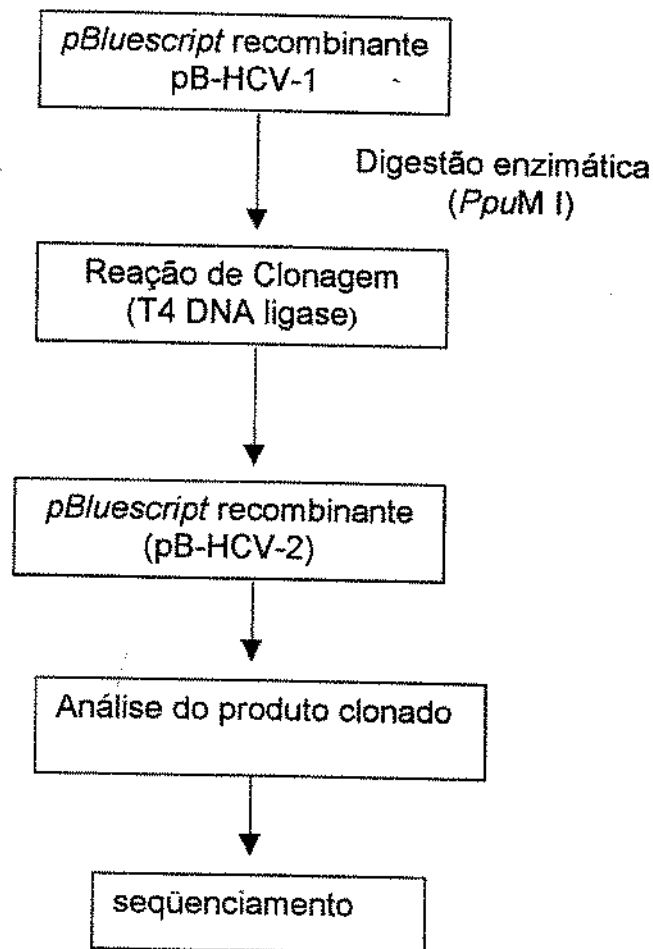


Figura 3 - Fluxograma ilustrando as etapas para construção de um controle positivo a partir do fragmento clonado pB-HCV-1. A digestão com *PpuM I*, remove 72 bp clivando os nucleotídeos 98 e 170 mantendo intactas as seqüências reconhecidas pelos *primers* das 2 etapas de amplificação da PCR. A ligação do plasmídeo pB-HCV-1 cortado gera o plasmídeo recombinante pB-HCV-2.

5.4. OTIMIZAÇÃO DA *NESTED*-PCR EM TUBO ÚNICO

5.4.1. Avaliação dos *primers*

Os *primers* utilizados na amplificação do RNA-HCV, por *nested*-PCR em tubo único foram sintetizados baseados na seqüência da região 5'-UTR, altamente conservada do genoma do HCV, segundo descrição de OKAMOTO, *et*

al., (1990). Para desenvolvimento da *nested-PCR* em tubo único, as seqüências dos *primers* foram modificadas, de forma que os *primers* externos e internos apresentassem características diferentes na reação da *nested-PCR* em tubo único. As alterações efetuadas nas seqüências dos nucleotídeos constituintes dos *primers* foram analisadas quanto as suas características (temperatura de desnaturação) por meio do programa Oligo V. 1.0 e quanto a homologia com o genoma do HCV por meio das informações contidas no banco gênico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A seqüência dos *primers* externos, tanto *sense*, quanto *antisense*, foram acrescidos de 3 bases na extremidade 3' correspondente à seqüência genômica do vírus HCV, (*sense* 5' -GGCGACACTCCACCATAGATCACT-3' - número de nucleotídeos 1 ao 24 e *antisense* 5'- GGTGCACGGTCTACGAGACCTCCC-3' - número de nucleotídeos 304 ao 327).

Com relação aos *primers* internos, estes tiveram a redução do número de bases, tanto na extremidade 5' quanto na extremidade 3', apresentando a seguinte seqüência 5'-TGAGGAACTACTGTCTT-3' (*sense*; número de nucleotídeos 31 ao 47) e 5'-TATCAGGCAGTACCACA-3' (*antisense*; número de nucleotídeos 267 ao 283). Estas alterações permitiram obter uma diferença na temperatura de desnaturação entre os *primers* externos e internos de 32°C

5.4.2. Avaliação dos parâmetros da PCR

A temperatura de hibridação dos *primers*, concentração de cloreto de magnésio, concentração dos *primers* e números de ciclos foram avaliados para compor o modelo de ensaio da PCR. As reações foram realizadas para cada grupo de *primers*. Após a determinação de cada parâmetro procedeu-se os ensaios da PCR em tubo único. Todos os parâmetros foram avaliados utilizando concentrações constantes dos reagentes, ou seja, 500 nM de cada *primer*, 200 µM de cada desoxiribunucleotídeo, 2 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotec, Inc., Uppsala, Suécia); tampão da PCR contendo: Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM, MgCl₂ a 2,0 mM e gelatina a 0,01% em um volume final de 100 µL, baseados na descrição de INNIS & GELFAND (1990), alterando-se somente o parâmetro em análise. À medida em que cada variável era determinada, incorporava-se aos experimentos subseqüentes.

Foram testadas para os *primers* externos as temperaturas de 72°C, 74°C, 76°C, 78°C e 80°C e de 44°C, 46°C e 48°C para os *primers* internos. As concentrações de 0,5 mM; 1 mM, 1,5 mM; 2,0 mM e 2,5 mM de cloreto de magnésio foram avaliadas para ambos os *primers*. Os produtos de amplificação foram avaliados em intervalos de 15; 20; 25; 30 e 35 ciclos. Os *primers* foram testados nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300, 400, 500 nM (Fig. 4).

As reações de amplificações foram conduzidas de acordo com INNIS & GELFAND, 1990, com exceção da temperatura de hibridação. Assim, os ciclos de amplificações foram de: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação de (testada 72°C a 80°C e de 42°C a

48°C com incremento de 2°C respectivamente para os *primers* externos e internos) por 1 minuto, e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para polimerização final. As reações de amplificações foram processadas no termociclador modelo GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, Estados Unidos). Esse procedimento foi aplicado em todas as determinações das variáveis.

Todos os testes foram realizados com o controle pB-HCV-2 (plasmídeo recombinante) na concentração de 9×10^4 cópias. O número de cópias do controle recombinante foi calculado usando o peso molecular do plasmídeo clonado e o número constante de Avogadro de acordo com CHANG *et al.* (1997). A quantificação do DNA plasmidial foi realizada por espectrofotometria a 260 nm (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os produtos resultantes das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A visibilização, bem como a foto-documentação dos produtos amplificados foram realizados por meio do aparelho Gel doc 1000 (BIO RAD, Califórnia, USA) composto de um transiluminador de luz UV acoplado a uma câmara de vídeo CCD. Sendo a imagem processada por meio do software da Molecular Analysis. Este procedimento foi empregado em todas as análises dos produtos da PCR.

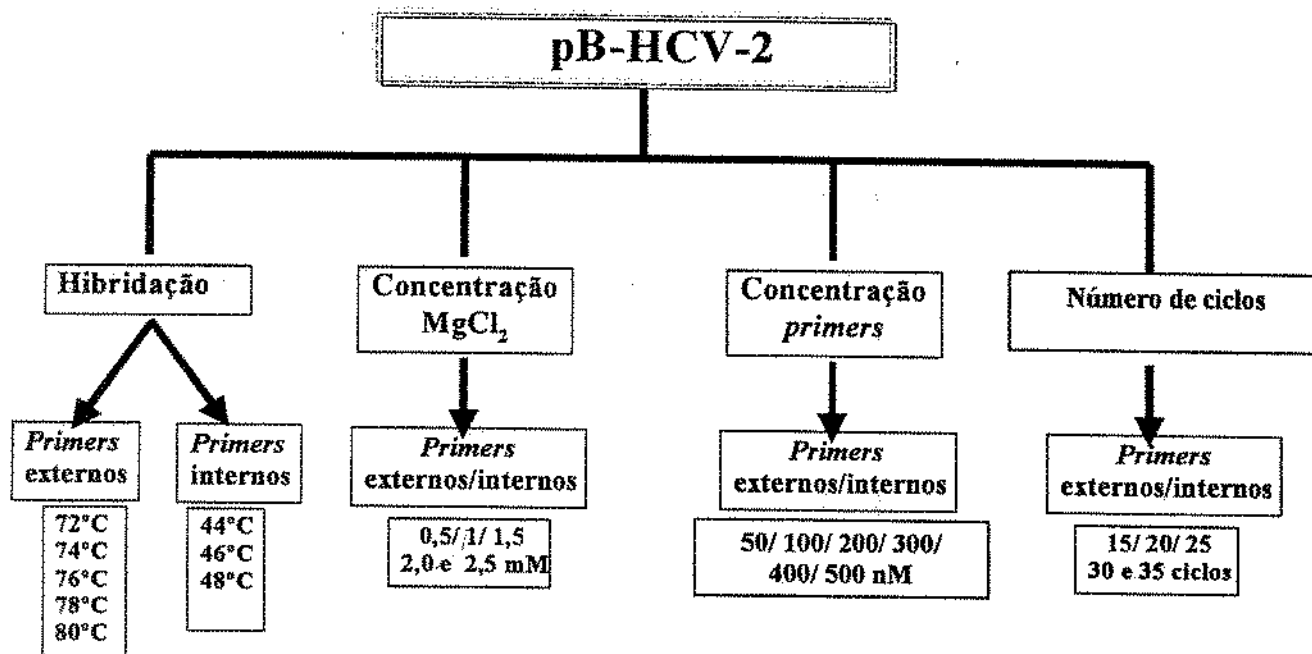


Figura 4 – Fluxograma de trabalho da otimização da PCR. Parâmetros avaliados: Temperatura variando de 72°C a 80°C e 42°C a 48°C com intervalo de 2°C respectivamente para os *primers* externos e internos; Concentração de MgCl₂ de 0,5 a 2,5 mM variando de 0,5 mM para ambos os *primers*; Concentração dos *primers* de 100 a 500 nM em intervalos de 100 nM, bem como a concentração de 50nM para ambos os *primers* e o número de ciclos foi avaliado de 15 a 35 com intervalos de 5 ciclos para ambos os *primers*.

5.4.3. Avaliação da concentração dos *primers* externos na *nested-PCR* em tubo único

Após a determinação dos parâmetros avaliados anteriormente (Tabela 1), estes foram usados para realizar a amplificação de um único fragmento na reação de *nested-PCR* em tubo único. Contudo, para a obtenção de um único fragmento na reação da *nested-PCR* em tubo único foram avaliadas concentrações inferiores dos *primers* externos. As concentrações estudadas foram de 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200 nM na reação final da *nested-PCR* em tubo único. Os testes foram realizados com o plasmídeo recombinante (pB-HCV-2) na concentração de 9×10^4 cópias. As reações de amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, Estados Unidos), utilizando as seguintes etapas: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C e 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguindo-se 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 46°C por 1 minuto e 72°C durante 1 minuto e uma polimerização final de 10 minutos a 72°C.

5.4.4. Adequação do número de ciclos de amplificação na *nested-PCR* em tubo único

Estabelecidos os parâmetros da *nested-PCR* em tubo único para a obtenção de um fragmento único (Tabela 1), foram realizados experimentos para estabelecer o número de ciclos de amplificações na reação de *nested-PCR* em tubo único, onde se obtém uma maior quantidade do produto resultante da

amplificação. Os número de ciclos avaliados foram 25; 30; 35; 40 e 45. O programa utilizado no termociclador foi: uma primeira etapa da reação (PCR) de 5 minutos a 94°C e 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguindo-se de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 46°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto para a reação de *nested*-PCR. Os testes foram realizados com o plasmídeo recombinante (pB-HCV-2) na concentração de 9×10^4 cópias. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador modelo GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Norwalk, Connecticut, Estados Unidos).

5.5. TESTES DE SENSIBILIDADE

Diluições seriadas de 1:100 do plasmídeo recombinante pB-HCV-2, a partir da concentração de 9×10^8 cópias foram utilizadas para avaliar a sensibilidade da *nested*-PCR em tubo único. A reação de amplificação foi realizada utilizando os parâmetros descritos na Tabela 1. A sensibilidade da detecção da *nested*-PCR em tubo único proposto foi avaliado comparando-se com a *nested*-PCR convencional. O mesmo número de cópias empregada na *nested*-PCR em tubo único foi empregado na *nested*-PCR convencional.

A metodologia da *nested*-PCR convencional empregada foi a proposta por SHINDO *et al.*, (1990) modificando-se a temperatura de hibridação em função das alterações realizadas nos *primers* descritas por OKAMOTO *et al.*, (1990) e aqui empregados e descritas no item 5.4.1..

5.6. AVALIAÇÃO DO MÉTODO

5.6.1. Reavaliação da concentração dos *primers* externos na *nested-PCR* em tubo único.

A opção de obter o cDNA em um tubo separado inicialmente das amostras clínicas, para posterior amplificação, gerou a necessidade de se avaliar novas concentrações dos *primers* externos, devido ao consumo destes na obtenção do cDNA. As concentrações finais de 10, 25, 50 e 100 nM dos *primers* externos na reação de *nested-PCR* em tubo único foram avaliados, sendo os demais parâmetros mantidos constantes (Tabela 1).

5.6.2. Detecção do RNA-HCV em amostras clínicas

Dez amostras clínicas positivas para o anti-HCV pelos métodos de ELISA (*kit* – LiaTek HCV-3, Organon Technicka, Boxtel, Netherlands), e RIBA (*Kit* – Embrabio – HEMOBIL HCV, São Paulo, SP.) de terceira geração, cedidas pela Dra. Leda Bassiti do Laboratório de Virologia e Desenvolvimento Tecnológico da Fundação Pró-Sangue Hemocentro São Paulo foram utilizadas para avaliar o método de *nested-PCR* em tubo único. As mesmas amostras foram também avaliadas pelo método da *nested-PCR* convencional descrito por SHINDO *et al.*, (1990) modificado.

A extração do RNA-HCV foi realizada utilizando o *Kit* comercial QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen, Califórnia, Estados Unidos) , seguindo-se as recomendações do fabricante. O cDNA foi produzido a partir de 5 µl do RNA em

um volume final 20 μL de reação contendo: 200 U da enzima de transcrição reversa (SUPERScript TM II – Gibco BRL- Life technologies MD, Gaithersburg, USA), 4 μL do tampão da enzima (Tris-HCl a 250 mM pH 8.3; KCl a 375 mM; MgCl_2 a 15 mM), 2 μL DTT a 0,1 M, 1 μL de uma mistura de dNTP a 10 mM. A concentração de *primers* externos utilizada foi de 100 nM.

Concluída a reação para obter o cDNA, 5 μL foram utilizados na reação de *nested-PCR* em tubo único, bem como na reação de *nested-PCR* convencional.

A reação de *nested-PCR* em tubo único foi realizada utilizando os parâmetros descritos na Tabela 1. A reação de *nested-PCR* convencional foi realizada conforme descrita no item 5.2.2.1. ressaltando-se que a obtenção do cDNA foi realizada em reação separada da amplificação.

6. RESULTADOS

6.1. CLONAGEM

6.1.1. Obtenção do fragmento da região 5'-UTR

Na figura 5, linhas 5 e 6 observa-se o fragmento de 323 bp obtido pós amplificação da região 5'-UTR utilizando como RNA molde, amostra de paciente com hepatite C confirmado por reações imunológicas, histológicas e por amplificação do RNA viral por PCR sem digerir e digerido com as enzimas *BamH I* e *Kpn I* respectivamente.

6.1.2. Reação de ligação e obtenção do clone recombinante pB-HCV-1

Os resultados da reação de ligação foram avaliados após transformação da bactéria DH5- α e selecionado em ágar LB contendo ampicilina. Os clones obtidos foram expandidos e processados para estudo da presença do inserto desejado. Na figura 5 mostra-se a eletroforese onde na linha 2 pode-se observar o plasmídeo circular (*pBluescript KS*⁺) e na linha 3 a forma linear. Na mesma figura verifica-se nas linhas 7 e 8 o plasmídeo recombinante pB-HCV1 antes e após a digestão respectivamente com as enzimas *BamH I* e *Kpn I*. Pode-se confirmar a presença do fragmento clonado de 323 bp.

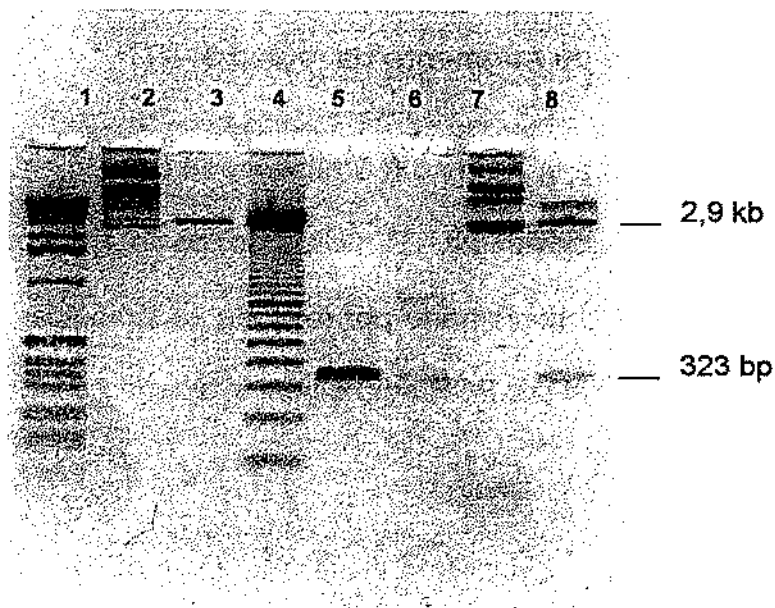


Figura 5 – Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1,5% do inserto clonado HCV-1 após amplificação da região 5'UTR do genoma do RNA-HCV por PCR. Linhas 1 e 4: Marcador de tamanho molecular de DNA 1 kb e 100 bp, respectivamente; Linhas 2 e 3: plasmídeo *Bluescript KS⁻* selvagem antes e após a clivagem com as enzimas *BamH I* e *Kpn I*, respectivamente; Linhas 5 e 6: Produto de PCR antes e após a clivagem com *BamH I* e *Kpn I*; Linhas 7 e 8: Plasmídeo recombinante (pB-HCV-1) antes e após a clivagem com *BamH I* e *Kpn I*.

6.2. AVALIAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DO INSERTO CLONADO

Na figura 6 painel A, mostra-se a seqüência dos nucleotídeos do pB-HCV-1 obtida após o seqüenciamento do DNA. O fragmento clonado possui 323 bp, iniciando no nucleotídeo 1 do genoma do HCV e terminando no nucleotídeo 323 bp de acordo com a seqüência descrita por ENOMOTO, *et al.*, (1995) e constante no GenBank, com número de acesso D50485 do National

Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seqüência dos *primers* utilizadas nas reações de amplificação encontram-se destacados. Em azul os *primers* externos P1 e P2, em verde os *primers* internos P3 e P4 (Figura 6 painel A).

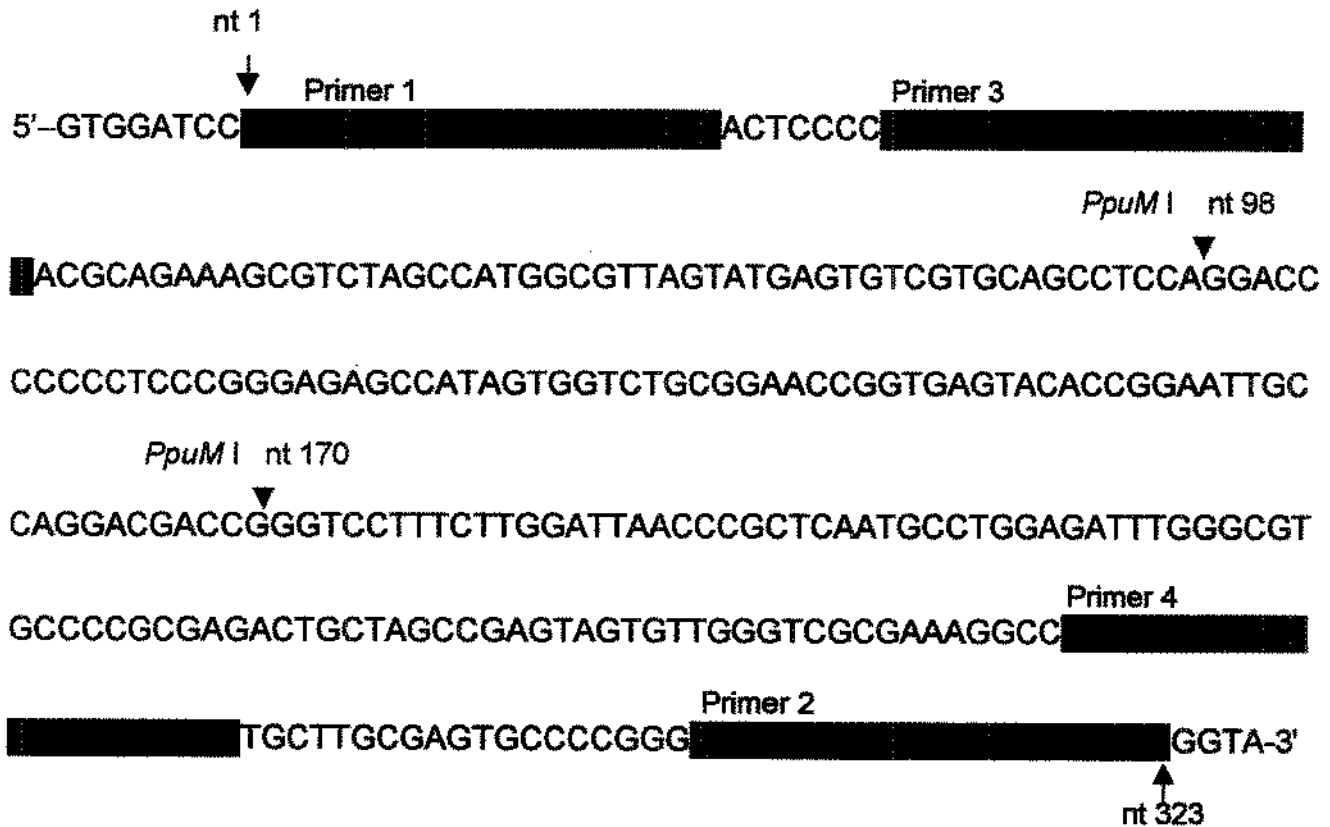
6.3. REMOÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

O clone recombinante pB-HCV-1 após ter sido seqüenciado, foi avaliado para a remoção de um fragmento interno aos *primers* por restrição enzimática. Conclui-se que a enzima *PvuM* I adequou-se ao objetivo possibilitando a remoção de 72 bp na região 98 e 170 da seqüência obtida do inserto (Figura 6, painel A).

Na figura 6 painel B podemos verificar o resultado da remoção dos 72 bp do clone pB-HCV-1 constituindo então o segundo clone o pB-HCV-2 com 251 bp.

A confirmação da seqüência de nucleotídeos foi realizada por meio de seqüenciamento automatizado conforme ilustrado na figura 6, painel B. A remoção de 72 bp foi realizada preservando a região de reconhecimento dos *primers* destacados em cores azul para os *primers* externos e verde para os *primers* internos (Figura 6, painel B)

A)



B)

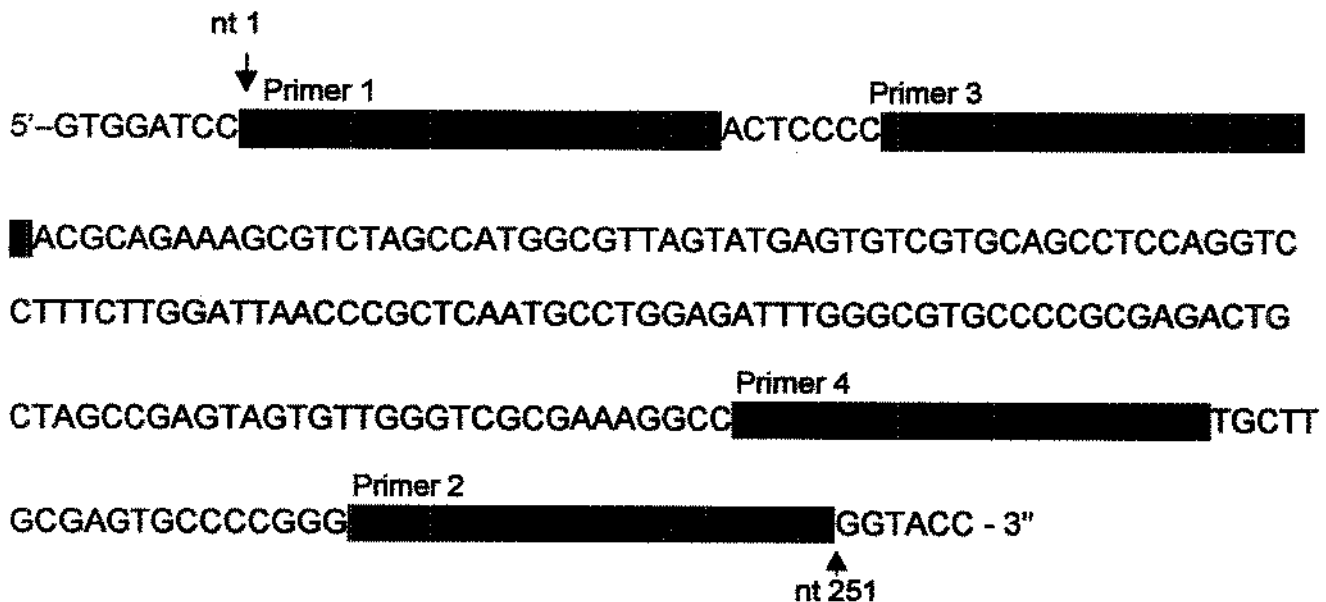


figura 6 - No painel A está ilustrada a seqüência dos nucleotídeos da região 5'-UTR do HCV clonada no plasmídeo *Bluescript* KS a partir do produto amplificado de 323 bp. No painel B são demonstradas a seqüência de nucleotídeos do pB-HCV-2, após a remoção de 72 bp pela enzima *PpuM* I. A seqüência dos *primers* foram mantidas (conforme destacado em cores).

6.4. OTIMIZAÇÃO DA NESTED-PCR EM TUBO ÚNICO

6.4.1. Determinação da temperatura de hibridação dos *primers* na PCR

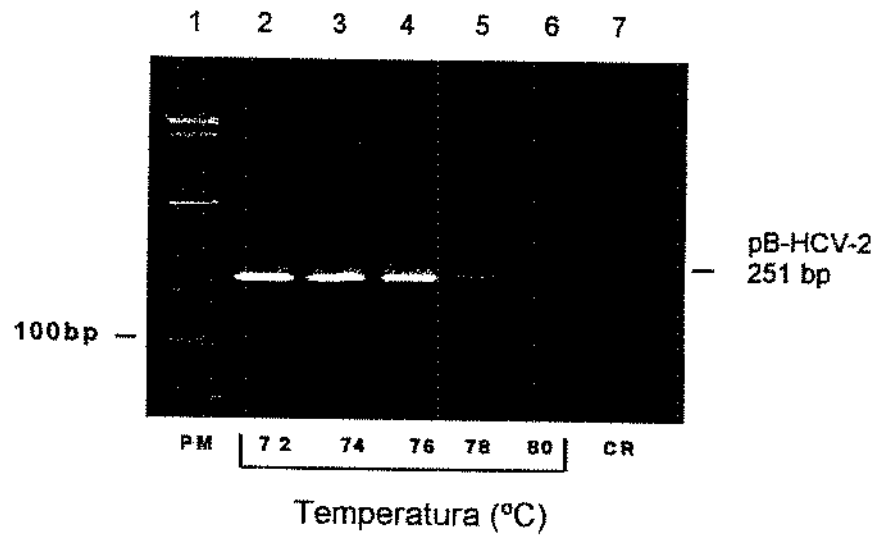
Os resultados apresentados na Figura 7, painel A, linhas 2 a 6 mostram a avaliação das temperaturas de hibridação da PCR com os *primers* externos. Observa-se que as temperaturas de 72°C a 76°C apresentam amplificação satisfatória com presença de bandas bem visíveis. Verifica-se que nas temperaturas de 78°C a 80°C não houve boa eficiência na amplificação. Esses resultados nos levaram a escolher a temperatura de 72°C, devido a temperatura de polimerização ideal da enzima Taq DNA polimerase ser a mesma, desta forma minimizando o tempo de polimerização (Fig.7, painel A, linha 2).

Para os *primers* internos as temperaturas testadas foram de 44°C a 48°C, variando em intervalos de 2°C, onde se observou similaridade entre os resultados de amplificação obtidos nas três temperaturas avaliadas (Figura 7, painel B, linhas 2 a 4). Temperaturas abaixo de 44°C não foram usadas para evitar a formação de produtos inespecíficos na *nested-PCR*. Foi selecionada a temperatura de hibridação intermediária (46°C) (Figura 7, painel B, linha 3).

6.4.2. Determinação da concentração de cloreto de magnésio na PCR

Como resultado da avaliação da concentração de $MgCl_2$ na reação da PCR utilizando os demais constituintes da reação sem alteração, verificou-se que das concentrações testadas (0,5 a 2,5 mM) os resultados foram semelhantes

A)



B)

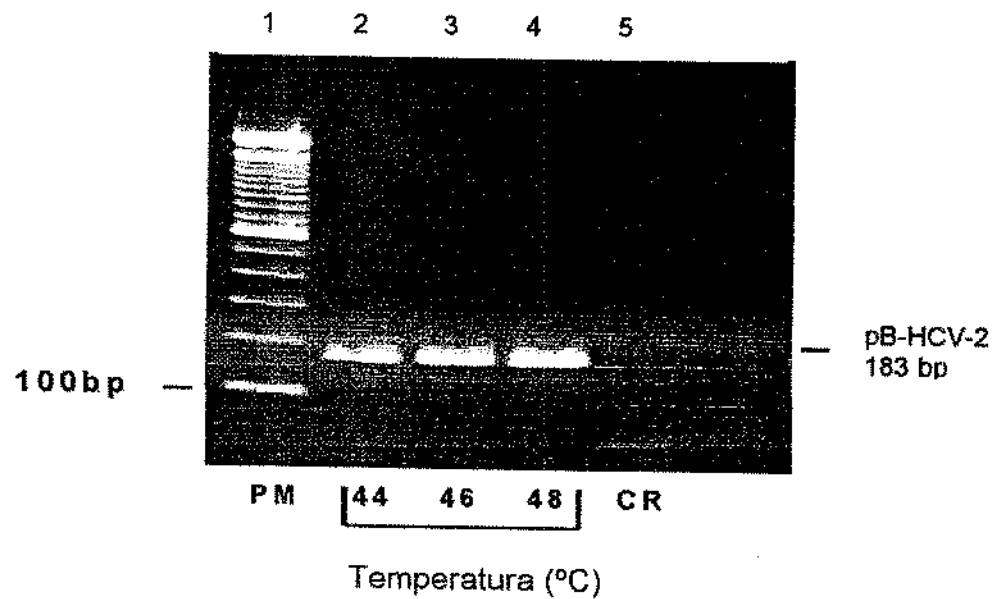


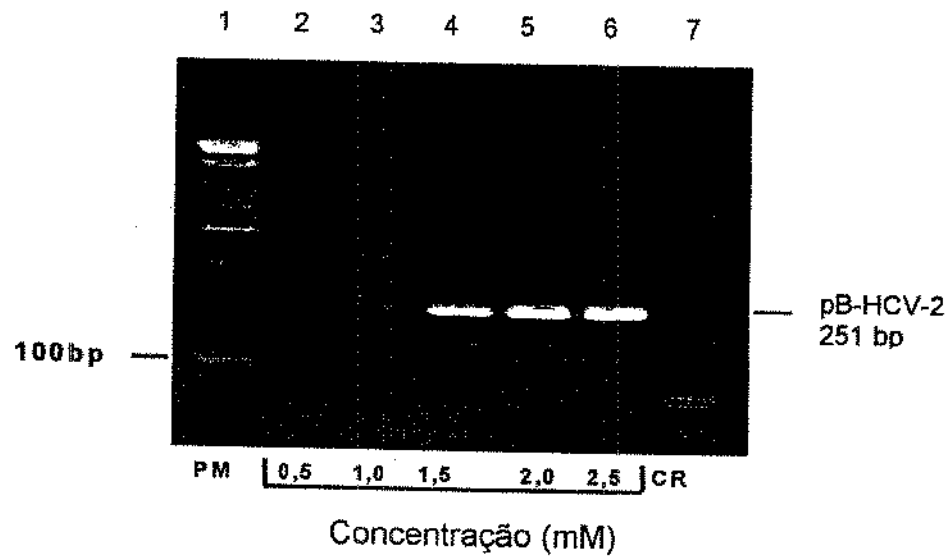
Figura 7 - Fotografia do gel da eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de amplificação do pB-HCV-2 utilizando diferentes temperaturas de hibridação na reação da PCR. Painel A *primers* externos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp; Linhas 2 a 6: temperaturas 72°C, 74°C, 76°C, 78°C e 80°C, respectivamente; Linha 7: Controle de Reagentes. Painel B: *primers* internos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp; Linhas 2 a 4: temperaturas de 44°C; 46°C e 48°C, respectivamente; Linha 5: Controle de reagentes.

para ambos os *primers* (internos e externos) como é observado na Fig. 8 painel A e B. A eficiência da amplificação foi proporcional ao aumento do MgCl₂ até 2,0 mM, para 2,5 mM aparentemente foi igual a de 2,0 mM (Fig. 8 painéis A e B, linhas 5 a 6). Conclui-se que a concentração adequada seria de 2 mM, concentração essa que foi utilizada nas reações subseqüentes.

6.4.3. Adequação do número de ciclos na PCR

Os resultados da avaliação dos números de ciclos na reação da PCR utilizando-se pB-HCV-2 para 15, 20, 25, 30 e 35 para ambos os grupos de *primers* estão demonstrados na Figura 9, painéis A e B. Os testes foram realizados em reações da PCR individuais para os *primers* externos e internos. Os resultados obtidos com os *primers* externos mostram pela intensidade das bandas uma eficiência máxima da PCR em 35 ciclos e eficiência mínima com 25 ciclos, correspondendo a 4×10^7 cópia, partindo de 1 cópia de HCV (Figura 9, painel A, linhas 4 e 6 respectivamente) (WATSON et al., 1992). Esses resultados permitiram a escolha de 20 ciclos para a amplificação da primeira etapa da *nested-PCR* em tubo único. Com esse número de ciclos não se observou a presença de fragmentos amplificados (Figura 9, painel A, linha 3). Esta condição de escolha, embora não permita a visualização de fragmentos amplificados na primeira etapa da reação possui sensibilidade suficiente para a visualização do produto amplificado na segunda etapa, uma vez que, com 20 ciclos temos aproximadamente 2×10^5 cópias (WATSON et al., 1992), o que é maior do que a variação esperada de HCV em amostras clínicas que varia de 10^3 a 10^8 cópias, com média modal de 10^6 (FARCI et al., 1991).

A)



B)

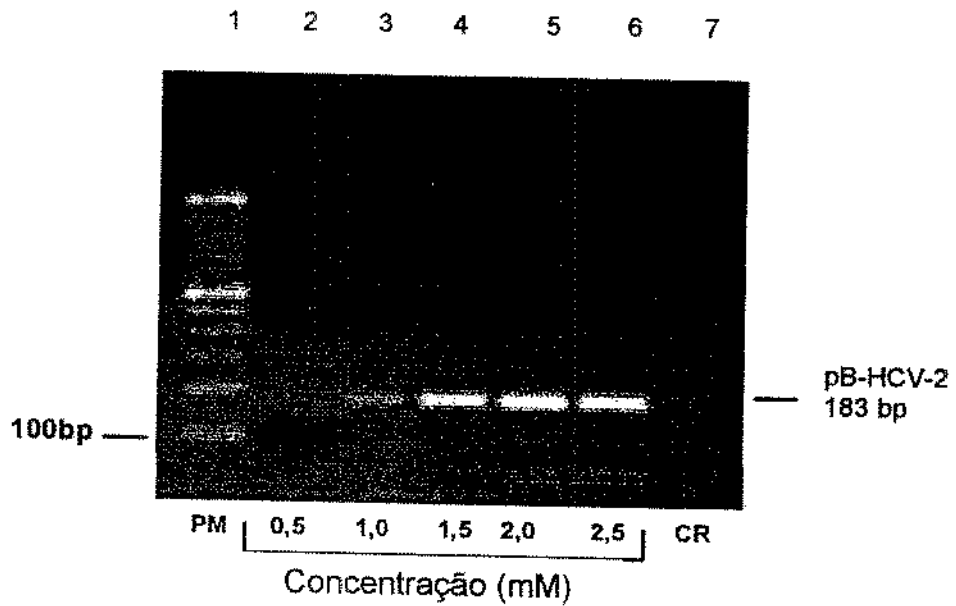


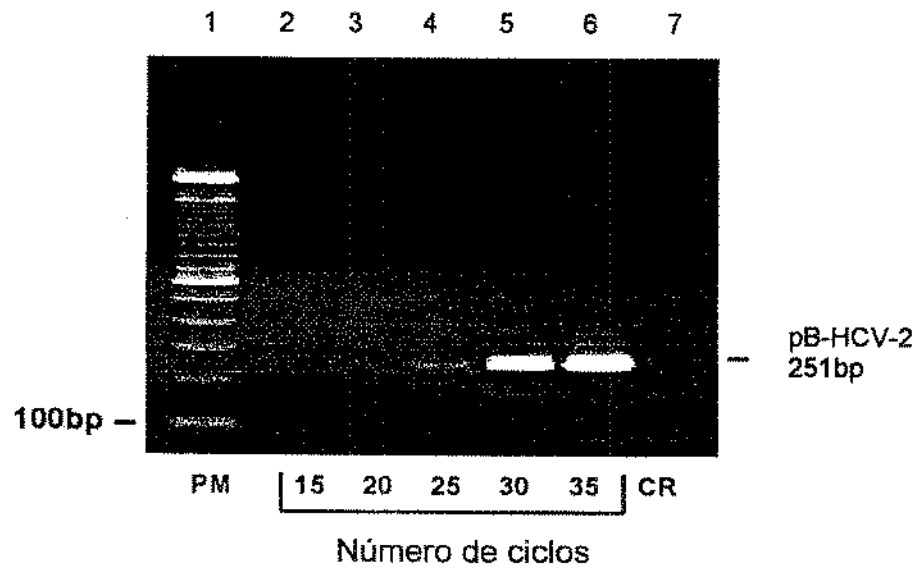
Figura 8 – Fotografia do gel da eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de amplificação do pB-HCV-2 utilizando diferentes concentrações de cloreto de magnésio. Painel A *primers* externos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp; Linhas 2 a 6: concentrações de $MgCl_2$ 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM, respectivamente e Linha 7: Controle de Reagente. Painel B *primers* internos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp; Linhas 2 a 6: concentração de $MgCl_2$ 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM respectivamente e Linha 7: Controle de Reagentes.

No caso dos *primers* internos, a intensidade máxima do produtos amplificado foi obtida com 35 ciclos e a mínima com 30 ciclos (Figura 9, painel B, linhas 5 e 6, respectivamente). A escolha nesse caso foi de 35 ciclos visando obter maior quantidade de fragmentos amplificado na reação de *nested-PCR* em tubo único (Figura 9, painel B, linha 6).

6.4.4. Determinação da concentração dos *primers* externos e internos

Na figura 10 (painéis A e B), verificam-se os resultados obtidos nas reações da PCR individuais para a avaliação das concentrações dos *primers* externos e internos na reação da PCR utilizando-se pB-HCV-2, no intervalo de 50 a 500 nM. Pudemos observar o decréscimo na intensidade das bandas à medida que menores concentrações dos *primers* foram utilizadas (Figura 10, painéis A e B). Para os *primers* externos houve amplificação em toda a faixa estudada (Figura 10, painel A, linhas de 2 a 7), sendo que a concentração de trabalho foi selecionada após testes posteriores para obtenção de um produto único na reação e *nested-PCR* em tubo único. A concentração dos *primers* internos escolhida foi de 200 nM (Figura 10, painel B, linha 5) para garantir que a concentração desses *primers* não se tornasse fator limitante na reação da PCR.

A)



B)

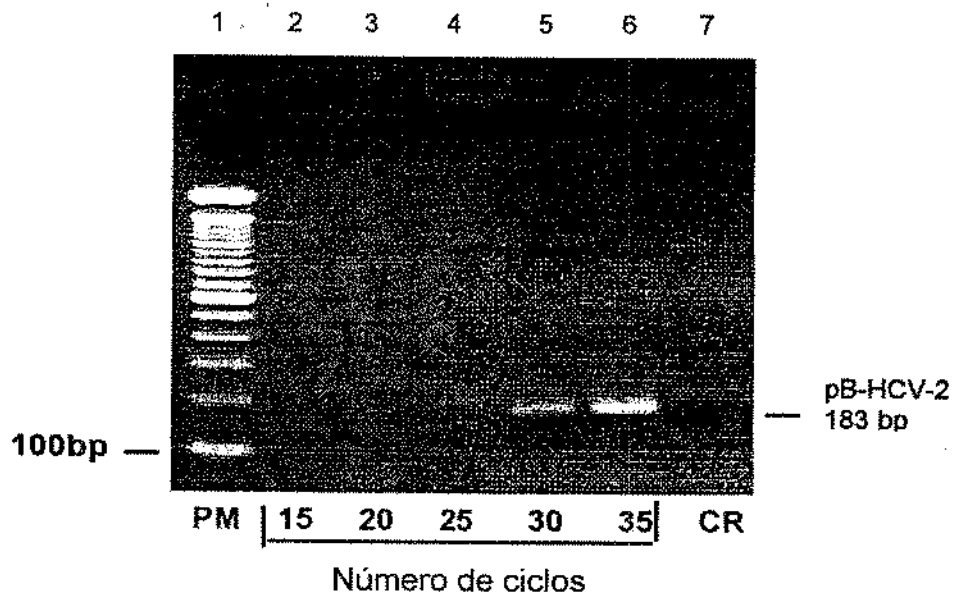
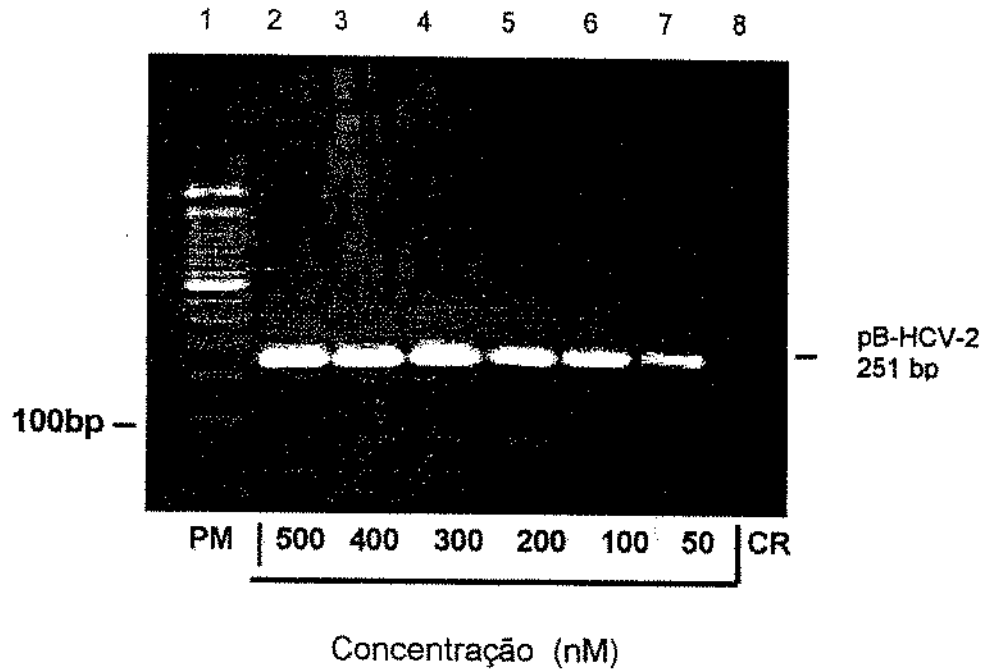


Figura 9 - Fotografia do gel da eletroforese em agarose a 1,5% do produtos de amplificação do pB-HCV-2 utilizando diferentes números de ciclos na reação da PCR individual. Painel A: *primers* externos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; Linhas 2 a 6: 15, 20, 25, 30, 35 ciclos, respectivamente; Linha 8 - Controle de reagentes. Painel B: *primers* internos. Linha 1; Marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; Linhas 2 a 6: 15, 20, 25, 30, 35 ciclos, respectivamente; Linha 8 - Controle de reagentes.

A)



B)

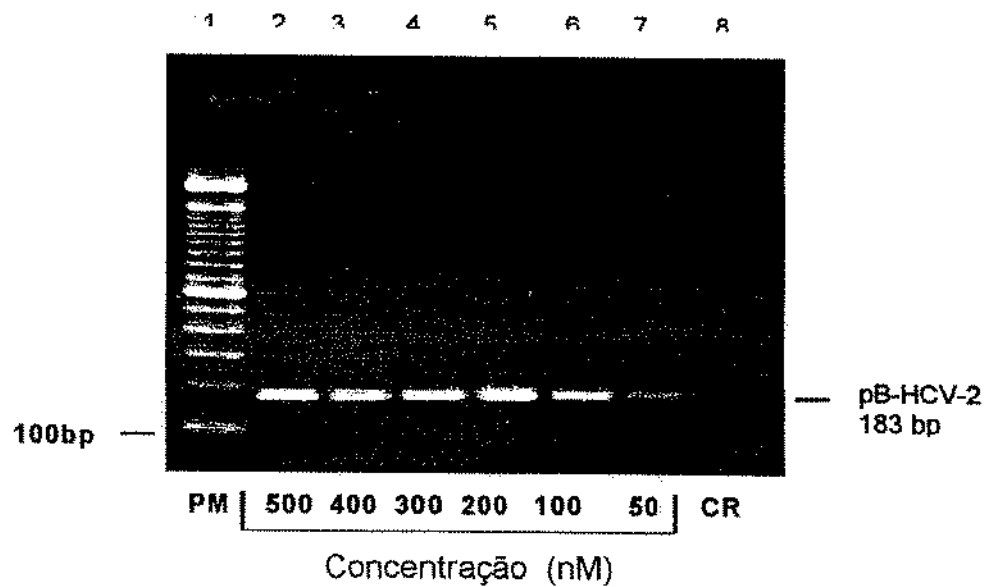


Figura 10 - Fotografia do gel da eletroforese em agarose a 1,5% do produto de amplificação do pB-HCV-2 utilizando diferentes concentrações de *primers* na reação da PCR individual. Painel A: *primers* externos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp; Linhas 2 a 6: 500, 400, 300, 200, 100 e 50 nM, respectivamente; Linha 7: Controle de reagentes. Painel B: *primers* internos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp; Linhas 2 a 6: 500, 400, 300, 200, 100 e 50 nM, respectivamente; Linha 7: Controle de reagentes.

6.4.5. Determinação da concentração dos *primers* externos na *nested-PCR* em tubo único.

Na figura 11 (linhas 2 a 8) observam-se os resultados obtidos quando da avaliação das concentrações de 2,5 nM a 200 nM dos *primers* externos. O emprego de concentração de 2,5 nM a 5 nM (Figura 11, linhas 7 e 8) possibilitou a amplificação de fragmentos único de 183 bp referente ao produto da *nested-PCR* em tubo único. Produto de amplificação de 251 bp foi observado quando usadas as concentrações de 50 nM a 200 nM (Figura 11, linhas 2 a 4). O acúmulo de produto amplificado de 251 bp foi devido a presença dos *primers* externos que não foram utilizados durante o primeiro ciclo de amplificação, atuando na cinética da segunda reação da PCR. A medida que concentrações inferiores foram avaliadas, observamos o aparecimento de fragmentos referentes amplificação dos *primers* externos, fragmentos de amplificação semi-*nested* e fragmentos de amplificação de *nested-PCR* (Figura 11, linhas 5 e 6). Na concentração de 25 nM observamos o aparecimento de fragmento de 251 bp, 211 bp (produto de amplificação semi-*nested* e 183 bp (produto de amplificação *nested*) (Figura 11 linha 5). Com o uso da concentração dos *primers* externos de 10 nM observamos a ausência do fragmento de 251 bp (Figura 11, linha 6). Portanto o valor escolhido foi de 5 nM, onde observamos a amplificação de um único fragmento.

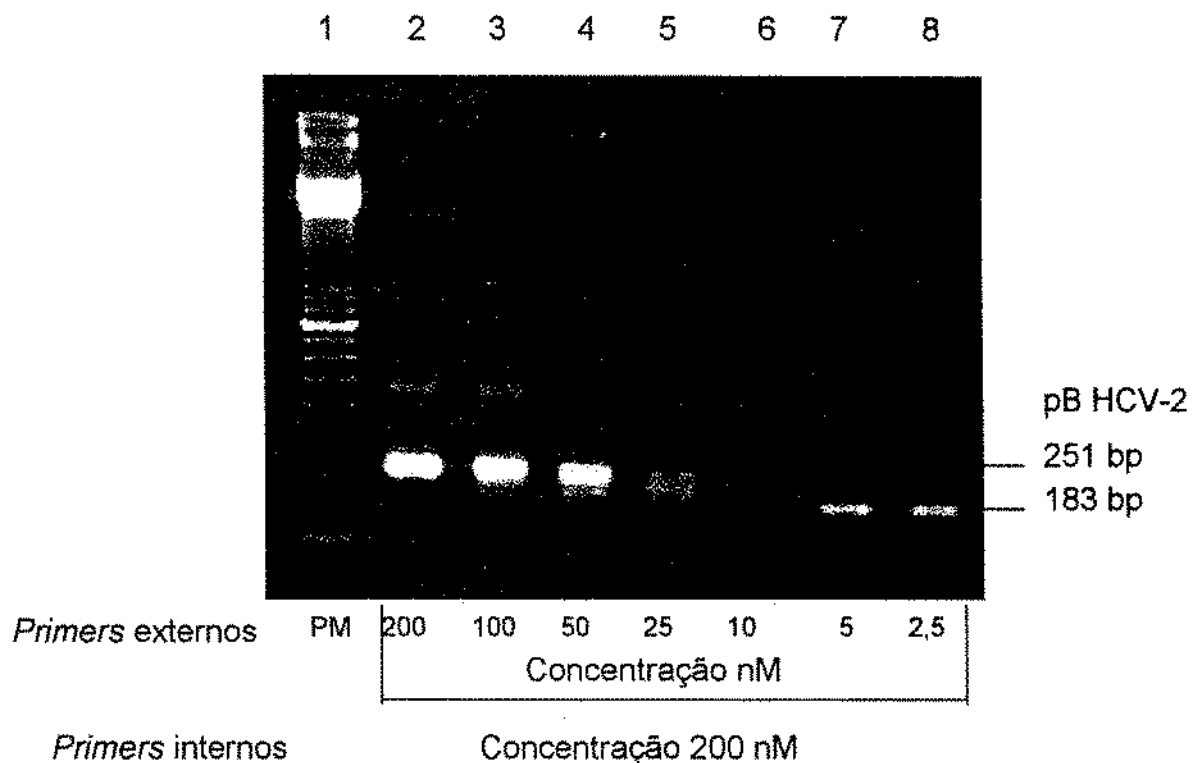


Figura 11 – Fotografia do gel da eletroforese em agarose 1,5% do produto amplificado do pB-HCV-2 na reação da *nested-PCR* em tubo único utilizando 200 nM dos *primers* internos e diferentes concentrações dos *primers* externos. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA 100 bp; Linhas 2 a 8: concentrações dos *primers* externos 200; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 nM.

6.5. Estabelecimento dos parâmetros a serem utilizados na *nested-PCR* em tubo único.

A tabela 1, sintetiza os parâmetros estabelecidos para a realização da *nested-PCR* em tubo único, obtendo-se fragmento único de amplificação. As temperaturas de hibridação foram de 72°C e 46°C para os *primers* externos e internos, respectivamente. A concentração de 2 mM de cloreto de magnésio foi adequada para ambos os grupos de *primers*. As concentrações de 5 nM e 200 nM dos *primers* externos e internos, respectivamente, foram

estabelecidas como ótimas para a reação da *nested-PCR* em tubo único. O número de ciclos determinado foi de 20 e 35 ciclos para a primeira e segunda etapa, respectivamente da *nested-PCR* em tubo único.

Tabela 1- Parâmetros estabelecidos para a realização da *nested-PCR* em tubo único.

Parâmetros avaliados	<i>Primers</i> externos	<i>Primers</i> internos
Temperatura	72°C	46°C
Concentração de MgCl ₂	2 mM	2 mM
Número de ciclos	20	35
Concentração de <i>primers</i>	5 nM	200 nM

6.6. Número de ciclos na *nested-PCR* em tubo único.

O acúmulo de fragmentos amplificados ao longo da reação da *nested-PCR* em tubo único utilizando pB-HCV-2, foi avaliado nos ciclos de 25 a 45 de amplificação na segunda etapa da *nested-PCR*. As bandas visíveis foram observadas após o vigésimo quinto ciclo (Figura 12, linha 3). As bandas com intensidades semelhantes foram obtidas na faixa que variou de 35 a 45 ciclos (Figura 12, linhas 5 a 7). O número de ciclos selecionados para a realização dos experimentos subsequentes foi de 35 ciclos de amplificações na etapa da *nested PCR*. Essa opção foi em decorrência da observação da presença de produto amplificado em quantidades semelhantes entre os 35 e 45 ciclos.

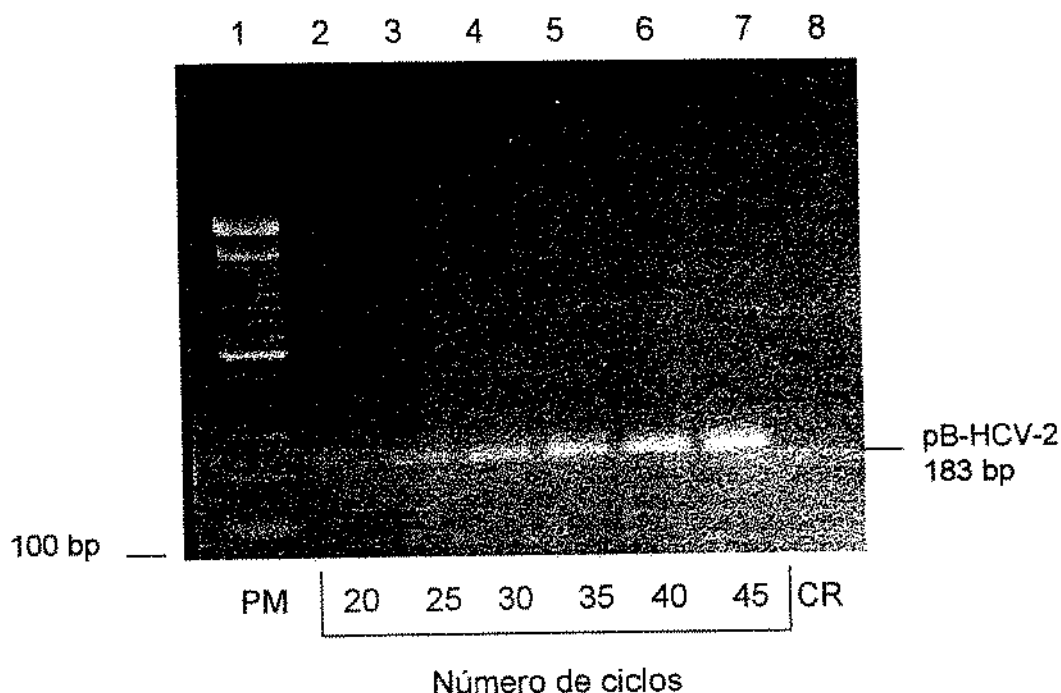


Figura 12 – Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto de amplificação do pB-HCV-2, utilizando diferentes números de ciclos na reação *nested-PCR* em tubo único. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; Linhas 2 a 7: Números de ciclos 20, 25, 30, 35, 40 e 45, respectivamente; Linha 8: Controle de reagentes.

6.7. TESTE DE SENSIBILIDADE

Os testes de sensibilidade para a detecção do RNA-HCV da *nested-PCR* em tubo único, bem como a da *nested-PCR* convencional foram realizados utilizando-se diferentes número de cópias do plasmídeo recombinante pB-HCV-2.

Uma sensibilidade de 9×10^2 cópias (Figura 13, linha 5) foi obtida usando a metodologia *nested-PCR* em tubo único desenvolvida no presente trabalho.

A sensibilidade de 10^4 cópias foi observada quando o produto de amplificação da primeira etapa da *nested*-PCR convencional foi analisado em gel de agarose a 1,5% (Figura 14, painel A, linha-4). Por outro lado, a detecção de 90 cópias foi observada quando foi analisado o produto de amplificação da segunda etapa da reação da *nested*-PCR convencional (Figura 14, painel B, linha 6).

Analisando os dados obtidos a partir dos testes de sensibilidade realizados, pudemos observar que a metodologia desenvolvida no presente estudo mostrou uma sensibilidade intermediária entre a PCR e a *nested*-PCR convencional .

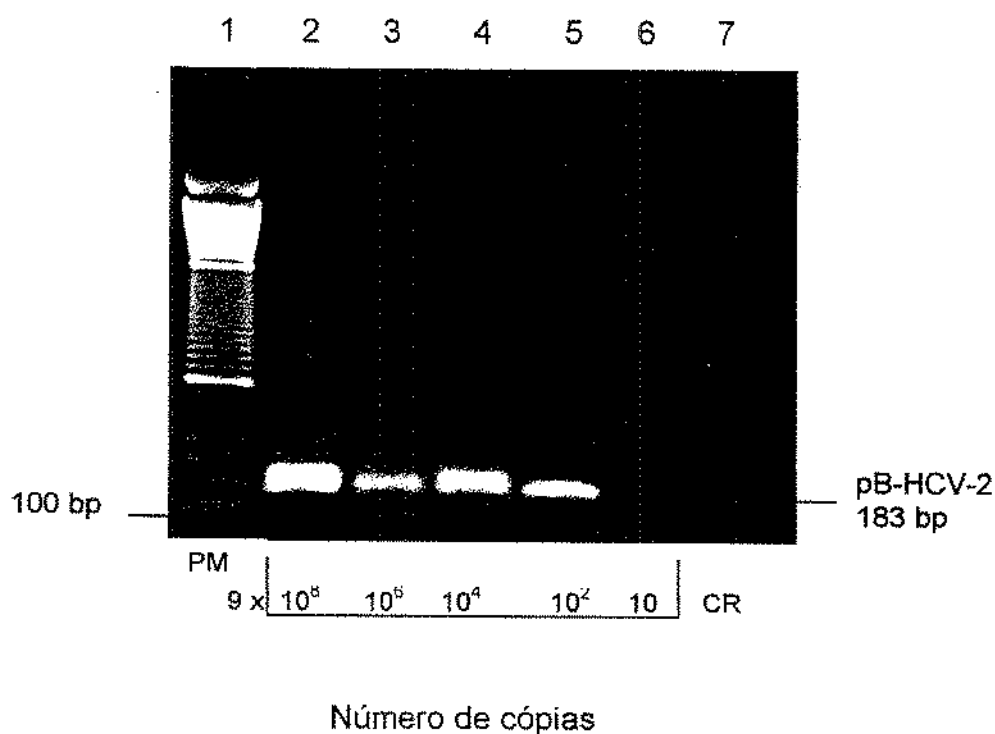


Figura 13 – Fotografia do gel da eletroforese em agarose 1,5% do produto amplificado de diferentes concentrações do pB-HCV-2. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA, Linhas 1 a 5: 9×10^8 ; 10^6 ; 10^4 ; 10^2 ; 10) cópias.

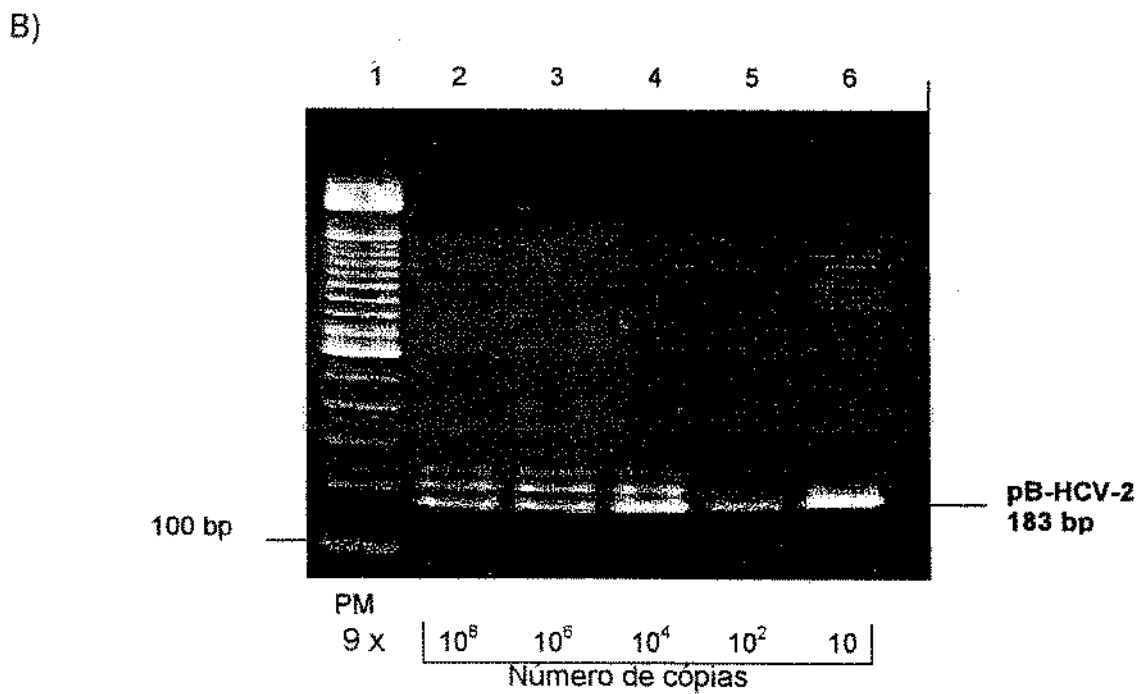
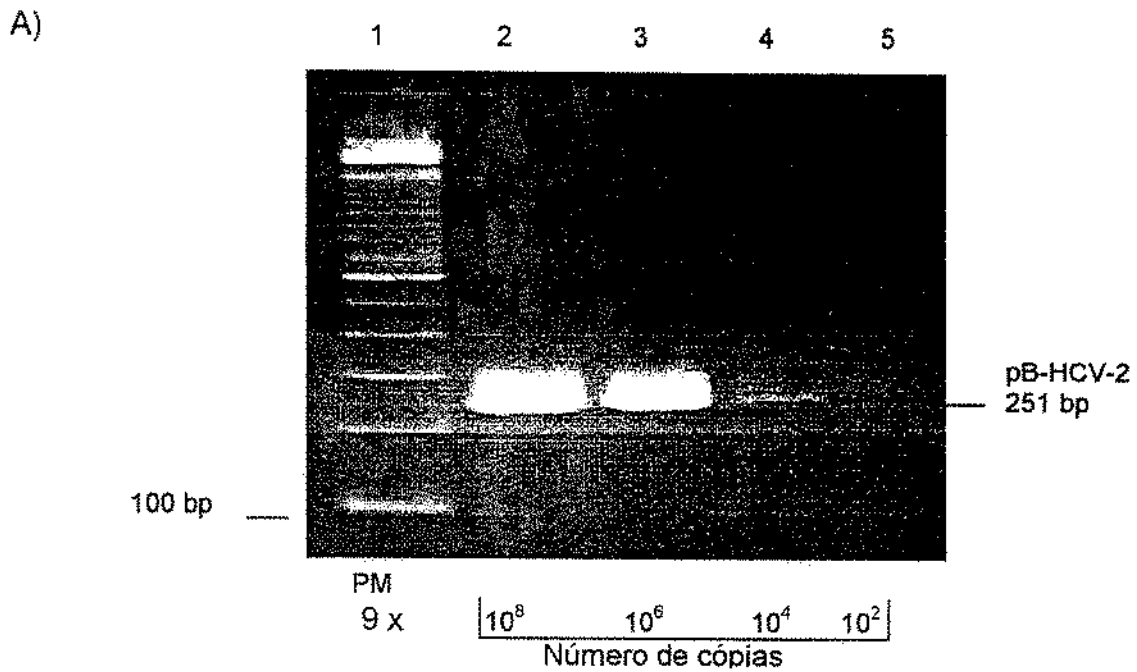


Figura 14 - Fotografia do gel da eletroforese em agarose 1,5% do produto amplificado de diferentes concentrações do pB-HCV-2. Painel A: Produto de amplificação da primeira etapa da PCR. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA 100 bp, Linha 2 a 5: 9 x (10^8 ; 10^6 ; 10^4 ; 10^2 ; 10) cópias. Painel B: Produto amplificado da *nested*-PCR convencional. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA, Linhas 2 a 6: 9 x (10^8 ; 10^6 ; 10^4 ; 10^2 ; 10) cópias

6.8. AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZANDO AMOSTRAS CLÍNICAS

6.8.1. Padronização da concentração dos *primers* externos para avaliação de amostras clínicas

A adição da síntese de cDNA em um tubo separado ao da reação de amplificação na detecção do RNA-HCV viral nas amostras clínicas, levou a uma nova avaliação da concentração dos *primers* externos. As concentrações testadas variaram de 10 nM a 100 nM, sendo a concentração dos *primers* internos mantidas em 200 nM (Figura 15). O produto de amplificação visível foi obtido com o uso da concentração de 100 nM de *primers* externos para a amplificação da amostra clínica (Figura 15; linha 5). As concentrações inferiores avaliadas não mostraram-se eficientes para promoverem amplificação (Figura 15, linhas 2 a 4).

A concentração de 100 nM foi escolhida para o processamento das amostras clínicas, bem como para a amplificação do plasmídeo, quando foi simultaneamente utilizados durante as reações de amplificação, uma vez que foi nessa concentração que se obteve uma amplificação adequada da região 5'-UTR do vírus em amostra clínica.

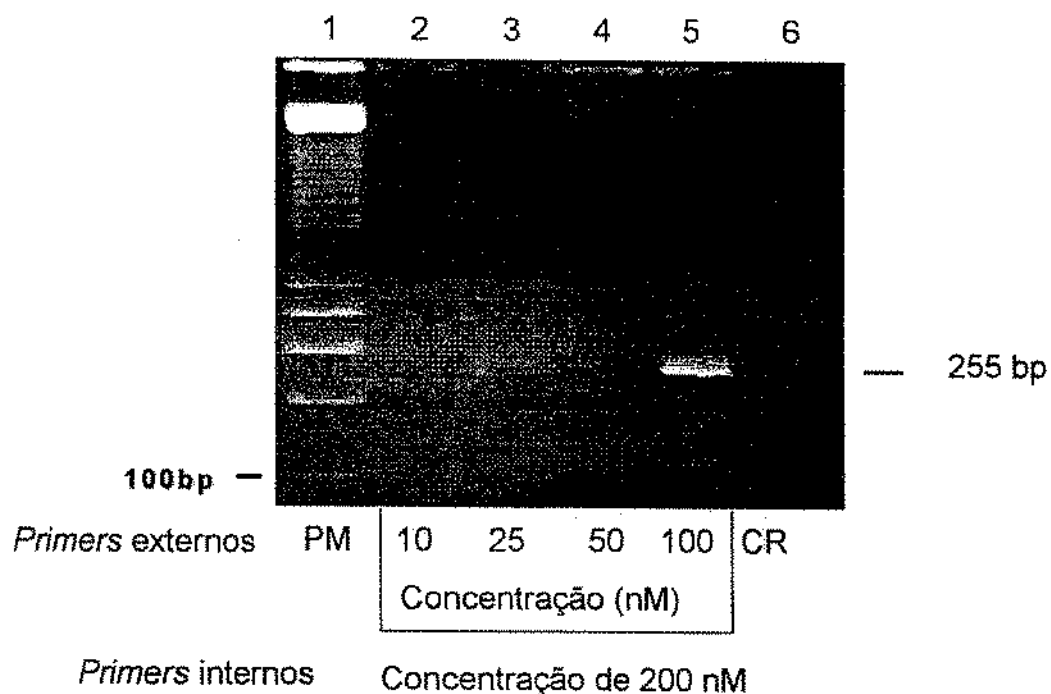


Figura 15- Fotografia do gel da eletroforese em agarose 1,5% do produto de amplificação de amostra clínica utilizando diferentes concentrações de *primers* externos na reação da PCR em tubo único. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA 100 bp; Linhas 2 a 4: concentrações de *primers* externos 10, 25, 50, 100 nM, respectivamente

6.8.2. Detecção do RNA-HCV em amostras clínicas

A metodologia desenvolvida no presente estudo foi avaliada investigando a presença do RNA-HCV em 10 amostras clínicas com testes sorológicos anti-HCV positivo pelos métodos de ELISA de terceira geração e o RIBA. As mesmas amostras foram avaliadas também com a metodologia da *nested-PCR* convencional, descrito por SHINDO, *et al.*, (1990) modificada como descrita no item 5.5..

Os resultados obtidos pela técnica da *nested*-PCR em tubo único, bem como da *nested*-PCR convencional podem ser observados na Figura 16, painéis A e B. Um produto amplificado de 255 bp foi visibilizado em todas as amostras clínicas avaliadas por ambos os métodos utilizados, indicando a presença do RNA-HCV. A concordância dos resultados obtidos, demonstram equivalência entre ambos os métodos na detecção do RNA-HCV em amostras clínicas.

A possibilidade de contaminação foi excluída, observando-se a ausência de produto amplificado quando todos os reagentes com exceção da adição da molécula alvo foram submetidos a reação de amplificação (Figura 16, painéis A e B, linha 12, em ambos).

A eficiência da reação da PCR foi avaliada com o uso do controle positivo (pB-HCV-2) - desenvolvido no presente estudo - amplificado em paralelo as amostras clínicas (Figura 16, painéis A e B, linha 13, em ambos).

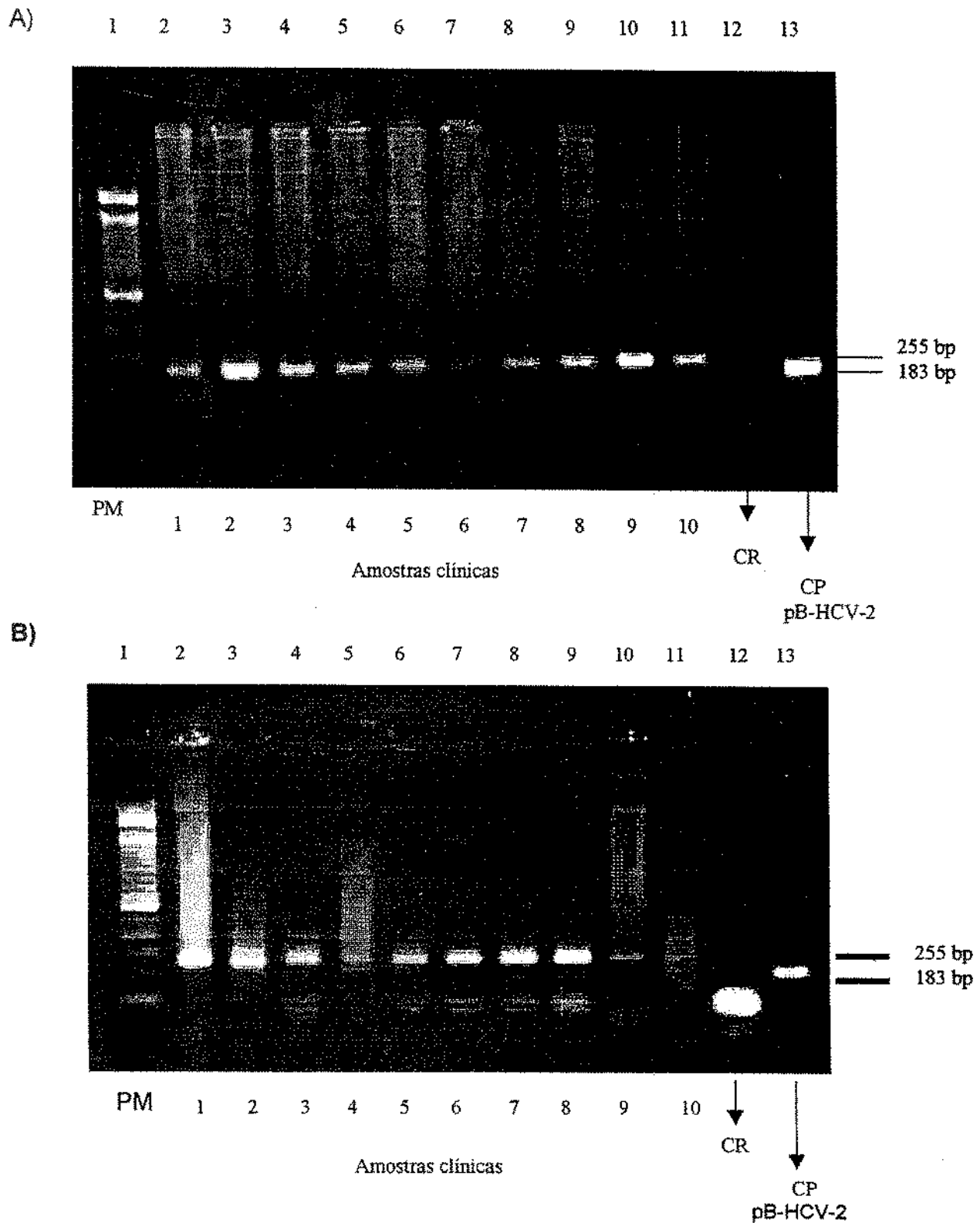


Figura 16 –Fotografia do gel da eletroforese em agarose a 1,5% dos produtos de amplificação das amostras clínicas. Painel A: *nested*-PCR em tubo único. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; Linha 2 a 11: diferentes amostras clínicas; Linha 12: controle de reagentes; Linha 13: pB-HCV-2. Painel B: *nested*-PCR convencional. Linha 1: Marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; Linha 2 a 11: Diferentes amostras clínicas; Linha 12: controle de

7. DISCUSSÃO

A técnica de *nested-PCR* por apresentar uma alta sensibilidade e especificidade pode ser utilizado no diagnóstico do RNA-HCV, cuja viremia é freqüentemente de baixo título (BRADLEY, 1985; FARCI *et al.*, 1991; BRILLANTI *et al.*, 1991). No entanto, a transferência de produtos previamente amplificados para a segunda reação de amplificação pode aumentar a probabilidade de contaminação, gerando resultados falso-positivos.

No presente trabalho, otimizou-se um método de *nested-PCR* em tubo único para a detecção do RNA-HCV em amostras clínicas. Embora já tenham sido descritas metodologias para a detecção do RNA-HCV com *nested-PCR* em etapa única (LIN *et al.*, 1992; TILSTON & CORBITT, 1995), nenhuma delas havia feito controle das etapas da reação. Um importante componente introduzido neste trabalho foi um controle bem caracterizado (plasmídeo recombinante) e obtido em quantidade suficiente para a otimização de todas as condições da PCR. Como discutido na literatura a estabilidade do RNA-HCV no soro ainda não está claramente definida. É importante salientar que o emprego de amostras biológicas positivas, podem apresentar variações nos resultados da PCR, pela dificuldade de se obter RNA-HCV em quantidade suficiente em uma única extração para a padronização de toda a metodologia. LIN *et al.* (1992) e TILSTON & CORBITT (1995) utilizaram amostras biológicas para a padronização da *nested-PCR* em tubo único. No trabalho de LIN *et al.* (1992), a transcrição reversa e primeira etapa de amplificação, foram realizadas em um único tubo usando *primers*

específicos para o HCV. Contudo, para a realização da etapa de *nested*, o tubo foi aberto e adicionado os reagentes da segunda etapa da PCR. Por outro lado, TILSTON & CORBITT (1995), evitaram esse problema, separando a síntese do cDNA da amplificação por *nested*-PCR pelo uso de uma interface de parafina no tubo utilizado. Outra diferença foi a utilização de *random-primers* para a síntese do cDNA. Entretanto, na avaliação eletroforética observou-se a presença de vários fragmentos amplificados, resultantes da interação entre os *primers* internos/externos, o que pode dificultar a interpretação dos resultados. No presente trabalho, a síntese do cDNA foi realizada separadamente, utilizando *primers* específicos para o HCV. A seguir, a amplificação por *nested*-PCR processou-se de forma contínua, sem a abertura do tubo entre a primeira e segunda etapa de amplificação, evitando-se a contaminação por meio de carregamento de moléculas pré-amplificadas, obtendo-se ao final da reação um único fragmento de amplificação o que facilita a interpretação dos dados (Fig. 15, painel A).

A estratégia empregada por nós para obter o controle recombinante foi a de alteração do tamanho do fragmento amplificado por remoção de 72 bp da seqüência interna usando a enzima de restrição *PpuM* I (Fig. 3), já descrita por outros autores (MANZINI *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 1994; RÜSTER *et al.*, 1995; GRETCH *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1996). O controle recombinante, assim obtido não requer o uso de enzima de restrição após a amplificação do fragmento, como ocorre no método de mutagênese sítio-dirigido

para a interpretação do resultado final (SUGANO *et al.*, 1995; HAGIWARA *et al.*, 1993a; KATO *et al.*, 1993), minimizando o tempo de ensaio e custo da reação.

O uso de controle recombinante, tem sido amplamente aceito pela comunidade científica, para monitorar o preparo de amostras e extração do ácido nucléico, avaliar a eficiência intra-ensaio da PCR, avaliar a reatividade dos reagentes e na quantificação de ácido nucléico (ZIMMERMANN & MANNHALTER, 1996; MIYACHI *et al.*, 1998; KOLK *et al.*, 1994), considerando que, variações mínimas que venham a ocorrer durante a reação da PCR são significativamente aumentadas no processo gerando grande variabilidade nos resultados.

Recentemente, MIYACHI *et al.* (1998), mostraram a importância do uso do controle interno recombinante no monitoramento de resultados falso-negativos na detecção do RNA-HCV. Os dados descritos nesse trabalho indicam que a presença de inibidores da PCR, como a heparina e a hemoglobina, podem gerar resultados falso-negativos, que podem ser comprovados pela ausência de amplificação do controle, quando presente na amostra clínica antes da extração. O controle desenvolvido neste trabalho, também possibilita sua aplicação no monitoramento da extração do ácido nucléico, por evitar a formação de heteroduplex entre os fragmentos amplificados do controle interno recombinante e da amostra alvo, quando empregado em PCR competitivo para detecção do RNA-HCV (HAGIWARA *et al.*, 1993).

Vários fatores podem modificar a especificidade e sensibilidade da técnica da PCR para a detecção do HCV-RNA. Dentre eles, podemos salientar

a localização, temperatura de hibridação e concentração dos *primers*, concentração do cloreto de magnésio e número de ciclos (INNIS & GELFAND, 1990; OKAMOTO *et al.*, 1990).

A região 5'-UTR tem sido indicada como a região mais adequada para a amplificação do RNA-HCV, por apresentar uma alta homologia (98% a 100%) entre os diferentes tipos do HCV (OKAMOTO *et al.*, 1990; WEINER *et al.*, 1991). Em concordância com essas informações, nós utilizamos grupos de *primers* complementares à região 5'-UTR do genoma viral descrito previamente por OKAMOTO *et al.* (1990), visando obter melhor sensibilidade do método e detecção de diferentes genótipos do HCV.

A otimização da *nested*-PCR em tubo único desenvolvida no presente estudo para a detecção do RNA-HCV, utilizou a estratégia *drop-in-drop-out* descrita previamente por ERLICH *et al.* (1991), que envolveu alterações na seqüência dos *primers* externos e internos, com o objetivo de evitar a amplificação simultânea de ambos os grupos de *primers* na primeira etapa da reação, bem como a otimização de diferentes parâmetros que afetam a especificidade e sensibilidade da técnica da PCR, sendo avaliados em reações da PCR individuais (Fig. 4) para posteriormente serem agrupados em um único tubo.

As alterações realizadas na seqüência dos *primers* externos, visando aumentar a temperatura de desnaturação, incluíram a adição de bases na extremidade 3' de ambos os *primers* (*sense* e *antisense*) presentes no próprio genoma do vírus da hepatite C. Diferente da estratégia descrita por ERLICH *et al.*

(1991), onde propõem a adição de uma seqüência de GC (*GC Clamp*) na extremidade 5' linha dos *primers* externos, para obter a elevação da temperatura de desnaturação dos *primers*, no presente trabalho utilizamos a própria seqüência do genoma do HCV, visando manter a especificidade dos *primers*. A diminuição da temperatura de desnaturação dos *primers* internos foi alcançada removendo-se bases das extremidades 5' e 3' de ambos os *primers* (*sense* e *antisense*).

Nos trabalhos de LIN *et al.* (1992) e TILSTON & CORBITT (1995), a região 5'-UTR foi utilizada para a detecção do RNA-HCV, contudo os grupos de *primers* foram complementares a outras seqüências dessa região. No trabalho de LIN *et al.* (1992), a interação entre os *primers* foi evitada limitando a concentração dos *primers* externos na primeira reação. Por outro lado, TILSTON & CORBITT (1995) utilizou *primers* ricos em bases CG, presente no próprio genoma do HCV, com isso obteve diferença nas temperaturas de desnaturação entre os *primers* externos e internos, evitando a amplificação simultânea dos *primers* na primeira etapa da reação.

A temperatura de hibridação dos *primers* foi determinante na otimização da reação no presente trabalho, além de visar a especificidade da reação de amplificação, também possibilitou a atuação dos *primers* isoladamente na *nested-PCR* em tubo único. Uma maior porcentagem de seqüências de bases CG, na constituição dos *primers* externos, conferiu temperaturas de desnaturação elevadas (74°C e 80°C *primers sense* e *antisense*, respectivamente), possibilitando a formação de produtos de amplificação quando temperaturas de 72°C a 76°C foram utilizadas (Fig.7, painel A, linhas 2 a 4). A presença de uma

porcentagem maior de bases A e T presentes na constituição dos *primers* internos, reduziu a temperatura de desnaturação (48°C e 50°C para os *primers* sense e antisense, respectivamente) e favoreceram ampliações com temperatura de hibridação, variando de 44°C a 48°C (Fig. 7, painel B, linhas 2 a 4). A temperatura de escolha para hibridação dos *primers* externos utilizada para o desenvolvimento da *nested-PCR* em etapa única foi de 72°C (Tabela 1), que minimizou em uma única etapa a hibridação e polimerização, considerando que a temperatura de 72°C é recomendada para máxima atividade da Taq polimerase. A temperatura de hibridação ideal para os *primers* internos foi de 46°C (Tabela 1). O emprego de temperaturas bem distintas entre as reações (primeira e segunda etapa) possibilitaram a hibridação dos *primers* de forma independente na *nested-PCR*, e a elevada temperatura de hibridação para os *primers* externos (72°C) possibilitou aumentar a especificidade da reação. Segundo INNIS & GELFAND (1990), temperaturas de hibridação estridentes aumentam a especificidade da PCR, impedindo a hibridação incorreta dos *primers*, bem como reduzindo a incorporação incorreta de nucleotídeos na extremidade 3' dos mesmos.

A concentração de MgCl₂ na PCR pode afetar a hibridação dos *primers*, temperatura de dissociação das fitas, formação de artefatos (*primer-dimers*), atividade e fidelidade da enzima DNA polimerase (INNIS & GELFAND, 1990). Pela importância deste componente na reação avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de MgCl₂, na eficiência da amplificação. Pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 2 mM e 2,5 mM de MgCl₂ para ambos os grupos de *primers* (Fig 8, painéis A e B,

linhas, 5 e 6). A concentração de escolha de $MgCl_2$ foi de 2 mM (Tabela 1), onde se observa a formação de um fragmento único, assegurando a especificidade da *nested*-PCR em tubo único. Essa concentração de cloreto de magnésio é considerada ideal também por outros autores (INNIS & GELFAND, 1990).

O estabelecimento do número de ciclos evita amplificação de produtos inespecíficos, que pode ocorrer quando o número é excessivo, por outro lado, o uso de um número reduzido de ciclos pode resultar na obtenção de uma baixa quantidade de produto amplificado (INNIS & GELFAND, 1990). Na presente proposta, esse aspecto também foi considerado, tanto para os *primers* externos como internos (Fig. 9, painéis A e B). Os melhores resultados foram obtidos com 35 ciclos para ambos os grupos de *primers*, onde observou-se resultados eficientes e reprodutíveis (Fig. 9, painéis A e B, linhas 6, respectivamente). Verificou-se que quando um reduzido número de ciclos (20) foi utilizado, não se observou produto amplificado no gel de agarose (Fig. 9, painel A linha 3), o que foi determinado para a amplificação da primeira etapa da PCR, visando sem dúvida, a obtenção de um fragmento único na reação de *nested*-PCR em tubo único. Contudo, não limitando a sensibilidade do processo uma vez que após 20 ciclos temos aproximadamente 2×10^5 cópias (WATSON *et al.*, 1992). O emprego de 35 ciclos na segunda etapa de amplificação foi escolhido visando obter a adequação da sensibilidade.

A influência da concentração dos *primers* externos e internos na eficiência da PCR também foram investigadas (Fig. 10, painéis A e B). Quando os *primers* foram avaliados individualmente, observou-se amplificação eficiente entre

as concentrações de 100 nM a 500 nM (Fig. 10, painéis A e B, linhas 2 a 6), coincidentes com a literatura (INNIS & GELFAND, 1990).

Estabeleceu-se a concentração de 200 nM de *primers* internos (Fig. 10, painel B, linha 5) evitando-se a formação de produtos inespecíficos, como *primer-dimers*, que podem competir pela enzima, dNTP, e *primers*, resultando em baixa eficiência da PCR (INNIS & GELFAND, 1990). Quanto aos *primers* externos estabeleceu a concentração de 5 nM por favorecer a obtenção de um único fragmento durante a realização da *nested-PCR* em tubo único (Fig. 11, linha 7). Esses dados são diferentes dos obtidos por TILSTON & CORBITT (1995), utilizando *nested-PCR* em etapa única, que mostraram além do fragmento de interesse, fragmentos intermediários. Segundo esses autores, esses resultados são decorrentes do uso de concentrações elevadas de *primers* e elevado número de ciclos (70 ciclos), necessários para a manutenção da sensibilidade do teste.

No presente estudo, o número de ciclos utilizados foi menor (55 ciclos) obtendo-se um único fragmento de amplificação, características que facilitam a interpretação dos resultados. A sensibilidade obtida neste trabalho foi de 900 cópias (Fig. 13, linha 5). Considerando que TILSTON & CORBITT (1995) avaliaram a sensibilidade por meio de diluições seriadas de amostras clínicas, não foi possível comparar com os dados obtidos no presente trabalho, devido a diferença de metodologia utilizada para avaliar a sensibilidade.

O limite de detecção obtido no presente trabalho foi similar ao obtido pelo método quantitativo da Roche Amplicor HCV Monitor (LUNEL *et al.*,

1999). Embora essa sensibilidade seja menor que a encontrada na *nested*-PCR convencional, cujo limite de detecção foi de 90 cópias (Fig.14, linha 6), ao comparar os resultados obtidos da amplificação do RNA-HCV pelas técnicas de *nested*-PCR em tubo único e *nested*-PCR convencional, pudemos observar uma concordância nos resultados das amostras clínicas pesquisadas (Fig.16). Esses resultados indicam que a metodologia proposta no presente estudo pode ser empregada na detecção do RNA-HCV com segurança, uma vez que na maioria dos casos a faixa de variação dos níveis virêmicos dos pacientes infectados por HCV apresenta-se entre 10^3 a 10^8 cópias/mL, com um valor modal de 10^6 cópias (BRILLANT, 1991; FARCI et al., 1991).

A metodologia proposta permite a detecção do RNA-HCV minimizando as possibilidades de resultados falso-negativos ou falso-positivos, mostrando uma capacidade de detecção compatível com os sistemas de amplificação utilizados para a detecção do HCV. Acreditamos que esse método, por minimizar as possibilidades de contaminação inerentes a reação de *nested*-PCR, possa ser empregado para o diagnóstico rotineiro da Hepatite C, tanto para a triagem do RNA-HCV em grandes números de amostras, como nos Bancos de Sangue. Além da possibilidade de avaliação da resposta ao monitoramento do tratamento de pacientes com Hepatite C, a inserção de um controle assegura a qualidade do ensaio em todas as etapas possibilitando portanto a automação do sistema, que é desejável, para a utilização em laboratórios de grande porte.

8. CONCLUSÕES

1) O controle positivo possibilitou monitorar todas as etapas de padronização da reação da *nested*-PCR em tubo único de forma eficiente, bem como a reação de detecção do RNA-HCV.

2) A *nested*-PCR em tubo único foi adequada na detecção do RNA-HCV com resultados satisfatórios para as amostras clínicas reduzindo-se a contaminação e o tempo de execução.

3) A metodologia desenvolvida no presente estudo mostra-se um método alternativo para detecção do RNA-HCV em bancos de sangue e para grande quantidades de amostras clínicas, possibilitando automação.

4) Aplicável em estudos epidemiológicos

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS*

- AACH, R.D., STEVENS, C.E., HOLLINGER, F.B., MOSLEY, J.W., PETERSON, D.A., TAYLOR, P.E., JOHNSON, R.G., BARBOSA, L.H.L., NEMO, G.J. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis: an analysis with first and second generation assays. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.325, n.19, p.1325-1329, 1991.
- ABE, K., INCHAUSPE, G. Transmission of hepatitis C by saliva. **Lancet**, London, v.337, p.248, 1991. [Letter].
- ALBERTI, A. Diagnosis of hepatitis C facts and perspectives. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.12, p.279-282, 1991.
- ALTER, H., TEGTMEIER, G., JETT, B., QUAN, S., SHIH, J., BAYER, W., POLITO, A. The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors, and random donors. **Transfusion**, v.31, p.771-776, 1991.
- ALTER, H. New kit on the block: evaluation of second generation assay for detection of antibody to the hepatitis C virus. **Hepatology**, St. Louis, v.15 p.350-353, 1992.
- ALTER, H.J., PURCELL, R.H., SHIH, J.W., MELPOLDER, J.C., HOUGHTON, M., CHOO, Q.L., KUO, G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.321, p.1494-1500, 1989.
- ALTER, M. J., HADLER, S.C., JUDSON, F.N. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. **JAMA, J. AM. MED. ASSOC.**, Chicago, v.264, p.231-2235, 1990
- ALTER, M.J. Transmission of hepatitis C virus route, dose and titer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.330, p.784-786, 1994. [Editorial].
- ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C in the west. **Semin. Liver Dis.**, New York, v.15, n.1, p.5-14, 1995.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Norma NBR 6023/89.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1997.

- BARRERA, J., FRANCIS, B., ERCILLA, G., NELLES, M., ACHORD, D., DAMER, J., LEE, S.R. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. **Vox Sang.**, Barcelona, v.68, p.15-18, 1995.
- BASSIT, L., VANDERBORGHT, B., DORLHIAC-LIACER, P.E., CHAMONE, A.A.F., SAÉS-ALQUÉSAR, A. Anti-HCV, cPCr positivity and HCV subtypes among screening positive blood donors from São Paulo, Brazil. **Transfusion**, Bethesda, v.34, p.S151A, 1994.
- BATTS, K.P. Hepatitis G: a virus in search of a disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.108, n.6, p.616-618, 1997.
- BELL, H., HELLUM, K., HARTHUG, S., MAELAND, A., RITLAND, S., MYRVANG, B., VON DER LIPPE, B., RAKNERUD, N., SKAUG, K., GUTIGARD, B.G., SKJAERVEN, R., PRESCOTT, L.E., SIMMONDS, P. Genotype, virus load and age as independent predictors of treatment in patients with chronic hepatitis C. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v.29, n.1, p.17-22, 1997.
- BENNETT, W.G., PAUKER, S.G., DAVIS, G.L., WONG, J.B. Modeling therapeutic benefit in the midst of uncertainty: therapy for hepatitis C. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 41, n.12, p.56S-62S, 1996.
- BODENHEIMER Jr., H.C., LINDSAY, K.L., DAVIS, G.L., LEWIS, J.H., THUNG, S.N., SCIEFF, L.B. Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. **Hepatology**, St. Louis, v.26, n.2, p.473-477, 1997. [Resumo].
- BRACONIER, J.H., PAULSEN, O., ENGAMAN, K., WIDELL, A. Combined alpha-interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C: a pilot study. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v.27, p.325-329, 1995.
- BRADLEY, D.W., McCAUSTLAND, K.A., COOK, E.H. SCHABLE, C.A., EBERT, J.W., MAYNARD, J.E. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. **Gastroenterology**, New York, v.88, p.773-779, 1985.
- BRÉCHOT, C. Hepatitis C virus: molecular biology and genetic viability. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v.41, n.12, p.6S-21S, 1996.
- BRILLANT, S., GARSON, J.A., TUKE, P.W., RING, C., BRIGGS, M., MASCI, C., MIGLIOLI, M., BARBARA, L., TEDDER, R.S. Effect of α -interferon therapy on hepatitis C viraemia in community-acquired chronic non-A, non-B hepatitis: A quantitative polymerase chain reaction study. **J. Med. Virol.**, New York, v.34, p.136-141, 1991.

- BRILLANT, S., GARSON, J., FOLI, M., WHITBY, K., DEAVILLE, R., MASCI, C., MIGLIOLI, M., BARBARA, L. A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, New York, v.107, p.912-917, 1994.
- BUKH, J., PURCELL, R.H., MILLER, R. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.89, p.187-191, 1992.
- BUKH, J. MILLER, R.H., PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin. Liver Dis.**, New York, v.15, n.1, p.41-63, 1995.
- CHAN, S-W., MCOMISH, F., HOLMES, E.C., DOW, B., PEUTHERER, J.F., FOLLETT, E., YAP, P.L., SIMMONDS, P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. **J. Gen. Virol.**, Colchester, v.73, p.1131-1141, 1992.
- CHAN, C.M., YUEN, K.Y., CHAN, K.S., YAM, W.C., YIM, K.H.M., NG, W.F., NG, M.H. Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. **J. Clin. Pathol.**, London, v.49, p.290-294, 1996.
- CHANG, A., HAVAS S., BORELINI, F., OSTROVE, J.M., BIRD, R.E. A rapid and simple procedure to detect the presence of MVM in conditioned cell fluids or culture media. - **Biologicals**, London, v.25, p.415-419, 1997.
- CHEMELLO, L., CAVALLETTO, D., PONTISSO, P., BORTOLOTTI, F., DONADA, C., DONADON, V., FREZZA, M., CASARIN, P., ALBERTI, A. Patterns of antibodies to hepatitis C virus in patients with chronic non-A, non-B hepatitis and their relationship to viral replication and liver disease. **Hepatology**, St. Louis, v.17, n.2, p.179-182, 1993.
- CHEMELLO, L., BONETTI, P., CAVALLETTO, L., TALATO, F., DONADON, V., CASARIN, P., BELUSSI, F., FREZZA, M., NOVENTA, F., PONTISSO, P. Randomized trial comparing three different regimens of alpha-2a-interferon in chronic hepatitis C. **Hepatology**, St. Louis, v.22, p.700-706, 1995.
- CHICHEPORTICHE, C., CANTALOUBE, J-F, BIAGINI, P., AUMONT P., DONNADIEU F., ESCHER J., LARABI F., ZEPITELLI J.P. Analysis of ELISA hepatitis C virus-positive blood donors population by polymerase chain reaction and recombinant immunoblot assay (RIBA). Comparison of second and third generation RIBA. **Acta Virol.**, Kent, v.37, p.123-131, 1993.

- CHOO, Q-L., KUO, G., WEINER, A.J., OVERBY, L.R., BRADLEY, D., HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, Washington, v.244, p.359-362, 1989.
- CHOO, Q.L., RICHMOND, K.H., HAN, J.H., BERGER, K., LEE, C., DOUG, C., GALLEGOS, C., COIT, D., MEDINA-SELBY, A., BARR, P.J., WEINER, A.J., BRADLEY, D.W., KUO, G., HOUGHTON, M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.88, p.2451-2455, 1991.
- CIMINO, G.D., METCHETTE, K.C., ISAACS, S.T., ZHU, Y.S. More false-positive problems. **Nature**, v.345, p.773-774, 1990a.
- CIMINO, G.D., METCHETTE, K.C., TESSMAN, J.W., HEARST, J.E., ISAACS, S.T. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p.99-107, 1990b.
- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y., HSU, L., Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.69, p.2110, 1972
- CRAWFORD, J.M. The liver and the biliary tract. In: COTRAN, R.S., KRUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. cap.19, p.845-901.
- CRAZI, A., DI MARCO, V., CAMMÀ, C., ALMASIO, P., MAGRIN, S. Duration of HCV infection as a predictor of nonresponse to interferon. In: Chronic HCV infection: Public Health Threat and Emerging Consensus. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 41, n.12, p 86S-92S, 1996.
- CRISTIANO, K., DI BISCEGLIE, A.M., HOOFNAGLE, J.H., FEINSTONE, S.M. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. **Hepatology**, St. Louis, v.14, n.1, p.51-55, 1991.
- CUYPERS, H.T.M., BRESTERS, D., WINKEL, I.N., REESINK, H.W., WEINER, A.J., HOUGHTON, M., VAN DER POEL, C.L., LELIE, P.N. Storage conditions of blood samples and primer selection affect the yield of cDNA polymerase chain reaction products of hepatitis C virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.12, p.3220-3223, 1992.
- DAMEN, M., ZAAIJER, H.L., CUYPERS, H.T.M., VRIELINK, H., VAN DER POEL, C.L., REESINK, H.W., LELIEL, P.N. Reliability of the third-generation recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. **Transfusion**, Bethesda, v.35, n.9, p.745-749, 1995.

- DAMEN, M., CUYPERS, H.T.M., ZAAIJER, H.L., REESINK, H.W., SCHAASBERG, W.P., GERLICH, W.H., NIESTERS, H.G.M., LELIE, P.N. International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J. Virol. Methods*, New York, v.58, p.175-185, 1996.
- DAMEN, M., SILLEKENS, P., SJERPS, M., MELSERT, R., FRANTZEN, I., REESINK, H.W., LELIE, P.N., CUYPERS, H.T.M. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. *J. Virol. Methods*, New York, v.72 p.175-184, 1998.
- DAVIS, G.L., BALART, L.A., SCHIFF, E.R., LINDSAY, K., BODENHEIMER Jr., H.C., PERRILLO, R.P., CAREY, W., JACOBSON, I.M., PAYNE, J., DIENSTAG, J.L. et al. Treatment of chronic C with recombinant interferon alpha: a multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.321, p.1501-1506, 1989.
- DAVIS, G.L., LAU, J.Y-N., URDEA, M.S., NEUWALD, P.D., WILBER, J.C., LINDSAY, K., PERRILLO, R.P., ALBRECHT, J. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology*, St. Louis, v.19, p.1337-1341, 1994.
- DI BISCEGLIE, A.M., MARTIN, P., KASSIANIDES, C., LISKER-MELMAN, M., MURRAY, L., WAGGONER, J., GOODMAN, Z., BANKS, S.M., HOOFNAGLE, J.H. Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.321, p.1506-1510, 1989.
- DI BISCEGLIE, A.M., GOODMAN, Z.D., ISHAK, K.G., HOOFNAGLE, J.H., MELPOLDER, J.J., ALTER, H.J. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology*, St. Louis, v.14, p.969-974, 1991.
- DI BISCEGLIE, A.M., SHINDO, M., FONG, T.L., FRIED, M.W., SWAIN, M.G., BERGASA, N.V., AXIOTIS, C.A., WSHHONRT, J.G., PARK, Y., HOOFNAGLE, J.H. A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*, St. Louis, v.16, n.3, p.649-54, 1992.
- DI DOMENICO, N., LINK, H., KNOBEL, R., CARATSCH, T., WESCHLER, W., LOEWY, Z.G., ROSENSTRAUS, M. COBAS amplicor TM: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR. *Clin. Chem.*, Washington, v.42, p. 1915-1923, 1996.
- DIENSTAG, J.L. Hepatitis non-A, non-B. C at last. *Gastroenterology*, St. Louis, v.99, p.1177-1180, 1990.

- DHILLON, A.P., DUSHEIKO, G.M. Pathology of hepatitis C virus infection. **Histopathology**, Oxford, v.26, p.297-309, 1995.
- DONAHUE, J.G., MUNOZ, A., NESS, P.M., BROWN JR., D.E., YAWN, D.H., MCALLISTER JR., H.A., REITZ, B.A., NELSON, K.E. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.327, p.369-373, 1992.
- DOUGLAS, D.D., RAKELA, J., LIN, H.J., HOLLINGER, F.B., TASWELL, H.F., CZAJA, A.J., GROSS, J.B., ANDERSON, M.L., PARENT, K., FLEMING, C.R., Randomized controlled trial of recombinant alpha-2a-interferon for chronic hepatitis C: comparasion of alanine aminotransferase normalization versus loss of HCV-RNA and anti-HCV IgM. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v.38, p.601-607, 1993.
- DUVOUX, C., PAWLOTSKY, J.M., BASTIE, A., CHERQUI, D., MÉTREAU, J.M., DUVAL, J., DHUMEAUX, D. HCV replication levels are low in end-stage HCV-related cirrhosis. **J. Hepatol.**, Amersterdam, v.23, n.1, p.110, 1995.
- EBELING, F., NAUKKARINEN, R., LEIKOLA, J. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as predictor of infectivity. **Lancet**, London, v.335, p.982-983, 1990.
- EBELING, F. Epidemiology of the hepatitis C virus. **Vox Sang.**, Basel, v.74, suppl.2, p.143-146, 1998.
- ENOMOTO, N., SATO, C., KUROSAKI, M., MARUMO, F. Hepatitis C virus after interferon treatment has the variation in the hypervariable region of envelope 2 gene. **J. Hepatol.**, Amersterdam, v.20, p.252-261, 1994.
- ENOMOTO, N., SAKUMA, I. ASAHINA, Y., KUROSAKI, M., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, C., IZUMI, N., MARUMO, F., SATO, C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b-sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5a region. **J. Clin. Invest.**, New York, v.96, p.224-230, 1995.
- ENOMOTO, N., SAKUMA, I., YASUHIRO, A., KUROSAKI, M., MURAKANIMI, T., YAMAMOTO, C., OGURA, Y., IZUMI, N., MARUMO, F., SATO, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.334, p.77-81, 1996.
- ERLICH, H.A., GELFAND, D., SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v.252, p.1643-1650, 1991.

- ESTEBAN, J.I., GONZÁLEZ, A., HERNÁNDEZ, J.M., VILADOMIU, L., SÁNCHEZ, C., LÓPEZ-TALAVERA, J.C., LUCEA, D., MARTIN-VEGA, C., VIDAL, X., ESTABAN, R., GUARDIA, J. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.323, p.1107-1112, 1990
- ESTEBAN, J.I., LOPEZ-TALAVERA, J.C., GENESCA, J., MADOZ, P., VILADOMIU, L., MUNIZ, E., MARTIN-VEJA, C., ROSELL, M., ALLENDE, H., VIDAL, X. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.115, p.443-449, 1991.
- EVANS, C., TOBLER, L., POLITO, A., STEWART, J., CHEIN, D., WILBER, J., QUAN, S.- Comparative evaluations of supplemental hepatitis C virus antibody test systems. **Transfusion**, Bethesda, v.32, p.408-414, 1992.
- FARCI, P., ALTER, H.J., WONG, D., MILLER, R.H., SHIH, J.W., JETT, B., PRUCELL, R.H. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.325, p.98-104, 1991.
- FEINMANN, S.V., BERRIS, B., HERST, R. Anti-HCV in post-transfusion hepatitis: deductions from a prospective study. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.12, p.377-381, 1991.
- FINGERHOOD, M.I., JSINNSKI, D.R., SULLIVANS, J.T. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.153, p.2025-2030, 1993.
- FONG, T-L., CHARBONEAU, F., VALINLUCK, B., GOVINDARAJAN, S. The stability of serum hepatitis C viral RNA in various handling and storage conditions. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.117, p.150-151, 1993.
- FOX, J.C., AIT-KHALED, M., WEBSTER, A., EMERY, V.C. Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? **J.Virol. Methods.**, New York, v.33, p.375-382, 1991.
- FURRER, B., CANDRIAN, U., WIELAND, P., LUTHY, J. Improving PCR efficiency. **Nature**, London, v.346, p.324, 1990.
- GANE, E., LO, S., PORTNAM, B, LAU, J., NAUMOW, N. WILLIAM, R. A randomized study of the safety and efficacy of ribavirin v.s. interferon monotherapy for recurrent HCV infection the liver transplant recipient. **Hepatology**, St. Louis, v.24, p.293A, 1996.
- GARSON, J., RING, C., TUKE, P., TEDDER, R.S. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet**, London, v.336, p.878-879, 1990a.

- GARSON, J.A, TEDDER, R.S., BRIGGS, M., TUKE, P., GLAZEBROOK, J.A., TRUTE, A., PARKER, D., BARBARA, J.A.J., CONTRERAS, M., ALOYSIUS, S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. **Lancet**, London, v.335, p.1419-1422, 1990b.
- GARSON, J.A., TEDDER, R.S. The detection of hepatitis C infection. **Med. Virol.**, New York, v.3, p.75-83, 1993.
- GARSON, J.A. Analysis of clinical and virological factors associated with response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. **J. Med. Virol.**, New York, v.45, p.348-353, 1995.
- GERBER, M. Relation of hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.17, suppl.3, p.S108-111, 1993.
- GERVAIN, A.P.J., Á GÓGL. Hepatitis C virus infection: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v.228, p.107-114, 1998.
- GISH, R.G., LAU, J.Y.N. Hepatitis C virus: eight years old. **Viral Hepatitis**, New York, v.3, n.1, p.17-37, 1997.
- GORDON, S.C., PATEL, A.H., KULESZA, G.W., BARNES, R.E., SILVERMAN, A.L. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. **Am J. Gastroenterol.**, New York, v.87, p.1849-1851, 1992.
- GRETCH, R., WILSON, J., CARTHERS Jr., R., DELA ROSA, C., HAN, J.H., COREY, L. Detection of hepatitis C virus RNA: comparison of one-stage polymerase chain reaction (PCR) with nested-set PCR. **J. Clin Microbiol.**, Washington, v.31, n.2, p.289-291, 1993.
- GRETCH, D., COREY, L., WILSON, J., DELA ROSA, C., WILSON, R., CARITHERS, JR., R., BUSCH, M., HART, J., SAYERS, M., HAN, J. - Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: High-titer viremia correlates with advanced stage of disease. **J. Inf. Diseases**, v. 169, p. 1219-1225, 1994.
- GRETCH, D.R. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. **Clin. Liver Dis.**, v.1, n.3, 1997.
- GUTENSOHN, K., KNODLER, B., ZELLER, W., KRUGER, W., ECKARDT, N., HOSSFELD, D.K., KUHN, P. Prevalence of hepatitis C virus in poly-transfused patients with hematologic and oncologic diseases. **Infusionsther. Transfusionsmed.**, Basel, v.19, n.1, p.19-22, 1992.

- HAGIWARA, H., HAYASHI, N., MITA, E., TAKEHARA, T., KASAHARA, A., FUSAMOTO, H., KAMADA, T. Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. **Gastroenterology**, St. Louis, v.104, p.77-883, 1993.
- HALFON, P., KHIRI, H., GEROLAMI, V., BOURLIERE, M., FERYN, J.M., REYNIER, P., GAUTHIER, A., CARTOUZOU, G. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.25, p.307-311 1996.
- HAN, J.H., SHYAMALA, V., RICHMAN, K.H., BRAUER, M.J., IRVINE, B., URDEA, M.S., TEKAMP-OLSON, P., KUO, G., CHOO, Q.L., HOUGHTON, M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C virus RNA: identification of conserved in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Washington, v.88, p.1711-1715, 1991.
- HAWKINS, A., DAVIDSON, F., SIMMONDS, P. Comparison of plasma virus load amongst individuals infected with hepatitis C virus genotypes 1,2 and 3 using Quantiplex HCV RNA assay versions 1 and 2, Roche Monitor and an in-house limiting dilution assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.187-192, 1997.
- HE, L.F., ALLING, D., POPKIN, T., SHAPIRO, M., ALTER, H.J., PURCELL, R.H. Determining the size of Non-A, Non-B: hepatitis virus by filtration. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.156, n.4, p.636-640, 1987.
- HEINTGES, T., WANDS, J.R. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. **Hepatology**, St. Louis, v.26, n.3, p.521-525, 1997.
- HINES, H.N. O'CONNOR, K.C., VELLA, G., WARREN, W. Large-scale purification of plasmid DNA by anion-exchange high-performance liquid chromatography. **Biotechniques**, Natick, v.12, n.3, p.430-434, 1992.
- HONDA, M., KANEKO, S., UNOURA, M., KOBAYASHI, K. MURAKAMI, S. Risk of hepatitis C virus infections through household contact with chronic carriers: analysis of nucleotide sequences. **Hepatology**, St. Louis, v.17, p.971-976, 1993.
- HODINKA, R.L. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. **Clin. Diagn. Virol.**, Amsterdam, v.10, p.25-47, 1998.
- HOPF, U., BERG, T., KÖNIG, V., KÜTHER, S., HEUFT, H.G., LOBECK, H. Treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: long-term follow-up and prognostic relevance of HCV genotypes. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.24, n.2, p.67-73, 1996.

- HOLLINGER, F.B., DREESMAN, G.R. Hepatitis viruses In: ROSE, N.R., ed. **Manual of clinical laboratory immunology**. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1997. p.702-718.
- HOOFNAGLE, J.H. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon: a preliminary report. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.315, p.1575-1578, 1986.
- HOOFNAGLE, J.H., DI BISCEGLIE, A.M., SHINDO, M. Antiviral therapy of hepatitis C: present and future. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.17, suppl.3, p.S130-136, 1993.
- HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. In: NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE ON MANAGEMENT OF HEPATITIS C., Bethesda, 1997. **Programs and Abstracts**. Bethesda: National Institutes of Health, 1997. p.19-22.
- HOUGHTON, M., WEINER, A., HAN, J., KUO, G., CHOO, Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, St. Louis, v.14, n.2, p.381-388, 1991.
- INNIS, M.A., GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. IN: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.3-12.
- INOUE, Y., MIYAMURA, T., UNAYMA, T., TAKAHASHI, E., SAITO, I. Maternal transfer of HCV. **Nature**, London, v.353, p.609, 1991.
- INOUE, Y., TAKEUCHI, K., CHOU, W-H., UNAYMA, T., TAKAHASHI, E., SAITO, I., MIYAMURA, T. Silent mother-to-child transmission of hepatitis C virus through two generations determined by comparative nucleotide sequence analysis of the viral cDNA. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.166, p.1425-1428, 1992.
- ISAACS, S.T., TESSAMN, J.W., METCHETTE, K.C., HEARST, J.E., CIMINO, G.D. Post-PCR sterilization: development and application to an HIV-1 diagnostic assay. **Nucleic Acids Res.**, London, v.19, n.1, p.109-116, 1990.
- KAKUMU, S., YOSHIOKA, K., WAKITA, T., ISHIKAWA, T., TAKAYANAGI, M., HIGASHI, Y. A pilot study of ribavirin and interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, St. Louis, v. 105, p.507-512, 1993.
- KAITO, M., WATANABE, S., TSUKIYAMA-KOHARA, K., YAMAGUCHI, K., KOBAYASHI, Y., KONISHI, M., YOKOI, M., ISHIDA, S., SUZUKI, S., KOHARA, M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. **J. Gen. Virol.**, Colchester, v.75, p.1755-1760, 1994.

- KANEKO, S., UNOURA, M., KOBAYASHI, K., KUNO, K., MURAKAMI, S., HATTORI, N. Detection of serum hepatitis C virus RNA. **Lancet**, London, v.335, p.976, 1990.
- KAO, J-H., LAI, M-Y., HWANG, Y-T., YANG, P-M., CHEN, P-J., SHEU, J-C., WANG, T-H., HSU, H.C., CHEN, D.S. Chronic hepatitis C without anti-hepatitis C antibodies by second-generation assay: a clinicopathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v.41, p.161-165, 1996.
- KATO, N., OOTSUYAMA, Y., SEIKIYA, H., OHKOSHI, S., NAKAZAWA, T., HIJIKATA, M., SHIMOTOHNO, K. Genetic drift in hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus infection. **J. Virol.**, Baltimore, v.68, p.4776-4784, 1994.
- KATO, N. YOKOSUKA, K., ITO, Y. OHTO, M., OMATA, M. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: increase of the virus in advanced liver disease. **Hepatology**, St. Louis, v.18, p. 16-20, 1993.
- KIYOSAWA, K., SODEYAMA, T., TANAKA, E., GIBO, Y., YOSHIZAWA, K., NAKANO, Y. non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. **Hepatology**, St. Louis, v.12, pt.4, p.671-675, 1990.
- KLETER, B., BROUWER, J.T., NEVENS, F., VAN DOORN, L-J., ELEWAUT, A., VERSIECK, J., MICHIENSEN, P.P., HAUTEKEETE, M.L.L., CHAMULEAU, R.A.F.M., BRÉNARD, R., BOURGEOIS, N., ALDLER, M., QUINT, W.G.V., BRONKHORST, C.M., HEIJTINK, R.A., HOP, W.J.C, FEVERY, J., SCHALM, S. Hepatitis C virus genotypes: epidemiological and clinical associations. **Liver**, Amsterdam, v.18, p.32-38, 1998.
- KO, Y.C., HO, M.S., CHIANG, T.A., CHANG, S.J., CHANG, P.Y. Tattooing as a risk of hepatitis C virus infection. **J. Med. Virol.**, New York, v.38, p.288-291, 1992.
- KOLK, A.H., NOORDHOEK, G., DE LEEUW, O., KUIJPER, S., VAN EMBDEN, D.A. - *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 5, p. 1354-1356, 1994.
- KRUG, L.P., LUNGE, V.R., IKUTA, N., FONSECA, A.S.K., CHEINQUER, H., OZAKI, L.S., BARROS, S.G.S. Hepatitis C virus genotypes in southern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1629-1632, 1996.

- KUMAR, U., THOMAS, H.C., MONJRDIONO, J. - Serum HCV RNA levels in chronic HCV hepatitis measured by quantitative PCR assay; correlation with serum AST., **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 47, p. 95-102, 1994.
- KUO, G., CHOO, Q.L., ALTER, H.J., GITNICK, G.L., REDECKER, A.S., PURCELL, R.H., MIYAMURA, T., DIENSTAG, J.L., ALTER, M.J., STEVENS, C.E., TEGTMEIER, G.E., BONINO, F., COLOMBO, M., LEE, W.S., JUO, C., BERGER, K., SHUSTER, J.R., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W., HOUGHTON, M. Assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, Washington, v.244, p.362-364, 1989
- KWOK, S., HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, London, v.339, p.237-238, 1989.
- LEE, A.S.G., OON, C.J., CHEE, M.K.L., SEO, Y.C. Quantitaiton of hepatitis C viremia by a competitive reverse transcription-polymerase chain reaction system. **Ann. Acad. Med.**, v.25, n.1, p.98-102, 1996.
- LIN, H. J., SHI, N., MIZOKAMI, M., HOLLINGER, F.B. Polymerase chain reaction assay hepatitis C virus RNA using a single tube for reverse transcription and serial rounds of amplification with nested primer pairs. **J. Med. Virol.**, New York, v.38, p.220-225, 1992.
- LINDSAY, K.L. Therapy of heptitis c: overview. In: NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE ON MANGEMENT OF HEPATITIS C., Bethesda, 1997. **Programs and Abstracts**. Bethesda: National Institutes of Health, 1997. p.75-78.
- LONGO, M.C., BERNINGER, M.S., HARLEY, J.L. Use of uracil DNA gycosylase to control carry-over contamination in poymerase chain reactions. **Gene**, Amsterdam, v.93, p.125-128, 1990.
- LUNEL, F., CRESTA, P., VITOUR, D., PAYAN, C., DUMONT, B., FRANGEUL, F., REBOUL, D., BRAULT, C., PIETTE, J-C., HURAU, J.M. Comparative study of conventional and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in-house PCR. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.54, p.159-171, 1995.
- LUNEL, F., CRESTA, P., VITOUR, D., PAYAN, C., DUMONT, B., FRANGEUL, L., REBOUL, D., BRAULT, C., PIETTE, J.C., MARIE, J., HURAU, J.M. Comparative evaluation of Hepatitis C virus RNA quantitaion by branched DNA, NASBA, and monitor assays. **Hepatology**, St. Louis, v.29, n.2, p.528-535, 1999.
- MAERTENS, G., STUYVER, L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: HARRISON, T.J., ZUCKERMAN, A. J., eds. **The molecular medicine of viral hepatitis**. London: John Wiley, 1997. cap. 13, p.183-233,1997.

- MANZINI, A., BAGNARELLI, P., MENZO, S., GIOSTRA, F., BRUGIA, M., FRANCESCONI, R., BIANCHI, F.B., CLEMENTI, M. Quantitation of hepatitis C virus genome molecules in plasma samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.8, p. 1939-1944, 1994.
- MARCELLIN, P., BOYER, N., GIOSTRA, E., DEGOTT, C., COUROUCE, A.M., DEGOS, F., COPPERE, H., CALES, P., COURIGOU, P., BENHAMOU, J.P. Recombinant human α -interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis: A multicenter randomized controlled trial from France. **Hepatology**, St. Louis, v.13, p.393-397, 1991.
- MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P., BRESTERS, D., VAN DRIMMELEN, A.A., ROOSENDAAL, G., CUYPERS, H.T., REESINK, H.W., VAN DER POEL, C.L., VAN DEN BERG, H.M., LELIE, P.N. Hepatitis C infection and viremia in Dutch hemophilia patients. **J. Med. Virol.**, New York, v.45, n.3, p.241-246, 1995.
- McHUTCHISON, J.G., PERSON, J.L., GOVINDARAJAN, S. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk population. **Hepatology**, St. Louis, v. 15, p. 19-25, 1992.
- McOMISH, F., YAP, P.L., DOW, B.C., FOLLETT, E.A.C., SEED, C., KELLER, A.J., COBAIN, T.J., DRUSIUS, T., KOLHO, E., NAUKKARINEN, R., LIN, C., LAI, C., LEONG, S., MEDGYSI, G.S., HÉJJAS, M., KIYOKAWA, H., FUKADA, K., CUYPERS, T., SAEED, A.A., AL-RASHEED, A.M., LIN, M., SIMMONDS, P. Geographical distribution of hepatitis c virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p.884-892, 1994.
- MEDINA, M-D., SCHIFF, E.R. Hepatitis C: diagnostic assays. **Semin. Liver Dis.**, New York, v.15, n.1, p.33-40, 1995.
- MEISEL, H., REIP, A., FALTUS, B., LU, M., PORST, H., WIESE, M., ROGGENDORF, M., KRUGER, D.H. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin. **Lancet**, London, v.345, p.1209-1211, 1995.
- MELE, A., SAGLIOCCA, L., MANZILLO, G., CONVERTI, F., AMOROSO, P., STAZI, M.A., FERIGNO, L., RAPICETTA, M., FRANCO, E., ADAMO, B., PALUMBO, F., SBREGLIA, C., PANÁ, A., PASQUINI, P. SEIEVA COLLABORATING GROUP. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis and their relationship to antibodies for hepatitis C virus: a case-control study. **Am. J. Public Health**, Washington, v.84, p.1640-1643, 1994.

- MIYACHI, H., MASUKAWA, A., OHSHIMA, T., FUSEGAWA, H., HIROSE, T., IMPRAIM, C., ANDO Y. Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of hepatitis C virus using the internal control. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin v.36, n.8, p.571-575, 1998.
- NAKAO, T., ENOMOTO, N., TAKADA, N., TAKADA, A., DATE, T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. **J. Gen. Virol.**, Colchester, v.72, p.2105-2112, 1991.
- NAOUMOV, N.V., PETROVA, E.P., THOMAS, M.G., WILLIAMS, R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. **Lancet**, London, v.352, p.195-197, 1998.
- National Center for Biotechnology Information. Blast: search www. Blast at NCBI. Nucleotides. [Online]. Available. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- NEUMAIER, M., BRAUN, A., WAGENER, C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. **Clin. Chem.**, Washington, v.44, n.1, p.12-26, 1998.
- NISHIZAWA, T., OKAMOTO, H., KONISHI, K., YOHIZAWA, H., MIYAKAWA, Y., MAYMI, M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.241, p.92-97, 1997.
- NOUSBAUM, J-B., POL, S., NALPAS, B., LANDAIS, P., BERTHELOT, P., BRECHOT, C., GIGOU, M., FERAY, C., THIERS, V., OKAMOTO, H., MISHIRO, S., POUSSIN, K., PATERLINI, P., RUMI, M., COLOMBO, M. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.122, p.161-168, 1995.
- OGATA, N., HARVEY, PRÉ-NOME, ALTER, H.J., MILLER, R.H., PURCELL, R.H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.88, p.3392-3396, 1991.
- OKADA, S-I., AKAHANE, Y., SUZUKI, H., OKAMOTO, H., MISHIRO, S. The degree of variability in the aminoterminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in vivermic patients. **Hepatology**, St. Louis, v.16, p.619-624, 1992.
- OKAMOTO, H., OKADA, S., SUGIYAMA, Y., TANAKA, T., SUGAI, Y., AKAHANE, Y., MACHIDA, A., MISHIRO, S., YOSHIZAWA, H., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. 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.**, Tokyo, v.60, p.215-222, 1990.

- OKAMOTO, H., OKADA, S., SUGIYAMA, Y., YOTSUMOTO, S., TANAKA, T., YOSHIZAWA, H., TSUDA, F., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn. J. Exp. Med.*, Tokyo, v.60, p.167-177, 1990.
- OKAMOTO, H., OKADA, S., SUGIYAMA, Y., KURAI, K., ILZUKA, H.L., MACHIDA, A., MIYAKAWA, Y.L., 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.*, Colchester, v.72, p.2697-2704, 1991.
- OKAMOTO, H., KURAI, K., OKADA, S-I., YAMAMOTO, K., IIZUKA, H.L., TANAKA, T., FUKUDA, S., TSUDA, F., MISHIRO, S. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, Orlando, v.188, p.331-341, 1992a.
- OKAMOTO, H., SUGIYAMA, Y., OKADA, S., KURAI, K., AKAHANE, Y., SUGAI, Y., TANAKA, T., SATO, K., TSUDA, F., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.*, Colchester, v.73, p.673-679, 1992b.
- OKAMOTO, H., KOJIMA, M., OKADA, S., YOSHIZAWA, H., IIZUKA, H., TANAKA, T., MUCHMORE, E.E., PETERSON, D.A., ITO, Y., MISHIRO, S. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8-2 year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology*, Orlando, v.190, p.894-899, 1992.
- OKUDA, K., HAYASHI, H., KIBAYASHI, S., IRIE, Y. Mode of hepatitis C infection not associated with blood transfusion among chronic hemodialysis patients. *J. Hepatol.*, Amsterdam, v.23, p.28-31, 1995.
- OSHIMA, M., TSUCHIYA, M., YAGASAKI, M., ORITA, T., HASEGAWA, M., TOMONOH, K., KOJIMA, T., HIRATA, Y., YAMAMOTO, O., SHO, Y. cDNA clones of Japanese hepatitis C virus genomes derived from a single patient show sequence heterogeneity. *J. Gen. Virol.*, Colchester, v. 72, p. 2805-2809, 1991.
- OTHO, H., TERZAWA, S., SASAKI, N., HINO, K., ISHIWATA, C., KAKO, M., UJIE, N., ENDO, C., MATSUI, A., OKAMOTO, H., MISHIRO, S. VERTICAL TRANSMISSION OF HEPATITIS C VIRUS COLLABORATIVE STUDY GROUP. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.330, n.11, p.744-750, 1994.

- PAWLOTSKY, J-M., TSAKIRIS, L., ROUDOTTHORAVALL, F., PELLET, C., STUYVER, L., DUVAL, J., DHUMEAUX, D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.171, p.1607-1610, 1995.
- PAWLOTSKY, J-M. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays?. **Hepatology**, St. Louis, v.26, n.1, p.1-4, 1997.
- PECHARATANA, S., PICKETT, M.A., WATT, P.J., WARD, M.E. Genotyping ocular strains of *Chlamydia trachomatis* by single-tube nested PCR. **PCR Methods Applic.**, v.3, p.200-204, 1995.
- POL, S., THIERS, V., NOUSBAUM, J.B., LEGENDRE, C., BERTHELOT, P., KREIS, H., BRECHOT, C. The changing relative prevalence of hepatitis C virus genotypes: evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. **Gastroenterology**, New York, v.108, p.181-183, 1995.
- PRIMI, D. Identification of a new transmissible viral agent associated with viral hepatitis of unknown etiology (nanhe hepatitis). [On line] available: http://www.diasorin.com/news/senv_virus_discovery_white_paper.htm [June, 10, 1999]
- PRINCE, A.M., ANDRUS, L. PCR: how to kill unwanted DNA. **BioTechniques**, Natick, v.12, p.38-360, 1992.
- REICHARD, O. Treatment of chronic hepatitis C. **Sacand. J. Infec. Dis.**, Stockholm, v.22, n.4, p.509, 1994.
- REICHARD, O. ANDERSSON, J., SCHVARCZ, R., WEILAND, O. Ribivirin treatment for chronic hepatitis C. **Lancet**, London, v.337, p.1058-1061, 1991.
- RUBIN, R.A. Chronic hepatitis C advances in diagnostic testing and therapy. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.154, p.387-392, 1994.
- RÜSTER, B., ZEUZEM, S., ROTH, W.K. - Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcript. **Anal. Bioch.**, Baltimore, v. 224, p. 600-603, 1995.
- RUIZ-PÉREZ, M., TORRES, C., LÓPEZ-GARCIA, P.A., EXTREMERA-RUIZ, A., SALMERÓN, J., HERRANZ-BERZAL, A. Determination of HCV RNA concentration by direct quantitation of the products from a single RT-PCR. **J. Virol. Methods**, New York, v.69, p.113-124, 1997.

- RYS, R.N. & PERSING, D.H. - Preventing false-positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, p.2356-2360, 1993.
- SÁEZ-ALQUÉZR, A. Hepatite C: aspectos epidemiológicos e metodologias In: SIMPÓSIO NACIONAL DE ATUALIZAÇÃO EM HEPATITE C, 1., São Paulo, 1996. **Anais**. São Paulo: Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Universidade Federal de São Paulo, 1996. p13-21.
- SAKAMOTO, M., AKAHANE, Y., TSUDA, F., TANAKA, T., WOODFIELD, D.G., OKAMOTO, H. Entire nucleotide sequence and characterisation of a hepatitis C virus of genotype V/3a. **J. Gen. Virol.**, Chochester, v.75, p.1761-1768, 1994.
- SALMERÓN, F.J., PALACIOS, A., PÉREZ-RUIZ, M., TORRES, C., OYONARTE, S., FERNÁNDEZ-MONTOYA, A., RUIZ-EXTREMERA, A. Epidemiology, serological markers, and hepatic disease of anti-HCV ELISA-2 positive blood donors. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v.41, n.10, p.1933-1938, 1996.
- SAMBROOK, L.E., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Plasmid vectors. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989. p.1.21-1.41.
- SARKAR, G., SOMMER, PRÉ-NOME, SHEDDING, S.S. Shedding light on PCR contamination. **Nature**, London, v.343, p.27, 1990.
- SCHALAUDEK, G.G., LEVERENZ, G.J., MATTSSON, L., WEILAND, O.L., MUSHAWAR, I.K. Detection of hepatitis C viral RNA by the polymerase chain reaction in serum of patients with post-transfusion non-A, non-B hepatitis. **J. Virol. Methods.**, New York, v.37, p.189-200, 1992.
- SCHREIBER, G.B., BUSCH, M.P., KLEINMANN, S.H., KORELITZ, J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.334, p.1685-1690, 1996.
- SHERLOCK, S., DOOLEY, J. - Virus hepatitis. IN **Diseases of the liver and biliary system** – 10. Ed. Oxford: Blackwell Science, 1997. Cap.16, p. 265-302.
- SHINDO, M., DI BISCEGLIE, A.M., CHEUNG, L., SHIH, W-K., CRISTIANO, K., FEINSTONE, S.M., HOOFNAGLE, H. Decrease in hepatitis C viral RNA during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.115, p.700-704, 1990.
- SIMMONDS, P., HOLMES, E.C., CHA, T-A., CHAN, S.W., McOMISH, F., IRVINE, B., BEALL, E., YAP, P-L., KOLBERG, J., URDEA, M.S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J. Gene. Virol.**, Chochester, v.74, p.2391-2399, 1993.(a)

- SIMMONDS, P., McDOMISH, F., YAP, P.L., CHAN, S-W., LIN, C.K., DUSHEIKO, G., SAEED, A.A., HOLMES, E.C. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J. Gen. Virol.*, Chochester, v.74, p.661-668, 1993.(b)
- SIMMONDS, P., ALBERTI, A., ALTER, H.J., BONINO, F., BRADLEY, D.W., BRECOT, C., BROUWER, J.T., CHAN, S-W., CHAYAMA, K., CHEN, D-S., CHOO, Q-L., COLOMBO, M., CUYPERS, H.T., DAT, T., DUSHEIKO, G.M., ESTEBAN, J.I., FAY, O., HADZIYZANNIS, S.J., HAN, J., HATZAKIS, A., HOLMES, E.C., HOTTA, H., HOUGHON, M., IRVINE, B., KIHARA, M., KOLBERG, J.A., KUO, G., LAU, J.Y.N., LELIE, P.N., MAERTENS, G., McOMISH, F., MIYAMURA, T., MIZOKAMI, M., NOMOTO, A., PRINCE, A.M., REESNIK, H.W., RICE, C., ROGGENDORF, M., SCHALM, S.W., SHIKATA, T., SHIMOTOHNO, K., STUYVER, L., TREPO, C., WEINER, A., YAP, P.L., URDEA, M.S. A proposed system for nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, St. Louis, v.19, p.1321-1324, 1994.
- SIMMONDS, P. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. *Gut*, London, v.40, p.291-293, 1997.
- SMITH, D.B., DAVIDSON, F., SIMMONDS, P. Hepatitis C virus variants and the role of genotyping. *J. Hepatol.*, Amsterdam, v.23, n.2, p.26-31, 1995.
- SOKAL, E.M., MELCHIOR, M., CORNU, C., WANDENBROUCKE, A. T., BUTS, J.P., COHEN, B.J., BURTONBOY, G. Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. *Lancet*, London v.352, p.1739-1741, 1998.
- SOTO, B., RODRIGO, L., GARCIA-BENGOCEHEA, M., SANCHEZ-QUIANO, A., Riestra, S., ARENAS, J.I., ANDREU, J., RODRIGUEZ, M., EMPARANZA, J.I., TORRES, Y. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the index case: a multicentre study of 423 pairings. *J. Intern. Med.*, Oxford, v.236, p.515-519, 1994.
- STEINHAEUER, D.A.; HOLLAND, J.J. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.41, p.409-33, 1987.
- STUYVER, L., ROSSAU, R., WYSEUR, A., DUHAMEL, M., VANDERBORGHT, B., VAN HEUVERSWEYN, H., MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterisation of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.*, Chochester, v.74, p.1093-1102, 1993.

- STUYVER, L., VAN ARNHEM, W., WYSEUR, A., HERNANDEZ, F., DELAPORE, E., MAERTENS, G. Classification of hepatitis C virus based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of the five additional subtypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.91, p.10134-10138, 1994.
- STUYVER, L., WYSEUR, A., ARNHEM, W., LUNEL, F., LAURENT-PUIG, P., PAWLOSTSKY, J.M., KLETER, B., BASSIT, L., NKENGASONG, J., VANDOORN, L.J., MAERTENS, G. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples **Virus Research**, London, v.38, p.137-157, 1995.
- STUYVER, L., WYSEUR, A., VANARNHEM, W., HERNANDEZ, F., UYTENDAELE, S., MAERTENS, G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.9, p.2259-2266, 1996.
- SUGANO, M., HAYASHI, Y., YOON, S., KINOSHITA, M., NINOMYA, T., OHTA, K., ITOH, H., KASUGA, M. Quantitative of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. **J. Clin. Pathol.**, v.48, p.820-825, 1995.
- TAKADA, N., TAKASE, S., TAKADA, A., DATE, T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.17, p.277-83, 1993.
- TAKAHASHI, M., YAMADA, G., MIYAMOTO, R., DOI, T., ENDO, H., TSUJI, T. Natural course of chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.88, p.240-243, 1993.
- TANG, Y-W., PROCOP, G.W., PERSING, D.H. Molecular diagnostic of infectious diseases. **Clin. Chem.**, v.43, n.11, p.2021-2038, 1997.
- TIBBS, C.J. Tropical aspects of viral hepatitis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.91, p.121-124, 1997.
- TILSTON, P., CORBITT, G. A single tube nested-PCR for the detection of hepatitis C virus RNA. **J. Virol. Methods**, New York, v.53, p.121-129, 1995.
- TINÉ, F., MAGRIN, S., CRAXI, A., PAGLIARO, L. Interferon for non-A, non-B chronic hepatitis: a meta-analysis of randomised clinical trials. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.13, p.192-199, 1991.
- TOKITA, H.J., SHRESTHA, S.M., OKAMOTO, H., SAKAMOTO, M., HORIKITA, M., IIZUKA, H., SHRESTHA, S., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group. **J. Gen. Virol.**, Chichester, v.75, p.931-936, 1994.

- TRAUBAUD, M-A., BAILLY, F., COLUCCI, G., TREPO, C. Stability of hepatitis C virus RNA in serum from samples collected in a closed-tube system for serum separation and transport, as measured by a quantitative competitive PCR assay. **J. Viral Hepatitis**, v.3, p.207-209, 1996.
- TREMOLADA, F., CASARIN, C., ALBERTI, A., DRAGO, C., TAGGER, A., RIBERO, M.L., REALDI, G. Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.16, p.273-281, 1992.
- TSUKUMA, H., HIYAMA, T., TANAKA, S., NAKAO, M., YABUUCHI, T., KITAMURA, T., NAKANISHI, K., FUJIMOTO, I., INOUE, A., YAMAZAKI, H. Risk factors for hepatic carcinoma among patients with chronic liver disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.328, p.1797-1801, 1993.
- UNITED States Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research. Biological Approvals. Licensed/Approved HIV, HTLV and hepatitis tests. [Online]. Available: <http://www.FDA.gov/cber>. [August 18, 1999].
- UYTTENDAELE, S., CLAEYS, H., MERTENS, W., VERHAERT, H., VERMYLEN, C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. **Vox Sang.**, Basel, v.66, p.122-129, 1994.
- VAN DOORN, L-J. Detection and characterization of the hepatitis C virus. The biology of the hepatitis C virus a review of the literature. Rotterdam, 1994. (Tese de Doutorado - Universidade Rotterdam).
- VAN DER POEL, C.L., CUYPERS, H.T., REESINK, H.W., WEINER, A.J., QUAN, S., Di NELLO, R., VAN BOVEN, J.J., WINKEL, I., MULDER-FOLKERTS, D., EXEL-OEHLERS, P.J. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. **Lancet**, London, v.337, p.317-319, 1991.
- VAN DER POEL, C.L. Risk factors in HCV infected blood donors. **Transfusion**, Bethesda, v.31, p.777-779, 1991.
- VERLENGIA, R., HIRATA, R.D.C., ROJAS, J.H.A., SILVA, A.E., NUGUYEN, N.Y., HIRATA, M.H. Cloning strategy used to construct internal control for detection of hepatitis C virus RNA in PCR tests. **Virus Rev. Res.**, v.02, n.1/2, p.180, 1997. [Resumo 129].
- VERLENGIA, R., DURIGON, E.L., HIRATA, R.C.D., VIEIRA, A., BASSITI, L., HIRATA, M. Detection of hepatitis C virus RNA in clinical samples by one step nested PCR assay. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF VIROLOGY, 11, Sydney, 1999. **Abstracts**. Sydney: International Union of Microbiological Societies, p.366, res.VP65.34.

- VERLENGIA, R., HIRATA, R.D.C., MORTENSEN, C., ABRAHÃO, F.C., SILVA, A.E., NUGUYEN, N.Y., HIRATA, M.H. Cloning of a fragment of the 5' noncoding region of HCV genome for using as an internal control in PCR. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 26, Caxambu, 1997. **Abstracts**. São Paulo: SBBq, 1997. p.47, res.F-21.
- WANG, J.T. WANG, T.H., SHEU, J.C., LIN, S.M., LIN, J.T., CHEN, D.S. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.3, p.750-753, 1992.
- WANG, J.T. Hepatitis C virus RNA in Saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. **J. Med. Virol.**, New York, v.36, p.28-31, 1992.
- WAGNER, N., ROTTHAUWE, H.W. Hepatitis C contributes to liver disease in children and adolescents with hemophilia. **Klin. Padiatr.**, v.206, p.40-44, 1994.
- WEINER, A.J., KUO, G., BRADLEY, D.W., BONINO, F., SARACCO, G., LEE, C., ROSENBLATT, J., CHOO, Q.L., HOUGHTON, M. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. **Lancet**, London, v.335, p.1-3, 1990.
- WEINER, A.J., GEYSEN, H.M., CHRISTOPHERSON, C., HALL, J.E., MASON, T.J., SARACCO, G., BONINO, F., CRAWFORD, K., MARION, C.D., CRAWFORD K.A. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.89, p.3468-3472, 1992.
- WILBER, J.C., POLITO, A. Serological and virological diagnostic tests for Hepatitis C virus infection. **Semin. Gastrointestinal Dis.**, Philadelphia, v.6, n.1, p.13-19, 1995.
- WOODFIELD, D.G., HARNESS, M., RIX-TROTT, K. Hepatitis C virus infections in oral and injectable drug users. **N. Z. Med. J.**, Wellington, v.106, p.332-334, 1993.
- ZAAIJER, H.L., CUYPERS, H.T.M., REESINK, H.W., WINKEL, I.N., GERKEN, G., LELIE, P.N. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet**, London, v.341, p.722-724, 1993.
- ZAAIJER, H.L., CUYPERS, H.T., REESINK, H.W., LELIE, P.N., VRIELINK, H., VAN DER POEL, C.L. New immunoblot resolves indeterminate results for antibody to hepatitis C virus. **Transfusion**, Bethesda, v.34, n.2, p.184, 1994.

- ZHANG, Z., MARTINEAU, D. Single-tube heminested PCR coupled with 'touchdown' PCR for the analysis of the walleye dermal sarcoma virus *env* gene. **J. Virol. Methods**, New York, v.60, p.29-37, 1996.
- ZIMMERMANN, K., MANNHALTER, J.W. Technical aspects of quantitative competitive PCR. **BioTechniques**, Natick, v.21, p.268-279, 1996.
- YOUNOSSI, Z., McHUTCHISON, J. Serological tests for HCV infection. **Viral Hepatitis Rev.**, v.2, p.61-173, 1996.