



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO  
GENÉTICO E MOLECULAR

**GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV): DESENVOLVIMENTO DE  
UMA METODOLOGIA SIMPLIFICADA DE ANÁLISE LABORATORIAL E  
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular para a obtenção do Grau de Mestre.

**Elisa Sisti**

Orientador: Dr. Vagner Ricardo Lunge

Canoas

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido e financiado pela Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, FINEP (Convênios 0.1.05.0124.00 – 2004 e 0.1.07.0102.00 – 2006) e Laboratório Simbios Biotecnologia.

## **Dedicatória**

**Dedico esta dissertação ao meu querido namorado Richard, que com amor, paciência e carinho me deu forças para nunca desistir. Obrigada por tolerar a minha constante ausência, as mudanças de humor, os finais de semana em frente ao computador, as idas e vindas da inóspita rodoviária... Enfim, obrigada pelo companheirismo constante.**

## **Agradecimentos especiais**

### **A DEUS**

Agradeço por todas as oportunidades oferecidas e por ter sempre iluminado meu caminho, agradeço pelas dificuldades vencidas e pelas lições aprendidas, pelas vitórias conquistadas, pelos sonhos concretizados e também por aqueles que não foram realizados, pelo dom da vida e por tudo que me ofereceu ao longo destes anos.

### **AOS MEUS PAIS**

A vocês, que nos deram vida e nos ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos escuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não temos palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuramos arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

Obrigada mãe e pai por todo o amor, carinho, dedicação, empenho dispensados para a minha formação pessoal e profissional e especialmente por proporcionar desde cedo exemplos éticos e morais, tão raros em nosso cotidiano. Minha gratidão eterna!

## **Agradecimentos**

**Vagner**, tua dedicação e profissionalismo na orientação deste trabalho, bem como a tua compreensão foram primordiais para a construção do mesmo, pois tudo que um sonho precisa para ser realizado é de alguém que acredite que ele possa ser realizado. Muito obrigada por acreditar e apostar neste sonho!

**Aos meus colegas e alunos da UNICRUZ**, que agüentaram, por todo este tempo, meu cansaço, minha falta de tempo, minhas correrias, e que sempre foram compreensíveis e tiveram uma palavra amiga quando mais precisei. Obrigada.

**Aos amigos do Laboratório SIMBIOS**, Kely, Teka, Adriane, Juliana, Katiane, Thaís, Carol, Tiago, Fabrício, etc. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela ajuda, pelos treinamentos, pela paciência e pela amizade dispensada. Não convivemos por muito tempo, mas lembrarei sempre de vocês com muito carinho. Faço votos que encontrem em seus caminhos pessoas igualmente especiais e dispostas a ajudar.

**Ao Laboratório Weimann** pelas amostras e informações de seqüenciamento fornecidas para a realização deste trabalho.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1. Formas de Transmissão do Vírus da Hepatite C (HCV) e Fatores de Risco Relacionados .....	10
2. Evolução Clínica da Hepatite C e Terapia Antiviral .....	12
3. Estrutura e Organização Genômica do HCV .....	15
4. Heterogeneidade Genotípica e Classificação do HCV .....	18
5. Epidemiologia do HCV e Distribuição Genotípica .....	21
6. Diagnóstico Laboratorial do HCV .....	24
6.1 Testes Indiretos (Sorológicos) .....	24
6.2 Testes Moleculares Qualitativos .....	25
6.3 Testes Moleculares Quantitativos .....	26
6.4 Testes de Genotipagem .....	27
<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	31
<b>ARTIGO CIENTÍFICO:</b> <i>HCV genotyping by a fast PCR-RFLP method in Rio Grande do Sul state - Southern Brazil</i> .....	32
<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61

## RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) é um dos principais agentes etiológicos de hepatite crônica e pode evoluir para doenças graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular. O HCV exibe grande variabilidade genética, sendo classificado em genótipos e subtipos. A identificação laboratorial do genótipo é fundamental para definição da duração da terapia antiviral, sendo utilizada na rotina clínica previamente ao início do tratamento de pacientes infectados. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar um método simplificado para a genotipagem do HCV, baseado na análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP). Os resultados das 804 amostras analisadas demonstraram que os principais genótipos (1, 2 e 3) presentes no Brasil apresentam padrões característicos e a utilização de 3 enzimas de restrição (*Hinf* I, *Bst*NI e *Hae* III) foi eficiente na identificação da grande maioria (98,9%) das amostras analisadas. Esta metodologia foi utilizada para determinar a prevalência e a distribuição geográfica dos genótipos do HCV em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. A prevalência no estado foi semelhante a estudos prévios, demonstrando a predominância do genótipo 1 (52,3%), seguida pelo genótipo 3 (40,8%) e, em menor proporção, o genótipo 2 (6,4%). Houveram diferenças significativas na distribuição dos genótipos quando a região metropolitana foi comparada com o interior do Estado, destacando a maior frequência do genótipo 2 no interior (12,3%), e quando as diferentes regiões do Estado foram comparadas entre si, ressaltando as altas frequências do genótipo 3 na Serra (61,5%) e genótipo 2 no Planalto (33,3%).

## ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is the etiologic agents of chronic hepatitis C and is responsible by serious illnesses, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The HCV displays great genetic variability, being classified in genotypes and subtypes. The laboratory identification of the HCV genotype is essential to defining the duration of antiviral therapy, being used in clinical routine prior to the treatment of the infected patient. The purpose of this study was to develop and evaluate a simplified method for HCV genotyping, based on the polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) on the 5' non coding region (5'NCR). The results of the 804 samples showed that the main genotypes present in Brazil (1, 2 and 3) have characteristic banding patterns using only 3 restriction enzymes (*Hinf* I, *Bst*N I and *Hae* III) in 2 digestion systems. The procedure was efficient in identifying the great majority (98.9%) of 804 analyzed samples. This methodology was used to determine the prevalence and geographic distribution of HCV genotypes in Rio Grande do Sul state. The prevalence in the state was similar to previous studies, demonstrating that genotype 1 was the most frequent (52.3%), followed by genotype 3 (40.8%) and, in a smaller proportion, the genotype 2 (6.4%). There was a significant difference in the distribution of genotypes when the metropolitan region was compared with the interior of the state, highlighting the higher frequency of the genotype 2 in the interior (12.3%). The frequencies of HCV genotypes were also different among geographic regions, emphasizing the high frequency of genotype 3 in the Serra (mountains) region (61.5%) and genotype 2 in the Planalto (North) region (33.3%).

## **INTRODUÇÃO**

O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado na década de 1980 e desde então têm sido um dos principais agentes infecciosos causadores de danos hepáticos (Shepard *et al.*, 2005). A hepatite C é um problema global de saúde e abrange cerca de 130 milhões de indivíduos no mundo todo, podendo ocasionar doenças hepáticas graves (como cirrose e carcinoma hepatocelular) e resultando em milhares de óbitos. Estima-se que esta doença infecciosa seja responsável por aproximadamente 250.000 a 350.000 mortes por ano. Atualmente, a hepatite C também é a indicação mais comum para cirurgias de transplante de fígado (Rosen e Martin, 2000; NIH, 2002; GBD, 2004).

### **1. Formas de Transmissão do Vírus da Hepatite C (HCV) e Fatores de Risco Relacionados**

A transmissão do HCV ocorre principalmente pela exposição ao sangue contaminado, sendo a via parenteral a mais comum. Além dos casos em que a exposição ao material infectado é evidente (transfusão sanguínea, acidente com material perfuro-cortante, transplante de órgãos, etc.), a possibilidade da ocorrência de transmissão parenteral inaparente, por exposição percutânea ou das mucosas ao sangue contaminado, também tem sido reportada (Chen e Morgan, 2006).

A maioria dos pacientes portadores do HCV infectou-se devido a transfusões sanguíneas ocorridas antes de 1992 (ano de implantação de triagem sorológica para HCV em bancos de sangue), uso de drogas intravenosas, uso de hemoderivados contaminados, injeções terapêuticas inseguras, transplante de órgãos oriundos de doadores infectados, exposição ocupacional e procedimentos de hemodiálise pouco seguros (Chen e Morgan, 2006). Neste contexto, cabe ressaltar que a transmissão devido à transfusão sanguínea tem sido eliminada nos países que implementaram testes para o HCV em doadores sanguíneos. Porém, para o restante dos países (principalmente do terceiro mundo) a transfusão permanece uma importante fonte de transmissão do HCV (Hladik *et al.*, 2006). A utilização massiva de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico do HCV também tem reduzido significativamente as taxas de infecção

decorrentes de transplantes de órgãos, receptores de hemoderivados e procedimentos de hemodiálise (Stramer *et al.*, 2004).

As transmissões ocasionadas através da via sexual e perinatal apresentam frequências menores (NIH, 2002; Terrault, 2002; Poupon, 2005). Mesmo sendo um dos modos menos comuns de transmissão do HCV, a infecção perinatal possui uma incidência de aproximadamente 2 a 5% e os riscos mais altos são encontrados em indivíduos co-infectados com HIV e na presença de alta carga viral materna (Oliveira, 2007).

Outras formas de transmissão nunca foram documentadas, muito embora o RNA do HCV já tenha sido detectado em vários líquidos corporais, tais como: saliva, urina, lágrimas, fluído seminal e líquido ascítico (Henderson *et al.*, 2003). Um estudo experimental recente relatou ainda a infectividade do HCV no sangue seco estocado à temperatura ambiente (Kamili *et al.*, 2007).

No Brasil, diversos estudos já foram realizados com relação às formas de transmissão do HCV. Dados de um estudo realizado no estado da Bahia indicaram as principais rotas de transmissão do HCV, demonstrando que: 75 (59,1%) dos indivíduos pesquisados possuíam histórico de cirurgias, 48 (39,3%) haviam realizado transfusão sanguínea no passado, 16 (12,7%) relataram fazer uso de vitaminas intravenosas, 9 (7,1%) mencionaram o uso de drogas ilícitas injetáveis e 7 (5,5%) afirmaram fazer uso de cocaína intranasal. A presença de tatuagens foi considerada uma possível fonte de infecção em 7 (5,5%) dos casos, a transmissão via manicure em 6 (4,8%) e a utilização compartilhada de lâminas de barbear em 3 casos (2,4%). Somente 4 (3,1%) dos indivíduos estudados submeterem-se à hemodiálise e 9 (7,1%) eram profissionais da área da saúde (Codes *et al.*, 2003). Dados de outro estudo realizado na região Nordeste do Brasil demonstraram que: 93 dos participantes (40%) tinham histórico de transfusão sanguínea; 14 (6%) eram usuários de drogas intravenosas; 19 (18%) referiram inalação de cocaína; 28 (12%) tinham tatuagem; 15 (7%) eram trabalhadores da área da saúde; 5 (2%) referiram reutilização de seringas; 5 (2%) tinham múltiplos fatores de risco e 53 (23%) não referiram nenhum fator de risco (Paraná *et al.*, 2000). Já no estado do Paraná, a transfusão sangüínea foi apontada como o principal fator de risco em indivíduos que não possuíam

infecção pelo HIV, e o uso de drogas injetáveis como o principal fator de risco encontrado em indivíduos co-infectados pelo HIV/HCV (Vogler *et al.*, 2004). A presença dos mesmos fatores de riscos foi evidenciada na região Sul do Brasil, onde a utilização de drogas intravenosas, a transfusão sanguínea e a presença de tatuagens foram os principais fatores de risco encontrados em uma população de doadores de sangue HCV positivos (Brandão e Fuchs, 2002).

## **2. Evolução Clínica da Hepatite C e Terapia Antiviral**

Após a infecção, o HCV replica-se preferencialmente no citoplasma dos hepatócitos do hospedeiro. No entanto, sabe-se que o vírus não possui efeito citopático direto, levando o fígado à infecção persistente, a qual depende, aparentemente, da rápida replicação viral e de sua contínua propagação de célula para célula, sem uma resposta imune adequada aos antígenos virais por parte dos linfócitos T (Hoofgnale, 2002).

Quanto à sua apresentação clínica, a infecção pelo HCV é indolor e geralmente assintomática, sendo a fadiga o sintoma mais comumente relatado. Cerca de 10 a 30% dos pacientes portadores da infecção aguda desenvolve os sintomas clássicos das hepatites virais, tais como: icterícia, náuseas, vômito, dor abdominal, letargia e mialgias (Orland *et al.*, 2001). Por isso, a hepatite C normalmente só é diagnosticada após a detecção laboratorial de resultados alterados das transaminases hepáticas anos após o evento de transmissão. Este também é um fator responsável pela diminuição da precisão das taxas de incidência da doença, uma vez que a maior parte dos casos recentes de infecção acaba não sendo notificada (Yen *et al.*, 2003).

A evolução da fase aguda para a crônica é marcada pela persistência do vírus no sangue do paciente, por um período superior a 6 meses, situação a qual ocorre em aproximadamente 80% dos casos (Chen e Morgan, 2006). Menor propensão ao desenvolvimento da fase crônica da doença tem sido observada em indivíduos jovens, que apresentam menos de 25 anos de idade, quando comparados aos indivíduos de idade mais avançada (Bellentani e Tiribelli, 2001). Porém, entre os sexos, os resultados dos estudos são divergentes, ora demonstrando menor propensão no sexo feminino (Wiese *et al.*, 2000), ora

apresentando taxas de cronificação similares entre ambos os sexos (Bellentani e Tiribelli, 2001). Diferenças na taxa de cronificação da infecção e no desenvolvimento de complicações entre os diferentes grupos étnicos e raciais também já foram relatadas (Chen e Morgan, 2006). Por razões desconhecidas, indivíduos americanos afro-descendentes apresentaram maiores taxas de cronificação do que indivíduos caucasianos e hispânicos (Alter *et al.*, 1999). Sabe-se também que esta taxa é menor em pacientes que desenvolvem icterícia ou sintomas durante a fase aguda da infecção, quando comparados aos indivíduos assintomáticos (Villano *et al.*, 1999).

A fase crônica da hepatite C também apresenta um longo período clinicamente silencioso, ocorrendo uma lenta progressão para danos hepáticos graves. Manifestações clínicas podem surgir somente 10 a 40 anos após a infecção, sendo que os pacientes infectados permanecem virêmicos e, portanto, transmissores por esse longo período de tempo (Yen *et al.*, 2003).

Extensivos estudos têm focado o curso natural da progressão da hepatite C crônica para fibrose, cirrose, carcinoma hepatocelular e morte. Aproximadamente 20% dos portadores crônicos do HCV evoluem se não tratados, para alguma forma de doença hepática terminal, como a hipertensão portal e o hepatocarcinoma, que ocorre em uma freqüência de 1-4% ao ano (Seeff, 2002; Teixeira *et al.*, 2004). Nesta progressão, sabe-se que a fibrose é variável, mas é bem estabelecida a capacidade desta de influenciar a possível progressão para a cirrose. Em casos leves, a fibrose é limitada às áreas portais e periportais, no entanto, alterações mais avançadas podem ocorrer, nas quais a fibrose costuma estender-se de uma área portal à outra (Chen e Morgan, 2006). A cirrose desenvolve-se em aproximadamente 20 a 40% dos indivíduos portadores de hepatite C crônica, mas sua manifestação clínica ocorre somente numa fase tardia, com sintomas de hipertensão portal ou insuficiência hepática (Seef, 2002).

Muitas pesquisas têm tentado definir o intervalo de tempo existente entre a infecção pelo HCV e o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (Chen e Morgan, 2006). Em torno de 10 a 20% dos pacientes portadores desenvolvem cirrose em até 20 anos, mas vale ressaltar que há evidências de que tanto os fatores externos como os do próprio hospedeiro podem acelerar as

manifestações clínicas (Seef, 2002). Já foi demonstrado que o consumo de álcool, bem como a presença de co-infecções pelos vírus da hepatite B (HBV) e da imunodeficiência humana (HIV), favorecem a progressão da doença (Datz *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2004). Outros fatores que podem contribuir na ocorrência de complicações hepáticas incluem a presença de imunossupressão, resistência à insulina (Diabetes), esteato-hepatite não-alcoólica, esquistossomose, hemocromatose, tabagismo, fatores genéticos do hospedeiro, níveis de ferro e aminotransferases e fatores ambientais, tais como dieta e contaminantes tóxicos (Seef, 2002; Chen e Morgan, 2006).

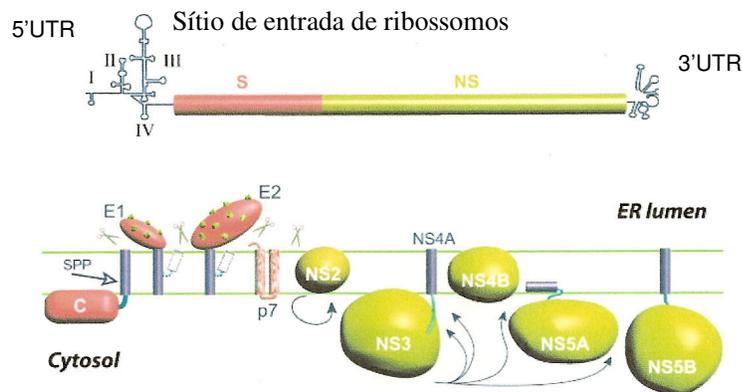
Estima-se que entre 1 e 3% dos indivíduos cronicamente infectados pelo HCV apresentem também manifestações extrahepáticas, as quais costumam envolver múltiplos órgãos e sistemas, acarretando problemas renais, dermatológicos, hematológicos e reumatológicos (El-Serag *et al.*, 2002; Sene *et al.*, 2004; Coccoli *et al.*, 2007). As manifestações extrahepáticas incluem crioglobulinemias, linfomas B, glomerulonefrites, porfiria cutânea tarda, líquen plano, artrite soronegativa, ceratoconjuntivite, Diabetes *Mellitus* tipo II e desordens linfoproliferativas (Meyers *et al.*, 2003). Alguns dados indicam ainda a associação entre a hepatite C crônica e os Linfomas de *Hodgkin's* e de não-*Hodgkin's*, tireoidites auto-imunes e Síndrome de *Sjogren's*. Porém, não está bem esclarecido se estas doenças podem ser causadas diretamente pela infecção do HCV ou por uma subjacente estimulação imune decorrente da infecção crônica (Chen e Morgan, 2006).

Atualmente já existe tratamento para a hepatite C, possibilitando inclusive a cura (eliminação do HCV) do paciente portador. A terapia combinada utilizando  $\alpha$ -interferon e ribavirina tem se mostrado eficiente no tratamento da infecção pelo HCV. A adição da molécula de polietilenoglicol ao interferon ( $\alpha$ -interferon peguilado) proporcionou um maior tempo de ação desta droga e, na combinação com ribavirina, a resposta virológica sustentada entre os pacientes em tratamento foi significativamente maior (Shepherd *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2007).

### 3. Estrutura e Organização Genômica do HCV

O HCV é um membro da família *Flaviridae* e do gênero *Hepacivirus* (Simmonds *et al.*, 2005). Seu genoma é do tipo RNA, fita simples, com 30 a 60 nm de diâmetro e aproximadamente 9.500 bases de extensão, o qual é protegido por um capsídeo icosaédrico e um envelope lipídico, com duas glicoproteínas ancoradas (Penin *et al.*, 2004; Silva e Niel, 2006).

O genoma do HCV é composto de 3 diferentes regiões: (1) 5' não-codificante ou não-traduzida (5'NCR ou 5'UTR), com aproximadamente 341 bases e que contém dois domínios, um envolvido na replicação viral e um sítio de reconhecimento para a entrada nos ribossomos e o conseqüente início da tradução da poliproteína viral; (2) uma fase de leitura aberta (ORF) com mais de 9.000 nucleotídeos que codifica para uma única poliproteína, com uma pequena variação entre os diferentes genótipos, e que após sofrer clivagem origina quatro proteínas estruturais (core, E1, E2 e p7) e seis proteínas não-estruturais (NS2 à NS5B); (3) 3' não-codificante ou não-traduzida (3'NCR ou 3'UTR) que possui uma seqüência variável de aproximadamente 40 bases, uma cauda de ribonucleotídeos rica em poli-UC, e uma região altamente conservada, com cerca de 98 bases (Figura 1) (Reed e Rice, 2000; Penin *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Organização genômica do HCV. As letras S e NS correspondem às regiões que codificam as proteínas estruturais e não-estruturais do HCV, respectivamente. Adaptado de Penin *et al.*, 2004.

A região 5'UTR é considerada um importante sítio de controle da transcrição e tradução viral. Além disso, é a porção mais altamente conservada do genoma, justificando o seu uso como alvo para diversos métodos de diagnóstico molecular do HCV (Zein, 2000; Scott e Gretch, 2007).

A fase de leitura aberta (ORF) com mais de 9.000 nucleotídeos possui diversos genes que codificam várias proteínas estruturais e não estruturais (Tabela 1). O core é um gene mais conservado que codifica uma proteína estrutural de ligação ao RNA viral e que está envolvida na formação do nucleocapsídeo (McLauchlan, 2000; Ray e Ray, 2001; Tellinghuisen, 2002; Dubuisson, 2007). Altas taxas de mutações são observadas nos genes que codificam as proteínas do envelope viral (E1 e E2), especialmente na região que codifica para a proteína E2, sugerindo a exposição destas ao sistema imune do hospedeiro. Sabe-se que as glicoproteínas do envelope também são essenciais para entrada do vírus na célula, especialmente a proteína E1, que contém um sítio de ligação para a molécula CD81, a qual atua como receptora ou co-receptora para o HCV. Logo, estas proteínas constituem um alvo interessante para o desenvolvimento de moléculas antivirais que bloqueiam a entrada do vírus na célula hospedeira. (Forns *et al.*, 2000; Helle *et al.*, 2006). A proteína p7 é uma pequena proteína hidrofóbica caracterizada como um canal iônico transmembranar, a qual não é requerida para a replicação do RNA viral, mas cuja presença parece ser essencial para gerar infecção (Sakai *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2004; Premkumar *et al.*, 2004).

As proteínas não-estruturais do HCV (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) possuem um papel importante no processamento da poliproteína viral e também na replicação do RNA (Tabela 1) (Dubuisson, 2007). Destas, a proteína NS2 pode ser considerada como não essencial para a formação do complexo de replicação. E embora sua função na forma madura seja desconhecida, sabe-se que antes da clivagem da poliproteína viral, ela possui, juntamente com a proteína NS3, uma atividade autoproteínase, responsável pela clivagem da junção NS2-NS3 (Lindenbach e Rice, 2005). As clivagens restantes são processadas por uma serina-proteinase codificada pela região NS3, que também forma um complexo com a proteína NS4, a qual por sua vez, atua como um co-fator da proteinase

NS3. A proteína NS3 possui ainda, em sua extremidade C-terminal, um domínio RNA-helicase (Kim *et al.*, 1996; Brass *et al.*, 2006). A proteína NS4B demonstrou ter capacidade de induzir alterações na membrana intracelular, as quais são relacionadas à replicação do RNA viral (Egger *et al.*, 2002), enquanto a proteína NS5A parece ter relação com a resistência do HCV à ação antiviral do interferon, sendo então denominada como Região Determinante de Sensibilidade ao Inteferon (ISDR) (Tan e Katze, 2001). Finalmente a proteína NS5B é reconhecida como a RNA-polimerase RNA-dependente do vírus, que não possui a habilidade de realizar correção de erros (“proofreading”) durante a replicação (Moradpour *et al.*, 2004).

Acredita-se que a curta região do genoma do HCV, denominada 3–UTR, possui um importante papel na iniciação da replicação do genoma viral (Penin *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** Proteínas virais e suas funções no ciclo de vida do HCV

<b>Proteína</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Função</b>
Core	21 kDa	Proteína de ligação ao RNA; Nucleocapsídeo
E1	31-35 kDa	Glicoproteína do envelope associada com E2
E2	70 kDa	Glicoproteína do envelope associada com E1
P7	7 kDa	Canal iônico
NS2	21 kDa	Componente da NS2-3 proteinase
NS3	69 kDa	Domínio N-terminal da proteinase e helicase
NS4A	6 kDa	Co-fator NS3-4 A proteinase
NS4B	27 kDa	Indução de alterações membranares
NS5A	56-58 kDa	Fosfoproteína
NS5B	68 kDa	RNA polimerase RNA dependente

Adaptado de Dubuisson, 2007.

Cabe destacar que embora a estrutura genômica do HCV esteja bem caracterizada, o ciclo de vida permanece ainda pouco conhecido, devido principalmente ao fato do vírus não replicar eficientemente em culturas celulares. Sendo assim, muitos aspectos foram deduzidos devido à analogia com os demais membros da família *Flaviridae*. Recentemente foi identificado o único tipo de HCV, denominado JFH-1, que pode replicar e produzir partículas virais eficientemente em culturas celulares, os quais são potencialmente infecciosos *in vitro* e *in vivo*. Espera-se com isto, uma futura evolução na compreensão da replicação e patogênese viral, bem como a utilização destas informações para a produção de drogas antivirais (Kato *et al.*, 2007).

#### **4. Heterogeneidade Genotípica e Classificação do HCV**

Assim como outros vírus RNA, o HCV exibe grande variabilidade genética decorrente da rápida replicação viral, da inexistência de um mecanismo de reparo (*proofreading*) da polimerase viral, resultando na substituição de nucleotídeos, e da ausência da atividade das 3' e 5' exonucleases (McGarvey *et al.*, 1998).

Os genomas dos HCVs diferem em torno de 35%, apresentando maior variabilidade nas regiões que codificam as proteínas do envelope (E1 e E2) e menor variabilidade nas extremidades não codificantes. Devido a estas variações, o HCV é atualmente classificado em seis genótipos (denominados pelos números arábicos de 1 a 6). Cada genótipo, por sua vez, compreende múltiplos subtipos (denominados a, b, c, etc), os quais diferem entre si por apresentar 20 a 25% de divergência em suas seqüências nucleotídicas (Simmonds, 2004).

Já as complexas variantes genéticas encontradas e isoladas em um indivíduo são chamadas de quasiespécies, e estas resultam do acúmulo de mutações ocorridas durante a replicação viral no hospedeiro (Xavier e Bukh, 1998). Acredita-se que a evolução de quasiespécies durante a fase aguda da hepatite C possui relação com a cronificação da doença, uma vez que esta diversidade populacional é responsável pelas rápidas mudanças no envelope protéico do vírus, contribuindo para o escape do sistema imune do hospedeiro (Farci *et al.*, 2000; Hoofnagle, 2002).

Estudos referentes à distribuição global dos genótipos e suas análises filogenéticas têm proporcionado uma idéia da emergência e diversificação destes durante os séculos. De acordo com estas informações, a distribuição do genótipo 2 iniciou-se a cerca de 90 a 150 anos atrás. Já os subtipos 1a e 1b tiveram seu início à aproximadamente 100 anos, enquanto o genótipo 3 surgiu a 40 anos atrás. Acredita-se ainda que os genótipos 4 e 6, emergiram muito mais cedo, em cerca de 350 e 700 anos atrás, respectivamente (Pybus *et al.*, 2001; Simmonds, 2001).

A existência de correlações entre os diferentes genótipos do HCV e a evolução da doença permanece pouco esclarecida, embora os resultados de um recente estudo tenham indicado a presença de uma associação entre o genótipo 1b e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Stankovic-Djordjevic *et al.*, 2007). Por outro lado, a relação existente entre os diferentes genótipos do HCV e a resposta dos indivíduos à terapia antiviral, bem como a influência destes na determinação da duração do tratamento, têm sido amplamente demonstradas, principalmente para os genótipos 1, 2 e 3. Está bem estabelecido que pacientes infectados com os vírus dos genótipos 2 e 3 respondem mais favoravelmente à terapia antiviral do que portadores do genótipo 1. Já a duração do tratamento para pacientes com genótipos 2 e 3 pode ser limitada a 24 semanas, enquanto pacientes com genótipo 1 requerem tratamentos por 48 semanas (Fried *et al.*, 2002; NIH, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004).

Recentes estudos têm focado na resposta à terapia antiviral em pacientes infectados pelos genótipos 4, 5 e 6. Até o presente momento, os resultados têm indicado que a resposta ao tratamento, em indivíduos portadores do genótipo 4, tende a ser fraca, apresentando uma taxa de resposta viral sustentada, de cerca de 55 a 69%. Além disso, o tratamento para este genótipo demonstrou ser mais efetivo quando realizado por 36 a 48 semanas. Já para os indivíduos infectados com o genótipo 5, foram observadas taxas de resposta viral sustentada similares às obtidas para os genótipos 2 e 3. A duração do tratamento para os pacientes infectados com genótipo 6 permanece indeterminada, sendo evidenciado apenas que a resposta viral sustentada destes indivíduos está situada entre o nível das

respostas observadas para o genótipo 1 e os genótipos 2 e 3 (El-Zayadi *et al.*, 2005; Kamal *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005).

No nível nacional, a Portaria 863 do Ministério da Saúde descreve o esquema terapêutico para os genótipos 1, 2 e 3, estabelecendo as drogas de escolha, as doses indicadas, as vias de administração e a duração dos tratamentos para cada genótipo (Figura 2) (Ministério da Saúde, 2002) . Porém, algumas situações ainda aguardam publicação de portaria ministerial, e até o presente momento, seguem as seguintes diretrizes: pacientes portadores de genótipos 4 e 5, recidivantes ou não respondedores ao interferon convencional deverão receber retratamento com interferon peguilado associado à ribavirina por 48 semanas (Ministério da Saúde, 2005).

Tendo em vista que o genótipo pode ser utilizado como um marcador da probabilidade de resposta à atual terapia, a qual combina o uso de interferon peguilado e ribavirina (Zeuzem, 2004), alguns estudos recentes têm confirmado que os genótipos 1 e 4 são mais resistentes à terapia combinada, do que os genótipos 2 e 3. Logo, pode-se afirmar que os diferentes protocolos de tratamento estabelecidos de acordo com os genótipos do HCV, possuem uma significativa influência no custo total e na morbidade do tratamento da doença (Hnatyszyn, 2005).

Além disso, a existência de diversas formas evolucionárias do HCV envolve implicações epidemiológicas e forenses, além de ser cientificamente relevante do ponto de vista filogenético e taxonômico. A determinação dos genótipos e subtipos é relevante em estudos epidemiológicos e no rastreamento de fontes de contaminação, como em centros de hemodiálise, hospitais, bancos de sangue, etc. (Abacioglu *et al.*, 2000; Kokubo *et al.*, 2002).

### Esquemas terapêuticos para hepatite C crônica

Situação	Droga	Dose	Via	Duração
Hepatite C crônica (genótipo 1)	Peg + RBV	alfa 2a 180 µg/sem ou alfa 2b 1,5 µg/kg/sem	SC	48 semanas
		11-15 mg/kg/dia (800-1.200 mg em 2 tomadas)	VO	
Hepatite C crônica (genótipo 2 ou 3)	IFNc + RBV	3 MUI 3x/sem	SC	24 semanas
		11-15 mg/kg/dia (800-1.200 mg em 2 tomadas)	VO	

IFNc - interferon convencional; Peg - interferon peguilado; RBV - ribavirina

**Figura 2.** Esquemas terapêuticos preconizados para o tratamento da Hepatite C crônica no Brasil. Adaptado de Hepatites Virais: O Brasil está atento. 2 ed. Ministério da Saúde, 2005.

## 5. Epidemiologia do HCV e Distribuição Genotípica

Além de ocorrer variação na prevalência conforme a parcela da população estudada (as taxas são mais altas nos grupos de risco), a freqüência de infectados varia conforme a região geográfica. Estima-se que a prevalência da hepatite C seja menor que 1,0% no Norte da Europa e maior que 2,9% no Norte da África. A menor prevalência (0,01%-0,1%) tem sido reportada em países do Reino Unido e Escandinávia, enquanto a maior prevalência (15%-20%) tem sido observada em determinadas cidades do Egito. Diversos países, incluindo os Estados Unidos, Austrália, Turquia, Espanha, Itália e Japão, possuem prevalências médias globais de 1,0% a 1,9%. Mas diferentes padrões de prevalência conforme as faixas etárias também têm sido relatados (Alter *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2000; Okayama *et al.*, 2002; Law *et al.*, 2003; Sagnelli *et al.*, 2005; Armstrong *et al.*, 2006).

No Brasil, estimativas da Organização Mundial da Saúde sugerem que entre 2,5 e 4,9% da população geral apresenta anticorpos anti-HCV. Isto corresponde a 3,9 a 7,6 milhões de portadores crônicos de risco para o desenvolvimento de cirrose e/ou câncer hepático (WHO, 2000). Informações como as contidas no Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais, indicam que a realidade epidemiológica das hepatites virais deve

ser bastante diversa nas diferentes regiões brasileiras (Ministério da Saúde, 2002).

Wasley e Alter (2000), afirmaram previamente que a soroprevalência do HCV entre os doadores de sangue brasileiros pode variar de 1 a 5%. No entanto, estudos posteriores relataram dados de prevalências acima e abaixo deste intervalo. Na região Amazônica, foi encontrada uma taxa de 5.9%, enquanto no estado no Rio de Janeiro a prevalência em doadores sanguíneos foi de 0.9% e no estado de Santa Catarina o valor ficou em 0.31% (Rosini *et al.*, 2003; Da Fonseca e Brasil, 2004; Andrade *et al.*, 2006). Dentre os estudos regionais de prevalência do HCV, Focaccia e colaboradores (1998) reportaram na população geral do município de São Paulo, uma prevalência estimada de 1.42% para a hepatite C. Já no estado da Bahia, um estudo de base populacional demonstrou uma prevalência de 1,5% para a infecção pelo HCV (Zarife *et al.*, 2006b). No estado do Rio Grande do Sul, especificamente em Porto Alegre, uma prevalência de 1.1% de anti-HCV foi observada em doadores de sangue (Brandão e Fuchs, 2002).

Quanto à incidência, dados oficiais do Ministério da Saúde apresentaram os seguintes registros referentes ao número de novos casos confirmados de hepatite C no ano de 2006: 404 casos na região Norte do país, 1.191 na região Nordeste, 10.038 na região Sudeste, 4.677 na região Sul e 729 casos na região Centro-Oeste. Já com relação ao número de óbitos, no ano de 2006 foram descritos 57 casos na região Norte, 175 na Nordeste, 798 na Sudeste, 368 na Sul e 69 na Centro-Oeste (Ministério da Saúde, 2007). Vale destacar que a determinação precisa da incidência da infecção pelo HCV é difícil devido ao fato da maioria das infecções agudas serem assintomáticas ou evoluírem para a cura sem a devida notificação (Hagan *et al.*, 2002; Alter, 2007).

Assim como a prevalência do HCV é variável entre as regiões do mundo, estudos epidemiológicos têm revelado que os diferentes genótipos do HCV também apresentam diferentes distribuições geográficas, sendo que os genótipos 1, 2 e 3 distribuem-se no mundo inteiro, mas suas prevalências relativas variam de uma região geográfica para outra. O genótipo 4 é endêmico no Egito, Gabão e países do Oriente Médio, o genótipo 5 é encontrado principalmente na África do

Sul, enquanto o tipo 6 é normalmente detectado na Ásia (Zein, 2000; Simmonds *et al.*, 2005),

No Brasil, uma pesquisa recente demonstrou que a distribuição dos genótipos pode variar entre as diferentes regiões e até mesmo entre os diferentes estados da mesma região. Porém, os dados demonstraram que o genótipo 1 foi o mais freqüente em todas as regiões, apresentando a mais alta freqüência percentual na região Norte do país. Em seguida encontrou-se o genótipo 2, o qual foi proporcionalmente mais freqüente na região Centro-Oeste, especialmente no estado do Mato Grosso do Sul, enquanto o genótipo 3 foi mais comum no Sul do país. Por outro lado, os genótipos 4 e 5 foram raros, tendo sido relatado apenas 1 caso de cada genótipo na cidade de São Paulo (Campionto *et al.*, 2005).

Outros estudos regionais referentes à distribuição genotípica também já foram realizados nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil e algumas peculiaridades na epidemiologia do HCV foram observadas. Porém, a maioria dos dados de prevalência dos genótipos do HCV geralmente são relacionados à grandes centros urbanos (Codes *et al.*, 2003; Focaccia *et al.* 1998; Paraná *et al.* 2000; Vogler *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006, Martins *et al.*, 2006, Espírito-Santo *et al.*, 2007).

De acordo com as pesquisas, o genótipo 1 é amplamente predominante na região Norte e Nordeste do Brasil, seguido pelo genótipo 3. Já os genótipos africanos (4 e 5) não haviam sido identificados, sugerindo que o vírus foi introduzido na região através da imigração européia (Lunge *et al.*, 1999; Paraná *et al.*, 2000). Porém, recentemente um único caso de genótipo 4 foi reportado em Salvador (Zarife *et al.*, 2006a). A análise da prevalência dos genótipos em doadores sanguíneos da região Centro-Oeste do Brasil demonstrou a predominância do genótipo 1 (67,9%), seguido pelo genótipo 3 (29,1%) e pelo genótipo 2 (3%), respectivamente (Martins *et al.*, 2006). Esta mesma tendência na distribuição genotípica foi encontrada na região sul do país, em um estudo realizado na população da cidade de Londrina (Vogler *et al.*, 2004). Os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina também demonstraram a predominância do genótipo 1 (53,9%), entretanto, as freqüências dos genótipos 3 (40,7%) e 2 (5,4%) foram significantes se comparadas às encontradas em outros estados

(Silva *et al.*, 2007). Estas frequências genótípicas foram similares às encontradas em um estudo prévio, realizado na mesma região (Krug *et al.*, 1996), indicando assim a ausência de mudanças substanciais nesta última década (Silva *et al.*, 2007).

## **6. Diagnóstico Laboratorial do HCV**

Os métodos laboratoriais usados para o diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HCV incluem: (a) testes indiretos (sorológicos) para detectar anticorpos anti-HCV, baseados em ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISA, do inglês enzyme-linked immunosorbent assay) e o ensaio Imunoblot Recombinante (RIBA, do inglês Recombinant Immunoblot Assay); (b) testes moleculares qualitativos e quantitativos, para detectar e quantificar o RNA do HCV, e (c) testes moleculares de genotipagem (Richter, 2002).

Além destes, a determinação dos níveis de enzimas hepáticas (aminotransferases) no plasma e a avaliação histológica da biópsia hepática são exames utilizados no acompanhamento da evolução da doença e durante a terapia antiviral. A biópsia do fígado é considerada padrão-ouro para o estabelecimento e classificação do estágio da doença hepática, e a classificação da doença é medida pelo número de células inflamatórias mononucleares presentes na área portal e ao seu redor e pelo número de hepatócitos mortos ou que estão em processo de morte (Chen e Morgan, 2006).

### **6.1 Testes Indiretos (Sorológicos)**

A infecção pelo HCV é geralmente diagnosticada pela detecção de anticorpos anti-HCV no plasma ou no soro, utilizando-se ensaios baseados na técnica de ELISA. Por ser um método de fácil execução, esta técnica tem sido amplamente utilizada para triagem do HCV em bancos de sangue e em laboratórios de análises clínicas (Domati-Saad e Scheuermann, 2006).

Porém, existem circunstâncias em que não é possível realizar a detecção de anticorpos anti-HCV, especialmente durante a fase inicial da infecção (período da “janela imunológica”) e em indivíduos imunocomprometidos, os quais podem não desenvolver anticorpos anti-HCV. Sabe-se que somente 50 a 70% dos

pacientes com infecção aguda que desenvolvem sintomas, possuem anticorpos detectáveis naquele momento. No entanto, 90% destes terão anticorpos mensuráveis após um período de 3 meses (Marison *et al.*, 1999). Também é relevante o fato de que embora os métodos sorológicos possam detectar a presença de anticorpos anti-HCV, os quais indicam a presença de infecção, estes não são capazes de discriminar a infecção aguda da crônica ou da remissão da doença (Pawlotsky, 1999).

Uma desvantagem adicional é que resultados falso-positivos podem ocorrer em pacientes com doenças auto-imunes e em neonatos de mães portadoras da hepatite C crônica (Pawlotsky, 2002). Por outro lado, resultados falso-negativos são mais comuns nos primeiros dias após a infecção, em pacientes HIV positivos, em hemodialisados e em pacientes submetidos à quimioterapia (Teixeira *et al.*, 2004).

Embora os testes sorológicos de terceira geração sejam mais sensíveis e específicos, e seus resultados sejam menos influenciados pelos fatores acima citados (Thio *et al.*, 2000), testes imunológicos complementares podem ser usados para discriminar resultados falso-positivos diagnosticados por ELISA, sendo o RIBA (do inglês *Recombinant Immunoblot Assay*) e o LIA (do inglês *Line Immunoassay*) os mais usados (Silva e Niel, 2006). Porém, com o advento dos testes moleculares, ocorreu uma queda significativa na utilização destes ensaios (Pawlotsky, 2002).

## **6.2 Testes Moleculares Qualitativos**

Os testes moleculares diferem dos testes sorológicos, por detectar a presença direta do RNA do HCV, a qual indica realmente que o paciente está infectado pelo vírus. Além disso, através das técnicas moleculares, o RNA viral pode ser detectado no soro do paciente em cerca de 1 a 3 semanas após a exposição ao HCV, período anterior à detecção de anticorpos (Strader *et al.*, 2004).

Sendo assim, os testes qualitativos são utilizados nos casos em que é necessário confirmar a presença do vírus e definir a cronicidade da infecção. No

entanto, embora os ensaios qualitativos sejam bastante sensíveis, é possível que a viremia esteja abaixo do limite de detecção do método (Castillo *et al.*, 2004).

No contexto nacional, a Portaria N°863 de novembro de 2002, estabelece a detecção do RNA viral para a inclusão do portador crônico no protocolo de tratamento do HCV, bem como para a monitorização da resposta virológica durante e no final do tratamento (Ministério da Saúde, 2002). Adicionalmente, a análise qualitativa é recomendada na determinação da infecção aguda (principalmente em casos suspeitos de transmissão) e na avaliação da resposta à terapia antiviral durante e após o tratamento (Sarrazin *et al.*, 2000; Desombere *et al.*, 2005;).

As principais técnicas de detecção do RNA do HCV são a Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase ou simplesmente RT-PCR (do inglês Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) e a amplificação mediada na transcrição, denominada TMA (do inglês Transcription-Mediated Amplification) (Strader *et al.*, 2004). A utilização da técnica da RT-PCR é mais freqüente, sendo que os principais protocolos utilizam a região 5'UTR como alvo, por ser considerada a região mais conservada (Simmonds *et al.*, 2005). Kits comerciais baseados nesta técnica foram aprovados pela FDA (USA) e estão disponíveis atualmente, com as seguintes denominações: *Amplicor® HCV v 2.0*, da empresa *Roche Molecular Systems (Pleasanton, Califórnia)*, *Ampliscreen 2.0*, da mesma empresa e *UltraQual* da empresa *National Genetics Institute (Los Angeles, Califórnia)*. Também existem kits comerciais baseados na tecnologia de TMA. Entre os quais destacam-se: *Versant® HCV RNA Qualitative Assay*, da empresa *Bayer Health Care (Emeryville, Califórnia)* e *Procleix® HIV-1/HCV nucleic acid (TMA) test*, da empresa *Gen-Probe (San Diego, Califórnia)* (Ross *et al.*, 2001; Desombere *et al.*, 2005).

### **6.3 Testes Moleculares Quantitativos**

A quantificação do HCV, por sua vez, constitui um teste importante para o monitoramento da resposta durante e após o tratamento antiviral (Davis, 2002; NIH, 2002). Atualmente é estabelecido que pacientes infectados com genótipo 1 que apresentam uma queda menor que 2 logs nos níveis de carga viral, após 12

semanas de terapia, provavelmente não terão uma resposta viral sustentada, logo o tratamento é cessado, poupando assim os pacientes do alto custo e da toxicidade associada ao longo tempo de terapia (Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002; Torriani *et al.*, 2004).

Similarmente, dados recentes sugerem que pacientes com genótipos 2 e 3 que apresentam níveis indetectáveis de RNA do HCV após 4 semanas de tratamento, podem ser submetidos à um menor tempo de terapia (12 semanas no total), sem comprometer a eficácia da mesma, ao invés de cumprir as 24 semanas de terapia padronizadas anteriormente (Mangia *et al.*, 2005).

O RNA do HCV pode ser quantificado através de uma variedade de metodologias, tais como técnicas baseadas em variações da PCR, como PCR competitivo e PCR em tempo real, através de metodologias baseadas na amplificação de sinal, como a bDNA (do inglês Branched DNA) ou ainda através da técnica de hibridização seguida da amplificação de ácidos nucléicos, denominada NASBA (do inglês nucleic acid sequence-based amplification). Porém, os ensaios quantitativos mais utilizados são o PCR competitivo e o bDNA, os quais estão disponíveis na forma de kits comerciais denominados: *Quantitative RT-PCR Monitor 2.0*, fornecido pela empresa *Roche Molecular Systems (Pleasanton, Califórnia)* e *Versant bDNA 3.0 test*, da empresa *Bayer Health Care (Emeryville, Califórnia)*, respectivamente (Hollingsworth *et al.*, 1996; Lunel *et al.*, 1999; Morishima *et al.*, 2004).

Recentemente, a utilização da técnica de PCR em tempo real (do inglês PCR real time) tem sido considerada vantajosa, por ser rápida, automatizada, confiável e de custo efetivo, representando assim um progresso real nos ensaios de quantificação (Caliendo *et al.*, 2006). Ensaios baseados nesta tecnologia são disponibilizados comercialmente pelas empresas *Roche Molecular Systems (Pleasanton, Califórnia)* e *Abbot Diagnostic (Illinois, USA)* (Barbeau *et al.*, 2004; Konnick *et al.*, 2005).

#### **6.4 Testes de Genotipagem do HCV**

A determinação do genótipo viral é essencial na prática clínica por estabelecer a duração do tratamento e da terapia de escolha (Fried *et al.*, 2002;

Hadziyannis et al., 2004). No Brasil, técnicas de caracterização genotípica são imprescindíveis para o enquadramento dos pacientes ao tratamento antiviral. Logo, para preencher a necessidade clínica, os métodos disponíveis comercialmente devem possibilitar a discriminação fidedigna entre os genótipos (Ministério da Saúde, 2005; Weck, 2005).

O ensaio padrão-ouro para a genotipagem do HCV é o seqüenciamento seguido da análise filogenética, no qual o ácido nucléico viral é amplificado e seqüenciado por técnicas laboratoriais e após uma região específica é comparada através da análise computadorizada. O seqüenciamento de diferentes regiões do genoma (5'UTR, Core, E1, NS3 e NS5) permite a identificação dos principais genótipos, produzindo resultados equivalentes (Majid e Gretch, 2002).

Recentemente, um estudo multicêntrico comparou os resultados de duas diferentes metodologias de seqüenciamento, focadas na região NS5b e 5'UTR do HCV, respectivamente. E os resultados obtidos sugerem que os testes baseados no seqüenciamento da região 5'UTR são capazes de prover informações suficientes para fins clínicos, enquanto a região NS5b é a mais indicada para a identificação dos subtipos, relevante para estudos epidemiológicos e rastreamento de surtos infecciosos (Laperche *et al.*, 2005).

No entanto, embora o seqüenciamento genético de regiões do HCV seja considerado o teste definitivo para definir os genótipos virais, a complexidade do procedimento dificulta a aplicação desta metodologia para o diagnóstico em larga escala. E até mesmo com a introdução de métodos automatizados de seqüenciamento, poucos laboratórios estão devidamente equipados para executar este procedimento (Zein, 2000).

Como alternativa aos laboratórios clínicos, diversos kits encontram-se disponíveis comercialmente. Estes kits baseiam-se na própria técnica de seqüenciamento ou em técnicas de amplificação e hibridização. O *Trugene® 5'NC HCV Genotyping Kit*, da empresa *Bayer Health Care (Emeryville, Califórnia)* é um kit específico para o seqüenciamento do HCV. Já o *INNO-LiPA HCV II*, da empresa *Innogenetics* (Bélgica) ou *Versant® HCV Genotyping Assay*, também da empresa *Bayer Health Care (Emeryville, Califórnia)*, realiza a genotipagem pela hibridização dos produtos da PCR com sondas específicas (Chevaliez e

Pawlotsky, 2006). Entre estes, o *Inno LiPA HCV II* é o mais amplamente disseminado em laboratórios, pois é um teste colorimétrico de fácil execução, que determina o genótipo do HCV através da hibridização reversa de amplicons a sondas específicas para cada genótipo, as quais estão distribuídas em uma tira de nitrocelulose. Outras vantagens desta metodologia são a facilidade de interpretação e o reconhecimento de infecções mistas (presença de múltiplos genótipos). Entretanto, entre as principais desvantagens estão a dificuldade de distinguir alguns subtipos do HCV e os resultados negativos na presença de carga viral baixa (Nolte, 2001; Strader *et al.*, 2004).

O kit comercial *The Invader HCV Genotyping 1.0 (Third Wave Technologiesv (Madison, WI)* é um ensaio desenvolvido recentemente. Este teste promove a diferenciação dos genótipos 1 a 6 baseado na variação de seqüências da região 5'UTR. O teste é em formato de microplacas, e os resultados são obtidos em cerca de 1 hora, porém também não identifica os subtipos, cujas determinações são dispensáveis ao estabelecimento do tratamento (Germer *et al.*, 2006).

Estudos mais recentes têm descrito o PCR em tempo real como uma técnica simples e rápida para a genotipagem do HCV, salientando que a mesma não requer manipulação enzimática ou transferência de material para um novo tubo. Somado a isso, o crescente número de plataformas disponíveis para a PCR em tempo real tem favorecido seu uso, tornando assim esta técnica cada vez mais atrativa (Rolfe *et al.*, 2005; Gunson *et al.*, 2006; Moghaddam *et al.*, 2006).

Embora a utilização da técnica de PCR em tempo real seja uma excelente alternativa para genotipagem do HCV, os custos com a aquisição da plataforma e insumos necessários para a execução diária da mesma permanecem altos para muitos laboratórios de pequeno e médio porte. Logo, técnicas desenvolvidas *in house* são utilizadas nos exames de genotipagem de muitos laboratórios, por apresentarem custos mais acessíveis e fácil implementação e execução na rotina laboratorial.

Os métodos *in house* utilizados costumam empregar a amplificação com oligonucleotídeos específicos ou a análise de Polimorfismos dos Fragmentos de Restrição (RFLP), a qual utiliza enzimas de restrição para determinar o genótipo

do vírus. Neste método, o fragmento de DNA amplificado pela PCR é digerido por enzimas de restrição (endonucleases) em fragmentos de diferentes tamanhos, sendo que estas enzimas reconhecem e clivam sítios específicos para cada genótipo. Os fragmentos resultantes são então separados por eletroforese em gel de agarose, e cada genótipo é reconhecido pelo seu padrão de digestão exclusivo (Davidson *et al.*, 1995; Nolte, 2001).

Além da praticidade e baixo custo, a utilização de ensaios baseados na RFLP já é bem estabelecida para a genotipagem do HCV, sendo que esta vem sendo utilizada em diversos estudos epidemiológicos realizados em diferentes localidades geográficas (McOmish *et al.*, 1994; Krug *et al.*, 1996; Davidson e Simmonds, 1998; Lunge *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2007). No entanto, a utilização desta técnica na prática clínica atualmente é baixa, pois a maior parte dos protocolos existentes propõem uma forma de execução complexa, exigindo um excessivo número de digestões com diferentes enzimas de restrição, além de gerar padrões de interpretação complicada para a correta definição dos genótipos (McOmish *et al.*, 1994; Krug *et al.*, 1996).

## **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Atualmente está bem estabelecida a relevância clínica da determinação do genótipo do HCV nos diversos protocolos de tratamento. No entanto, os testes moleculares atualmente disponíveis para a genotipagem do HCV são complexos, envolvem várias etapas de processamento, tornando o procedimento de análise lento e de difícil execução na prática clínica. Soma-se a este quadro, o alto custo da aquisição de kits comerciais e insumos para a realização destes testes. Como consequência, a oferta de serviços de biologia molecular na rede pública de análise de hepatites virais no Brasil está bastante abaixo da necessidade (Ministério da Saúde, 2002).

O desenvolvimento de um teste de genotipagem fundamentado em uma metodologia simplificada da técnica de PCR-RFLP poderá agilizar e diminuir o custo de todo o procedimento de análise, facilitando sua implementação em laboratórios clínicos e tornando a realização de investigações de genótipos do HCV acessível a um maior número de portadores.

Sendo assim, a presente dissertação de mestrado teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia molecular de genotipagem do HCV, baseada na tecnologia do PCR-RFLP, e realizar uma avaliação da distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul.

**ARTIGO CIENTÍFICO:** Developing a simplified PCR-RFLP method for HCV genotyping standardization in a large cohort of individual from Rio Grande do Sul - Southern Brazil

Este artigo aborda uma metodologia simples para a genotipagem do vírus da hepatite C e está em preparação para ser submetido à publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

**Running Title: A simplified PCR-RFLP for HCV genotyping**

**Developing a simplified PCR-RFLP method for HCV genotyping standardization in a large cohort of individual from Rio Grande do Sul - Southern Brazil**

Elisa Sisti/\*, Vagner Lunge/\*\*\*, Nilo Ikuta/\*\*\*, André S. K. Fonseca/\*\*

Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil\* Simbios Biotecnologia, Canoas, RS, Brasil\*\*

**Corresponding author:**

Vagner Ricardo Lunge – Simbios Laboratório de Diagnóstico Molecular

Av. Miguel Tostes, 101 – Prédio 22 - 3º andar.

92420-280 - Canoas, RS, Brazil.

Phone/fax: (051) 478.2777.

E-mail: lunge@simbios.com.br

---

**Financial support: Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, FINEP (Protocols 0.1.05.0124.00 – 2004 e 0.1.07.0102.00 – 2006) and Simbios Biotecnologia (Canoas, RS, Brazil).**

## **Abstract**

HCV genotypes have to be accurately determined by clinical laboratories because important therapeutic decisions for chronic HCV-related hepatitis are made on the basis of this information. There are several laboratorial techniques for HCV genotyping, including the first described restriction fragment length polymorphism of the 5' non coding region (5'NCR-RFLP), and the most largely used sequencing, considered the gold standard. However, precise, fast and low cost genotyping methods are always required in the clinical laboratories. The aim of the present study was to develop and validate a simplified genotyping methodology using the classical 5'NCR-RFLP of polymerase chain reaction (PCR) amplified products and 3 restriction enzymes. This methodology was used to evaluate 804 HCV-RNA samples and proved to be efficient and specific for the main genotypes found in Brazil (1, 2 and 3). This technique was also used to determine the prevalence and geographic distribution of HCV genotypes in Rio Grande do Sul state. HCV genotype 1 was the most frequent (52,3%), followed by genotype 3 (40,8%) and genotype 2 (6,4%). There was a significant difference in the distribution of genotypes when the metropolitan region was compared with the interior of the state, highlighting the higher frequency of the genotype 2 in the interior (12.3%). The frequencies of HCV genotypes were also different among geographic regions, emphasizing the high frequency of genotype 3 in the Serra (mountains) region (61.5%) and genotype 2 in the Planalto (North) region (33.3%).

**Key words:** HCV genotypes, PCR-RFLP, nucleotide sequencing, HCV prevalence.

## **Introduction**

Hepatitis C virus (HCV) is a well-known agent of liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and approximately 2,2% of the people are infected with this virus around the world (GBD 2004). On the basis of the similarity of nucleotide sequences, HCV is classified into six major genetic groups designated genotypes (1 to 6) distributed worldwide. Genotypes 1, 2, and 3 are present in almost all countries, including Brazil, however the relative prevalence varies from one geographic area to another (Zein 2000, Simmonds 2004).

HCV genotyping is an important tool for the prognosis and follow-up of the infected patients. Viral genotype serves as a guideline for the determination of the interferon-ribavirin combination therapy (Zeuzem 2004). The reference method for genotyping is the sequence analysis of some specific regions of the HCV genome (5'NCR, E1, NS5B) followed by phylogenetic analysis (Simmonds et al. 1995, Pawlotsky 2002). However, in a routine laboratory, simpler, faster and less expensive methods are required (Silva et al. 2007). Some current alternative methods include indirect serological typing (Simmonds et al. 1993), amplification by polymerase chain reaction (PCR) with genotype specific primers (Okamoto et al. 1992), PCR followed by hybridization with type-specific probes (Stuyver et al. 1993) and PCR followed by digestion with restriction enzymes and restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) (McOmish et al. 1994).

The RFLP of the 5' non coding region (5'NCR) of the HCV genome was one of the first assays used in large genotyping studies. In this procedure, the HCV PCR-amplified DNA fragment is digested into fragments with different restriction

enzymes that recognize cleavage sites specific for each genotype (McOmish et al. 1994). Genotyping based on the amplification of this region has the advantage that it can be performed on PCR amplification products obtained from HCV-RNA detection tests (Germer et al. 1999, Erensoy 2001). However, this procedure is not largely used because it is laborious and time-consuming, involving the use of 5 to 6 different restriction enzymes, and is hampered by partial digestions and indeterminate results (McOmish et al. 1994, Davidson et al. 1995, Scott and Gretch, 2007).

The present study aimed to develop and validate a simplified PCR-RFLP method, based in a workflow procedure using only 3 restriction enzymes (*Hinf* I, *Bst*N I and *Hae* III), for the genotyping of HCV Brazilian samples. This methodology was then used to evaluate the geographical distribution of the HCV genotypes in Rio Grande do Sul state (Southern Brazil).

## **Materials and Methods**

This project was approved by the Ethical Committee of the Universidade Luterana do Brasil (Canoas, RS, Brazil).

## **Sequences and Comparative analysis**

A total of 1.080 HCV 5' non coding region (NCR) nucleotide sequences (accession numbers EF558854-EF558890, EF564603-EF564609, EF571224-EF571247, AY306229-AY306686, AY309974-AY310119 and AY310921-AY311334) were retrieved through the Entrez service from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD database. These sequences

were obtained in previous HCV genotypes prevalence studies with 1.080 different HCV infected patients from different states of the 5 geographic regions from Brazil (Campiotto et al. 2005, Silva et al. 2007). Further, 26 reference sequences from different genotypes (according consensus proposals) were retrieved for comparative analysis (Simmonds et al. 2005).

Sequences were edited and aligned using EditSeq and MegAlign (option Clustal method) programs from the DNASTAR package (LaserGene Inc., Madison, WI, USA). The presence of the sites for 6 different restriction enzymes (*Hae III*, *Hinf I*, *BstN I*, *Rsa I*, *BfuC I* and *BstU I*) were analyzed using Mapdraw program from the DNASTAR package (LaserGene Inc., Madison, WI, USA). The predicted banding patterns were defined for the HCV genotypes.

## **Samples**

The first group of samples included a panel of 20 HCV-positive plasma samples from patients attended in a commercial laboratory (Weimann Laboratories, Porto Alegre, RS, Brazil) previously genotyped by sequencing, performed on an automatic DNA sequencer (Applied Biosystems Inc., CA, USA).

The second group was composed by 804 HCV-positive consecutive plasma samples analyzed in the routine service of a molecular diagnostic laboratory (Simbios Biotecnologia, Canoas, RS, Brazil). These samples were collected from different patients and sent to Laboratorio Simbios by clinical laboratories from different cities of Rio Grande do Sul state (n=698) and other states (n=106) in 2007 and 2008. All samples were stored at -20°C until use.

## **RNA extraction and nested RT-PCR**

RNA was purified from 100 µl of plasma by a silica RNA extraction method adapted from Boom et al. (1990). Briefly, 100 µL of plasma sample was added to 900 µL of lysis buffer in a micro-tube and incubated at room temperature for 10 min. After, 20 µL of silica particles suspension was added to each micro-tube, vortexed 2-fold and centrifuged at 10,000 rpm for 30 sec. The pellet was washed twice with 1.0 ml of washing solution, twice with 1.0 ml of 75% ethanol and once with 1.0 ml of acetone. After the last centrifugation step, the supernatant was removed and the pellet was dried at 56-60°C for 15 min. RNA was eluted with 50µl of elution buffer and the tube was incubated at 65°C for 5 min. The RNA solution was separated of the silica particles centrifuging at 10,000 rpm for 3 min.

Reverse transcription and the first-round of PCR amplification (RT-PCR) was performed in a 20 µl reaction volume using 14,5 µl of a mastermix solution (final concentration of 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM DTT, 1 mM dNTPs and 2.0 µM of the primers 5' - CCC CTG TGA GGA ACT WCT GTC TTC ACG C -3' and 5' - 5' - AGG TTT AGG ATT TGT GCT CAT - 3'), 24 U of MMLV-RT (Invitrogen, USA), 4 U RnaseOut (Invitrogen, USA), 1 U Taq DNA polymerase (Cenbiot Enzimas, RS, Brazil) and 5 µl of extracted RNA. The RT-PCR amplification was performed with 30 min at 37°C followed for 15 cycles with cycling temperatures and times of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 60 sec. A final extension step of 72°C for 7 min was also included. A nested PCR (second round of amplification) was carried out in a 30 µl reaction volume using 28,6 µl of a mastermix solution (final concentration of 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase, 0.5 µM of the

primers 5'- GAA AGC GYC TAG CCA TGG CGT TAG -3' and 5'- ACG GTC TAC GAG ACC TCC CGG GGC -3'). The PCR amplification was carried out for 45 cycles with 2 cycling temperatures and times: 94°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. Positive and negative samples were added as controls in all steps.

### **5'NCR region genotyping**

Genotyping of all HCV positive RNA samples was performed by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) procedure adapted of the original method described by McOmish et al. (1994). Briefly, 3 restriction enzymes were used in 2 separate digestion systems for the cleavage of each nested PCR product. The first system consisted in a single digestion of a 2µl aliquot of the amplified fragment with 2 U of *Hae* III in the respective buffer (NEBuffer 2) (New England Biolabs, USA). The second one was a double digestion of 2µl aliquot of the amplicon with 2 U of *Hinf* I and *Bst*N I in an appropriate buffer for both restriction enzymes (NEBuffer 2) (New England Biolabs, USA). The first system was incubated for 1h at 37°C and the second system was incubated for 1h at 37°C following 1h at 60°C.

Amplicons of 21 samples were submitted to restriction digestion with 3 other enzymes: *Rsa* I (Promega, USA), *Bfu*C I and *Bst*U I (New England Biolabs, USA). Single digestion reaction systems were prepared using 2µl aliquot of the amplified fragment with 2 U of the respective enzyme and the appropriate buffer as follow: *Rsa* I – Buffer C (Promega, USA); *Bfu*C I and *Bst*U I - NEBuffers 4 and 2, respectively (New England Biolabs, USA). All the 3 systems were incubated for 1h at 37°C.

Digested products were separated by electrophoresis on a 12,5% polyacrylamide gel and visualized by rapid silver staining (Sanguinetti et al. 1994). The banding patterns for the different HCV genotypes were deduced from those previously established by analysis of the 5' NCR sequences obtained from genes databases (previously described). The genotypes were then identified according to previous denomination (Simmonds et al. 2005).

### **Statistical analysis**

The HCV genotypes of the samples from Rio Grande do Sul state were evaluated according to the region of sample collection. The genotype prevalence among different regions of the state was compared using Pearson chi-square test and the alternative chi-square test described by Roff & Bentzen (1989). Differences were considered to be statistically significant when the P value was < 0.05.

## **Results**

### **Prediction of RFLP patterns and HCV typing method**

On the basis of the alignment, the 1.080 NCBI sequences were evaluated and genotype specific RFLP patterns were searched in silico. In principle, the differentiation of the 3 main genotypes (1, 2 and 3) present in Brazil could be performed using a double digestion with 2 restriction enzymes (*Bst*NI + *Hinf* I). Theoretically all the genotype 3 samples would present specific banding patterns with a fragment of 165 bp-fragment, while almost all genotype 1 samples (98,13%)

would present specific banding patterns with a 117 bp-fragment and the majority of the genotype 2 samples (94,55%) a 221 bp-fragment (Table 1).

However, it would not be possible to identify eventual genotype 4 and 5 HCVs using only this restriction enzymes combination, because these samples would present the 165 and 221 bp-fragments, respectively. Further, a significant proportion (5,5%) of the sequenced genotype 2 samples presented a 117 bp-fragment, characteristic of the genotype 1 samples. In this sense, the prediction patterns using 4 other restriction enzymes (*Hae* III, *Rsa* I, *Bfu*C I and *Bst*U I) were evaluated. The combined use of restriction enzyme *Hae* III was informative to differentiate genotype 2 samples from genotype 1 and 5 samples. In the same way, *Hae* III could be used to differentiate the majority of genotype 3 samples from eventual genotype 4 samples. Only a small proportion (20%) of the genotype 3 samples should be further characterized with other restriction enzymes (*Rsa* I, *Bfu*C I and *Bst*U I) to differentiate from genotype 4. The Table 1 demonstrate the predicted patterns using the combination of *Bst*N I + *Hinf* I double digestion and *Hae* III single digestion for the HCV Brazilian sequences.

Based on these results, it was defined the following workflow to genotype HCV: *Bst*N I + *Hinf* I double digestion and *Hae* III single digestion in a first round for all samples. Samples with indeterminate patterns in the first round should be further digested with *Rsa* I, *Bfu*C I and *Bst*U I restriction enzymes in a second round.

### **Validation of RFLP assay for HCV genotyping**

To validate the workflow proposed in this study, we performed a blind study comparing RFLP analysis and nucleotide sequencing for 20 random samples

provided by a clinical laboratory. The RFLP results with the 2 separate digestion systems (the double digestion with *Hinf* I + *Bst*N I and the single digestion with *Hae* III) showed 9 samples with the main genotype 1 predicted pattern (denominated A), 9 samples with the main genotype 3 predicted pattern (denominated B), 1 sample with one of the main genotype 2 predicted patterns (denominated C) and 1 sample with a pattern not predicted (denominated D) (Figure 1A). All the 19 samples of the genotypes 1, 2 and 3 had the same genotyping result with 5'NCR sequencing. The RFLP pattern of the remaining sample was not previously observed. Digestions with the 3 other restriction enzymes (*Rsa* I, *Bfu*C I and *Bst*U I) were performed and the banding pattern was similar to genotype 2 (data not shown). The sequencing result and the subsequent phylogenetic analysis showed similarity to genotype 2c.

This methodology was then used in the analysis of 804 consecutive HCV-RNA positive samples. The most common predicted patterns were observed in the great majority of the samples: 445 typical genotype 1 with A pattern, 303 typical genotype 3 with B pattern and 35 typical genotype 2 with C pattern. There was no sample with the previously observed genotype 2 with D pattern.

The remaining 21 samples presented 5 different patterns denominated E, F, G, H and I (Figure 1B). There were 7 samples presenting E pattern and 5 samples presenting F pattern (these both patterns are typical of genotype 2, according to Table 1). There was only 1 sample presenting the G pattern (common to genotypes 1, 2 and 5), 4 samples presenting H pattern (common to genotypes 3 and 4) and 4 samples presenting I pattern (in principle, characteristic of genotype 1). All these samples were submitted to additional digestions with the other 3

restriction enzymes (*Rsa* I, *BfuC* I and *BstU* I). The banding patterns with these new enzymes were typical of genotype 2 for all samples with patterns E, F and G and typical of genotype 3 for the 4 samples with pattern H. Finally, among the 4 samples with pattern I, 2 presented banding patterns characteristic of genotype 2 and 2 of genotype 1 (data not shown).

### **HCV genotype prevalence and distribution in Rio Grande do Sul state**

Among the 804 analyzed samples, 698 were collected of patients from 22 different cities of Rio Grande do Sul and 106 were originated from cities of other Brazilian states. The results of the samples from Rio Grande do Sul were evaluated to determine the HCV genotype prevalence and geographic distribution.

It was demonstrated the presence of the 3 main genotypes (1, 2 and 3) with the highest frequency of the genotype 1 (365 samples - 52,3%), followed by genotype 3 (285 samples - 40,8%) and genotype 2 (45 samples - 6,4%). As shown in Table 2, the distribution of HCV genotypes was statistically different between the metropolitan area and the interior: genotype 1 was the one most frequently found in both regions with similar frequencies (53.2% and 50.5%, respectively), genotype 3 is the second more prevalent, but with a relative higher frequency in the metropolitan area (42,3% versus 37.3%) and genotype 2 is the less prevalent, with a significant higher prevalence in interior (12,3% versus 4,5%) ( $P < 0.01$ ).

To further characterize the distribution of the HCV genotypes in the Rio Grande do Sul, only regions with a minimum of 10 samples were considered and consequently the Campanha region (West) was excluded of the analysis (Table 2). When the capital and other cities of the Metropolitan area were compared, it was

observed that the HCV genotypes prevalence is similar with no significant differences ( $p < 0.01$ ). On the other hand, HCV genotypes distribution is significant different in the 4 regions in the interior with more than 10 samples analysed ( $p < 0.01$ ). In 2 regions (Center and Southeast), genotype 1 was the most prevalent with similar frequencies of the Metropolitan area (53.7% and 54.8%, respectively), however the frequency of genotype 2 was higher (11.1% and 7.3%, respectively) and genotype 3 lower (39.0% and 34.1%) than in the capital and surrounding area. In Planalto region (North), the distribution was the most equilibrated among the 3 genotypes (38.1% for genotype 1, 33.3% for genotype 2 and 28.6% for genotype 3). And in Serra region (Mountains), genotype 3 was the most prevalent (61.5%), followed by genotype 1 (30.8%) and 2 (7.7%).

## **Discussion**

Several methods have been used for assessing HCV genotypes in the clinical laboratories. The gold standard technique is sequencing of one or more genes of the HCV genome (mainly 5'NCR, core, E1, NS3 and NS5) and comparison by computer analysis to the established genotypes (Scott & Gretch 2007). This approach is considered too expensive and time-consuming for large-scale diagnostic and it has not been largely used in the majority of the clinical laboratories (Anderson et al. 2003).

There are also some commercial available genotyping tests, as the Invader assay (Third Wave, WI, USA), Trugene 5'NC and INNO-LiPA HCV II test (Bayer Diagnostics, NY, USA). The INNO-LiPA™ test is the most used in the clinical laboratories, although the procedure involves multiple steps, is time-consuming

and expensive (Bullock et al. 2002). Further, 2 serologic methods, recombinant immunoblotting (Chiron RIBA) and an ELISA (Abbot Murex), have been successfully used to detect genotype-specific antibodies (Gault et al. 2003). Concordance between these methods and sequencing has been good as assessed by various studies (Halfon et al. 2001, Schröter et al. 2001, Anderson et al. 2003, Germer et al. 2006).

The RFLP of the 5' "non coding region" (5'NCR RFLP) of the HCV genome was the first genotyping method used for large-scale epidemiological studies (McOmish et al. 1994, Davidson et al. 1995). Afterwards, it was the preferential method for routine HCV genotyping in clinical laboratories for some years, but its use declined with increasing automation of the sequencing methods and availability of commercial kits. Nowadays, this methodology have a limited use, because it is considered laborious / time-consuming (involving several steps of restriction enzyme digestions) and difficult to evaluate (mainly when the banding patterns are visualized in ethidium bromide gels). The technique is also hampered by partial digestions and indeterminate results (Scott & Gretch 2007).

In this study, we proposed a simplified PCR-RFLP procedure for HCV genotyping using only 3 restriction enzymes in 2 digestion systems. The analysis of the 1.080 available HCV sequences from different Brazilian regions demonstrated that only 4 RFLP banding patterns (A, B, C and E), characteristic of the 3 main genotypes (1, 2 and 3), would be obtained using these 2 systems in the great majority of the HCVs present in Brazil. Samples presenting different banding patterns (D, F, G, H, I or any other) should be confirmed by the complete set of restriction enzymes or submitted to sequencing. This procedure could also identify

genotypes 4 and 5 (patterns H and G, respectively), rarely detected in Brazil (Campiotto et al. 2005).

Concordance between this RFLP procedure and direct nucleotide sequencing was observed in the analysis of 20 HCV-RNA positive samples. A total of 19 samples presented the characteristic banding patterns for the 3 main genotypes (1, 2 and 3) and only one sample produced an indeterminate RFLP pattern that should be confirmed. The subsequent analysis of 804 HCV-RNA positive samples demonstrated that the 5 most frequent banding patterns (A – genotype 1, B – genotype 3, C, E and F – genotype 2) were found in 795 amplified products, corresponding to 98.9% of all possible patterns. Only 9 samples (1.1%) had to be confirmed with the other restriction enzymes to determine the HCV genotype. With this additional procedure, all samples (100%) were genotyped, without indeterminate results. This RFLP procedure is certainly easier and less laborious than the original method (McOmish et al. 1994, Davidson et al. 1995). Further, the banding patterns are clear and the identification is easy to perform in a routine service (Figure 1).

Epidemiological surveys in different population groups throughout Brazil is necessary to know the frequency and distribution of the HCV genotypes, providing key information to understand the spread of HCV as well as to furnish subsidies for treatment guidelines (Campiotto et al. 2005). However, available data of genotypes usually refer to large centers (Focaccia et al. 1998, Paraná et al. 2000, Vogler et al. 2004, Silva et al. 2005, Martins et al. 2006, Silva et al. 2006, Espírito-Santo et al. 2007).

In this study, HCV genotypes prevalence and geographic distribution in Rio Grande do Sul state was demonstrated. First, our study reinforces that genotypes 1, 2 and 3 are the only ones present in Rio Grande do Sul state and the prevalence is almost the same of other previous studies (Krug et al. 1996, Silva et al. 2007). Second, it was demonstrated that the genotypes prevalence is significant different when the metropolitan area is compared to the remaining of the state. Third, there are significant prevalence differences among the main regions of the state. All these findings are relevant for the better planning of the care policies, mainly because the HCV therapy must change according to the genotype (Rolfe et al. 2005, NIH 2002, Heathcote & Main 2005).

Although the technique used in this study is not the most appropriate for epidemiological studies (Cantaloube et al. 2006), some epidemiological evidences were also observed. There was an unexpected high prevalence of genotype 2 (33.3%) in Planalto region (North) of the state, mainly in the cities of Passo Fundo and Marau, and a high prevalence of genotype 3 in the Serra region (Mountains), mainly in the city of Caxias do Sul. This could indicate that the HCV had specific sources for transmission in these regions, different of the other regions. More studies should be conducted to investigate this hypothesis.

In summary, the present RFLP assay is accurate, easy to perform and suitable for routine HCV genotyping in clinical diagnostic laboratories. In addition, the data about the HCV genotypes distribution in Rio Grande do Sul can help in the definition of better strategies to prevention and treatment of the hepatitis C disease.

**Acknowledgements**

To Weinmann Laboratorios for providing HCV-RNA samples and the respective nucleotide sequencing data.

## References

Anderson JC, Simonetti J, Fisher DG, Fisher J, Williams Y, Yamamura N, Rodriguez DG, Sullivan DR, Gretch B, McMahon, Williams KJ 2003. Comparison of different HCV viral load and genotyping assays. *J Clin Virol* 28:27 – 37.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dilen PME, Van der Noorda J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503.

Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM 2002. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. *Clin Chem* 48(12):2147-2154.

Cantaloube JF, Laperche S, Gallian P, Bouchardeau F, Lamballerie X de, Micco P de. Analysis of the 5'Noncoding Region versus the NS5b Region in genotyping Hepatitis C Virus Isolates from Blood in France. *J Clin Microbiol* 44: 2051-2056.

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, Pereira LMMB, Coelho HSM, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CMC, Bernardini AP 2005. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 38: 41-48.

Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follet EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA et al.1995. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 76: 1197–1204.

Erensoy S 2001. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *J Clin Virol* 21: 271-281.

Espírito-Santo MP, Carneiro MAS, Reis NRS, Kozlowski AG, Teles SA, Lampe E, Yoshida CFT, Martins RMB 2007. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Braz J Med Biol Res* 40(4):545-550.

Focaccia R, da Conceição OJ, Sette-Jr H, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenço R, Vieira De Souza F, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Sáez-Alquézar A, Riscal JR, Fischer D 1998. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz J Infect Dis* 2: 269-284.

Gault EP, Soussan Y, Morice L, Sanders A, Berrada B, Deny R, Deny P 2003. Evaluation of a new serotyping assay for detection of anti-hepatitis C virus type-specific anti-bodies in serum samples. *J Clin Microbiol* 41: 2084-2087.

GBD- Global burden of disease for hepatitis C 2004. *J Clin Pharmacol* 44: 20-29.

Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH 1999. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 37: 2625-2630.

Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca ASK, Cheinquer H, Ozaki LS, Barros SGS 1996. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 29: 1629-1632.

Hadziyannis SJ, Koskinas JS 2004. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. *Hepatol Res* 29(3):129-135.

Halfon P, Trimoulet M, Bourliere H, Khiri V de Ledinghen, Couzigou JM, Feryn P, Alcaraz C, Renou H, Fleury and D Ouzan 2001. Hepatitis C virus genotyping

based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol* 39: 1771-1773.

Heathcote J, Main J 2005. Treatment of hepatitis C. *J Viral Hep* 12: 223-235.

Martins RMB, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro ARC, Souto FJD, Mussi A, Amorim RMS, Martins CRF 2006. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 53-55.

McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi GA, Héjjas M, Kiyokawa H, Fukada K, Cuypers T, Saeed AA, Al-Rasheed AM, Lin M, Simmonds P 1994. Geographical distribution of Hepatitis C virus genotypes in blood donors: an International collaborative survey. *J Clin Microbiol* 32: 884-892.

NIH-National Institute of Health, Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C 2002. *Hepatology* 36 (Suppl. 1): S3-20.

Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M 1992. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73: 673-679.

Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcante A, Lyra L, Trepo C 2000. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol* 37: 213-216.

Pawlotsky JM 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36: S65-S73.

Roff D.A and P. Bentzen. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms:  $\chi^2$  and the problem of small samples. *Mol Biol Evol* 6:539-545.

Rolfe KJ, Alexander GJM, Wreghitt TG, Parmar S, Jalal H, Curran MD 2005. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol* 34(2):115-21.

Sanguinetti CJ, Dias N, Simpson AJG 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17 (5): 915-919.

Schröter M, Zollner B, Schafer P, Laufs R, Feucht HH 2001. Comparison of three HCV genotyping assays: a serological method as a reliable and inexpensive alternative to PCR based assays. *J Clin Virol* 23: 57-63.

Scott JD, Gretch DR. Hepatitis C and G Viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Eds) 2007. Manual of Clinical Microbiology. Whashington: ASM Press, 2:1437- 1451.

Silva LK, da Silva MBS, Lopes GB, Rodart IF, Costa FQ, Santana NP, Paraná R, Santana A, Reis MG 2005. Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the state of Bahia, Northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(6):496-502

Silva LK, Silva MBS, Rodart IF, Lopes GB, Costa FQ, Melo ME, Gusmão E, Reis, MG 2006. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 39: 595-602.

Silva CM, Costi C, Krug LP, Ramos AB, Grandi T, Gandolfi VL, Menezes ME, Ocampos M, Niel C, Rossetti ML 2007. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(7):867-70.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74: 2391-2399.

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

Simmonds P 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus . 15 years on. *J Gen Virol* 85: 3173-3188.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962–973.

Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, Maertens G 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 74:1093-102.

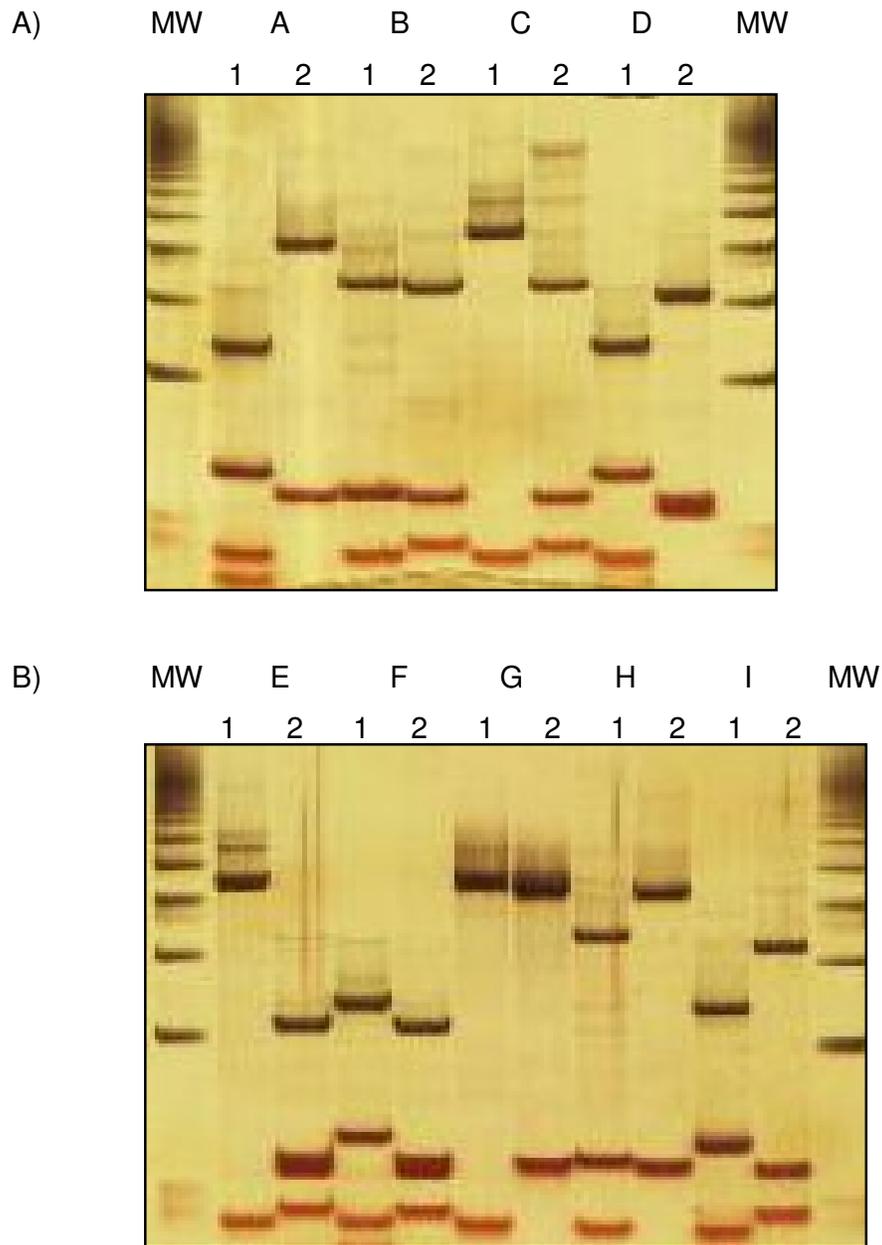
Vogler IH, Nishiya A, Morimoto HK, Reiche EMV, Bortoliero AL, Matsuo T, Sabino EC, Vaz AJ 2004. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 46: 303-308.

Zein NN 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13: 223-235.

Zeuzem S 2004. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 140:370–381.

**TABLE 1. Frequency of HCV restriction patterns found in the samples of the different genotypes, originated from the NCBI sequences**

<b>Genotype</b>	<b>Predicted fragment lengths with <i>Bst</i>NI + <i>Hinf</i>I and <i>Hae</i> III</b>		<b>n (%*)</b>	<b>Banding patterns</b>
<b>1</b>	221/45	208/58	1 (0,14)	G
	163/58/45	160/58/48	1 (0,14)	-
	158/63/45	208/58	9 (1,29)	-
	158/63/45	266	1 (0,14)	-
	117/63/45/41	208/58	662 (95,11)	A
	117/63/45/41	160/58/48	6 (0,86)	I
	117/63/45/41	266	7 (1,01)	-
	117/63/45/32/9	208/58	1 (0,14)	-
	117/60/45/41/3	208/58	3 (0,43)	-
	117/57/45/41/6	208/58	1 (0,14)	-
	117/47/45/41/16	208/58	1 (0,14)	-
	117/108/41	208/58	1 (0,14)	-
	117/104/45	208/58	1 (0,14)	-
	69/63/48/45/41	208/58	1 (0,14)	-
<b>2</b>	221/45	208/58	12 (21,82)	G
	221/45	160/58/48	20 (36,36)	C
	221/45	104/58/56/48	19 (34,55)	E
	221/45	152/58/56	1 (1,82)	-
	117/63/45/41	114/104/48	1 (1,82)	-
	117/63/45/41	104/58/56/48	1 (1,82)	F
	117/104/35	104/58/56/48	1 (1,82)	-
	117/63/45/41	152/58/56	-	D
117/63/45/41	160/58/48	-	I	
<b>3</b>	165/56/45	218/48	2 (0,61)	-
	165/56/45	208/58	66 (20,25)	H
	165/56/45	160/58/48	252 (77,30)	B
	165/56/45	132/76/58	1 (0,31)	-
	165/45/34/22	160/58/48	1 (0,31)	-
	165/101	208/58	2 (0,61)	-
	165/101	160/58/48	1 (0,31)	-
	165/101	266	1 (0,31)	-
<b>4</b>	165/56/45	208/58	1 (100)	H
<b>5</b>	221/45	208/58	1 (100)	G



**Figure 1. Silver stained polyacrilamide gels showing the different banding patterns obtained in the validation of the methodology (A) and in the analysis of the 804 clinical samples (B). The numbers indicate the digestion**

system (1=*Hinf* I + *Bst*NI and 2= *Hae* III), the letters indicate the banding patterns (A, B, C, D, E, F, G, H and I) and the 50-bp molecular weight (MW).

**TABLE 2. Distribution of Hepatitis C virus genotypes in different regions of the Rio Grande do Sul state, Brazil, 2007-2008**

Geographic Region	Genotype			Total
	1	2	3	
<b>Metropolitan Area</b>	<b>263 (53,2%)</b>	<b>22 (4,5%)</b>	<b>209 (42,3%)</b>	<b>494</b>
Porto Alegre (Capital)	224 (53.3%)	19 (4,5%)	177 (42.1%)	420
Others cities	39 (52.7%)	3 (4.0%)	32 (43.2%)	74
<b>Interior</b>	<b>103 (50,5%)</b>	<b>25 (12,3%)</b>	<b>76 (37,3%)</b>	<b>204</b>
Planalto (North)	8 (38.1%)	7 (33.3%)	6 (28.6%)	19
Campanha (West)	0	0	3 (100.0%)	3
Centro (Center)	22 (53.7%)	3 (7.3%)	16 (39.0%)	41
Sudeste (Southeast)	69 (54.8%)	14 (11.1%)	43 (34.1%)	126
Serra (Mountains)	4 (30.8%)	1 (7.7%)	8 (61.5%)	13
<b>Total</b>	<b>366 (52.4%)</b>	<b>47 (6.7%)</b>	<b>285 (40.8%)</b>	<b>698</b>

## DISCUSSÃO

A determinação do genótipo do HCV para o planejamento do tratamento dos pacientes portadores da doença é etapa importante na prática médica atual. O genótipo viral é um marcador da probabilidade de resposta à terapia combinada de interferon peguilado e ribavirina, sendo utilizado como diretriz para o estabelecimento da duração da terapia. A genotipagem também é essencial na investigação de rotas de infecção e para a compreensão da epidemiologia e características do vírus (Zeuzem, 2004; Murphy *et al.*, 2007).

Diversos métodos focados nas diferentes regiões do genoma têm sido usados para a determinação dos genótipos, sendo que o sequenciamento de regiões genômicas é considerado o mais preciso, permitindo a discriminação dos tipos e subtipos do HCV (Nolte, 2001; Pawlotsky, 2002). No entanto, esta tecnologia apresenta um custo alto para implantação em laboratórios clínicos, na medida em que requer a aquisição do equipamento de seqüenciamento automatizado.

A técnica de RFLP é uma alternativa atraente de genotipagem, pois requer uma estrutura laboratorial mais simples do que a necessária para análises de seqüenciamento. Técnicas eficientes de genotipagem baseadas na utilização da RFLP foram previamente desenvolvidas (McOmish *et al.*, 1994 e Davidson *et al.*, 1995) e têm sido utilizadas no nosso meio há vários anos (Krug *et al.* 1996; Lunge *et al.*, 1999; Silva *et al.* 2007). No entanto, a utilização intensiva do seqüenciamento automatizado e a disponibilização de um número crescente de kits comerciais (baseados em outras técnicas) estão reduzindo seu uso nas rotinas laboratoriais. O conceito corrente é que a técnica de PCR-RFLP é de execução complexa e a interpretação dos padrões de bandas obtidos é difícil, além de serem necessárias diversas etapas de digestão que seguidamente originam digestões parciais e resultados indeterminados (Scott & Gretch, 2007).

No presente estudo, a análise *in silico* de 1.080 seqüências genômicas da região 5'NCR de HCVs provenientes de amostras de diferentes regiões do Brasil demonstrou que, avaliando-se os sítios para 3 enzimas de restrição (*Hae* III, *Hinf* I e *Bst*NI), apenas 4 padrões de restrição (RFLP) estariam relacionados com a grande maioria dos HCVs caracterizados no Brasil,. Estes padrões são

característicos dos genótipos 1 (A), 2 (C e E) e 3 (B), que são os principais genótipos presentes no Brasil. Outros padrões para estes mesmos genótipos também podem ocorrer, mas são mais raros. Entre estes, estão alguns padrões (H e G), que podem também ser de outros genótipos previamente encontrados no Brasil (4 e 5, respectivamente). Alguns HCVs do genótipo 3 podem apresentar o padrão H, enquanto HCVs dos genótipos 1 e 2 podem apresentar padrão G. Nestes casos deve ser realizada a caracterização com maior número de enzimas ou mesmo a realização do seqüenciamento da própria região 5'NCR.

A utilização prática do protocolo simplificado de RFLP para a genotipagem do HCV, baseado na digestão dos amplicons de HCV com as 3 enzimas de restrição citadas distribuídas em 2 sistemas de digestão, possibilitou a determinação precisa do genótipo de 19 amostras de um total de 20, quando foi realizada a análise comparativa com a técnica de seqüenciamento. A posterior utilização desta técnica na avaliação de um grande número de amostras, demonstrou a ocorrência de 5 padrões de bandejamento mais freqüentes (A – genótipo 1, B – genótipo 3, C, E e F – genótipo 2) em 795 (98,9%) de um total de 804 amostras positivas para o HCV. Por esta técnica, apenas 9 amostras (1.1%) precisaram ser confirmadas com outras enzimas de restrição para determinar o genótipo do HCV.

Sendo assim, é possível concluir que o procedimento é mais fácil, rápido e menos laborioso do que o método proposto originalmente (McOmish *et al.*, 1994; Davidson *et al.*, 1995). A técnica é capaz de diferenciar os principais genótipos encontrados no Brasil, que possuem importância clínica, constituindo assim, uma metodologia confiável para a utilização na rotina laboratorial. Conforme destacado previamente, este tipo de exame apresenta a grande vantagem de poder ser utilizado também em laboratórios de pequeno a médio porte, situados em regiões descentralizadas, diminuindo o período necessário para análise e provavelmente os custos dos exames.

Deve-se salientar que a determinação dos padrões de restrição específicos para os genótipos 4 e 5 ainda é preliminar, uma vez que uma reduzida quantidade de seqüências oriundas do Brasil foram encontradas. Esta limitação também vale para o genótipo 6, o qual não possui seqüências genômicas descritas no Brasil.

Por outro lado, além do fato destes genótipos não possuírem grande importância clínica, estes também não são endêmicos em nosso país, sendo relevantes principalmente no Oriente Médio, África do Sul e Ásia (Simmonds *et al.*, 2005).

A metodologia também foi empregada na análise da prevalência e distribuição regional dos diferentes genótipos no estado do Rio Grande do Sul. Na avaliação de 698 amostras positivas para o HCV, provenientes de diferentes cidades do estado, foi demonstrada a predominância do genótipo 1 (52,3%), seguida pelos genótipos 3 (40,8%) e 2 (6,4%), confirmando os dados obtidos em 2 estudos prévios (Krug *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2007). A predominância do genótipo 1 encontrada no estado tem uma importância particular, porque este genótipo é mais resistente ao tratamento combinado de interferon peguilado e ribavirina do que os genótipos 2 e 3 (NIH 2002; Heathcote & Main 2005).

A distribuição dos genótipos nas regiões geográficas é variada. Já na comparação da Região Metropolitana com o restante do Estado, verifica-se uma frequência significativamente mais elevada do genótipo 2 no interior (12,5%). A mais alta frequência do genótipo 2 é observada na região do Planalto, mais especificamente na cidade de Passo Fundo e arredores, onde 33,3% dos indivíduos HCV-RNA positivos são portadores deste genótipo. Da mesma forma, uma alta prevalência do genótipo 3 foi encontrada na Serra, principalmente na cidade de Caxias do Sul. Embora sejam necessários estudos mais específicos, acredita-se que as altas prevalências dos genótipos 2 e 3 encontradas possam estar relacionadas a características epidemiológicas locais, derivadas da colonização étnica, ou da presença de fontes de transmissão específicas naquelas regiões. Sabe-se, por exemplo, que a região do Planalto é composta por número significativo de imigrantes da região Norte da Itália, que é caracterizada por elevadas prevalências do genótipo 2 (Mazzeo *et al.*, 2003). Uma outra possibilidade considerada é a existência de uma fonte de transmissão específica naquela região, como ocorreu no Egito, onde o tratamento da esquistossomose com drogas endovenosas disseminou o genótipo 4 em toda a população (Pybus *et al.*, 2003).

Entretanto, as altas prevalências dos genótipos 2 e 3 encontradas na região do Planalto e na região Serrana possuem aspectos positivos,

principalmente relacionados à duração e custos do tratamento, pois uma taxa de resposta viral sustentada de 70-80% é observada nestes casos, utilizando-se baixas doses de ribavirina em somente 24 semanas de tratamento (Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.* 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004).

Estudos de epidemiologia de HCV no interior ainda são raros. A grande maioria dos dados de prevalência de genótipos do HCV é de grandes centros urbanos (Focaccia *et al.*, 1998; Paraná *et al.*, 2000; Vogler *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Espírito-Santo *et al.*, 2007). A correta compreensão da distribuição do HCV nas diferentes regiões do país é relevante para o melhor planejamento de políticas de saúde, uma vez que o tratamento do HCV é caro e, em muitos casos, demorado. As informações geradas certamente vão auxiliar na compreensão da disseminação do HCV, além de fornecer importantes subsídios para a elaboração de políticas assistenciais, preventivas e diretrizes de tratamento (Campiotto *et al.*, 2005).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACIOGLU, Y.H., BACAŞIZ, F., BAHAR, İH., SIMMONDS, P. Molecular evidence of nosocomial transmission of hepatitis C virus in a haemodialysis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.19, p.182-186, 2000.

ALTER, M.J., KRUSZON-MORAN, D., NAINAN, O.V., et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*, p.341(8), v.556-562, 1999.

ALTER, M.J., HUTIN, Y.J., ARMSTRONG, G.L. Epidemiology of hepatitis C. In: LIANG, T.J.; HOOFNAGLE, J.H. (Eds.). *Hepatitis C*. San Diego: Academic Press, p.169-183, 2000.

ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, v.13(17), p. 2436-2441, 2007.

ANDRADE, A.F., OLIVEIRA-SILVA, M., SILVA, S.G., MOTTA, I.J., BONVICINO, C.R. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101(6), p.673-676, 2006.

ARMSTRONG, G.L., WASLEY, A., SIMARD, E.P., MCQUILLAN, G.M., KUHNERT, W.L., ALTER, M.J. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med*, v.144, p.705-714, 2006.

ASCIONE, A., TARTAGLIONE, M.T., DI COSTANZO, G.G. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis*, v.39, p.S4-S7, 2007.

BARBEAU, J.M., GOFORTH, J., CALIENDO, A.M., NOLTE, F.S. Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. *J Clin Microbiol*, v.42(8), p.3739-3746, 2004.

BELLENTANI, S., TIRIBELLI, C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol*, v.35(4), p.531-537, 2001.

BRANDÃO, A.B., FUCHS, S.C. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study. *BMC Gastroenterol*, v.2, p.1- 8, 2002.

BRASS, V., MORADPOUR, D., BLUM, H.E. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J. Med. Sci*, v.3(2), p.29-34, 2006.

CALIENDO, A.M., VALSAMAKIS, A., ZHOU, Y., YEN-LIEBERMAN, B., ANDERSEN, J., YOUNG, S., FERREIRA-GONZALEZ, A., TSONGALIS, G.J., PYLES, R., BREMER, J.W., LURAIN, N.S. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol*, v.44(5), p.1726-32, 2006.

CAMPIOTTO, S., PINHO, J.R.R., CARRILHO, F.J., DA SILVA, L.C., SOUTO, F.J.D., SPINELLI, V., PEREIRA, L.M.M.B., COELHO, H.S.M., SILVA, A.O., FONSECA, J.C., ROSA, H., LACET, C.M.C., BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*, v.38, p.41-48, 2005.

CASTILLO, I., PARDO, M., BARTOLOMÉ, J., ORTIZ-MOVILLA, N., RODRÍGUEZ-IÑIGO, E., DE LUCAS, S., SALAS, C., JIMÉNEZ-HEFFERNAN, J.A., PÉREZ-MOTA, A., GRAUS, J., LÓPEZ-ALCOROCHO, J.M., CARREÑO, V. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis*, v.189(1), p.7-14, 2004.

CHEN, S.L., MORGAN, T.R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, v.3(2), p.47-52, 2006.

CHEVALIEZ, S., PAWLOTSKY, J.M. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci*, v.3(2), p. 35-40, 2006.

COCCOLI R, ESPOSITO R, CIANCIARUSO B, POTA A, VISCIANO B, ANNECCHINI R, PARRILLI G. Hepatitis C and kidney disease. *Dig Liver Dis*, 39 *Suppl* v.1, p.83-85, 2007.

CODES, L., DE FREITAS, L.A., SANTOS-JESUS, R., VIVITSKI, L., SILVA, L.K., TREPO, C., REIS, M.G., PARANÁ, R. Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia Brazil. *Braz J Infect Dis*, v.7(6), p.409-17, 2003.

COLIN, C., LANOIR, D., TOUZET, S., MEYAUD-KREAMER, L., BAILLY, F., TREPO, C. Sensivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat*, v.8, p.87-89, 2001.

DA FONSECA, J.C., BRASIL, C.M. Hepatitis C virus infection in the Amazon Brazilian region. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.37, p.1-8, 2004.

DAVIDSON, F., SIMMONDS, P., FERGUSON, J.C., JARVIS, L.M., DOW, B.C., FOLLET, E.A., SEED, C.R., KRUSIUS, T., LIN, C., MEDGYESI, G.A et al.,. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol*, v.76, p.1197-1204, 1995.

DATZ, C., CRAMP, M., HAAS, T., DIETZE, O., NITSCHKO, H., FROESNER, G., MUSS, N., SANDHOFER, F., VOGEL, W. The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. *Gut*, v.44(4), p.563-7, 1999.

DAVIS, G. L. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology*, v.36, p.S145-S151, 2002.

DESOMBERE, I., VAN VLIERBERGHE, H., COUVENT, S., CLINCKSPOOR, F., LEROUX-ROELS, G. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. *J Clin Microbiol*, v.43(6), p.2590-7, 2005.

DOMIATI-SAAD, R., SCHEUERMANN, R.H. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta*, v.363(1-2), p.197-205, 2006.

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus protein. *World J Gastroenterol*, v.13(17), p.2406-2415, 2007.

EGGER, D., WOLK, B., GOSERT, R., BIANCHI, L., BLUM, H.E., MORADPOUR, D., BIENZ, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, v.76, p.5974-5984, 2002.

EL-SERAG H.B, *et al.*, Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans. *Hepatology*, v.36(6), p.1439-1445, 2002.

EL-ZAYADI, A.R., ATTIA, M., BARAKAT, E.M, *et al.*, Response of hepatitis C genotype-4 naive patients to 24 weeks of Peg-interferon-alpha2b/ribavirin or induction-dose interferon-alpha2b/ribavirin/amantadine: a nonrandomized controlled study. *Am J Gastroenterol*, v.100(11), p.2447-2452, 2005.

ESPÍRITO-SANTO, M.P., CARNEIRO, M.A.S., REIS, N.R.S., KOZLOWSKI, A.G., TELES, S.A., LAMPE, E., YOSHIDA, C.F.T., MARTINS, R.M.B. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Braz J Med Biol Res*, v.40(4), p.545-550, 2007.

FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., MELPOLDER, J.C., STRAZZERA, A., CHIEN, D.Y., MUNOZ, S.J., BALESTRIERI, A., PURCELL, R.H., ALTER, H.J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, v.288(5464), p.339-344, 2000.

FOCACCIA, R., DA CONCEIÇÃO, O.J., SETTE-JR, H., SABINO, E., BASSIT, L., NITRINI, D.R., LOMAR, A.V., LORENÇO, R., VIEIRA DE SOUZA, F., KIFFER, C.R., SANTOS, E.B., GONZALES, M.P., SÁEZ-ALQUÉZAR, A., RISCAL, J.R., FISCHER, D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz J Infect Dis*, v.2, p.269-284, 1998.

FORNS, X., THIMME, R., GOVINDARAJAN, S., EMERSON, S.U., PURCELL, R.H., CHISARI, F.V., BUKH, J. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.97, p.13318-13323, 2000.

FRANK, C., MOHAMED, M.K., STRICKLAND, G.T., LAVANCHY, D., ARTHUR, R.R., MAGDER, L.S., EL KHOBY, T., ABDEL-WAHAB, Y., ALY OHN, E.S., ANWAR, W., SALLAM, I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, v.355, p. 887-891, 2000.

FREEMAN, A.J., DOTE, G.J., LAW, M.G., THORPE, M., VON OVERBECK, L., LLOYD, A.R., *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, v.34, p.809-816, 2001.

FRIED, M.W., SHIFFMAN, M.L., REDDY, K.R., SMITH, C., MARINOS, G., GONÇALES, F.L. JR., HÄUSSINGER, D., DIAGO, M., CAROSI, G., DHUMEAUX, D., CRAXI, A., LIN, A., HOFFMAN, J., YU, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, v.347, p.975–982, 2002.

GBD- Global burden of disease for hepatitis C. *J Clin Pharmacol*, v.44, p. 20-29, 2004.

GERMER, J.J., MAJEWSKI, D.W., YUNG, B., MITCHELL, P.S., YAO, J.D. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J Clin Microbiol*, v.44(2), p.318-23, 2006.

GRIFFIN, S.D., HARVEY, R., CLARKE, D.S., BARCLAY, W.S., HARRIS, M., ROWLANDS, D.J. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol*, v.85, p.451-461, 2004.

GUNSON, R.N., COLLINS, T.C., CARMAN, W.F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol*, v.35(4), p.355-67, 2006.

HADZIYANNIS, S.J., KOSKINAS, J.S. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. *Hepatol Res*, v.29(3), p.129-135, 2004.

HAGAN, H., SNYDER, N., HOUGH, E., YU, T., MCKEIRNAN, S., BOASE, J., DUCHIN, J. Case-reporting of acute hepatitis B and C among injection drug users. *J Urban Health*, v.79, p.579-585, 2002.

HELLE, F., WYCHOWSKI, C., VU-DAC, N., GUSTAFSON, K.R., VOISSET, C., DUBUISSON, J. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem*, v.281, p.25177-25183, 2006.

HENDERSON, D.K. Managing Occupational Risks for Hepatitis C Transmission in the Health Care Setting. *Clin Microbiol Rev*, v.16(3), p.546-568, 2003.

HLADIK, W., KATAAHA, P., MERMIN, J., PURDY, M., OTEKAT, G., LACKRITZ, E., ALTER, M.J., DOWNING, R. Prevalence and screening costs of hepatitis C virus among Ugandan blood donors. *Trop Med Int Health*, v.11, p.951-954, 2006.

HNATYSZYN, H.J. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir. Ther*, v.10, p.1-11, 2005.

HOLLINGSWORTH, R.C., SILLEKENS, P., VAN DEURSEN, P., NEAL, K.R., IRVING, W.L. Serum HCV RNA levels assessed by quantitative NASBA: stability of viral load over time, and lack of correlation with liver disease. The Trent HCV Study Group. *J Hepatol*, v.25(3), p.301-6, 1996.

HOOFNAGLE, J.H. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, v.36, p. S21-S29, 2002.

HOWELL, C., JEFFERS, L., HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C in African Americans: summary of a workshop. *Gastroenterology*, v.119(5), p.1385-1396, 2000.

KAMAL, S.M., EL TAWIL, A.A., NAKANO, T., *et al.* Peginterferon {alpha}-2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. *Gut*, v.54(6), p.858-866, 2005.

KAMILI, S., KRAWCZYNSKI, K., MCCAUSTLAND, K.A., LI, X., ALTER, M.J. The infectivity of hepatitis C virus after drying and storing at room temperature. *Infect Control Hosp. Epidemiol*, v.28, p.519-524, 2007.

KATO, T., MATSUMURA, T., HELLER, T., SAITO, S., SAPP, R.K., MURTHY, K., WAKITA, T., LIANG, T.J. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol*, v.81(9), p.4405-4411, 2007.

KIM, J.L., MORGENSTERN, K.A., LIN, C., FOX, T., DWYER, M.D., LANDRO, J.A., CHAMBERS, S.P., MARKLAND, W., LEPRE, C.A., O'MALLEY, E.T., HARBESON, S.L., RICE, C.M., MURCKO, M.A., CARON, P.R., THOMSON, J.A. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, v.87, p.343-355, 1996.

KOKUBO, S., HORII, T., YONEKAWA, O., OZAWA, N., MUKAIDE, M. A phylogenetic-tree analysis elucidating nosocomial transmission of hepatitis C virus in a haemodialysis unit. *J Viral Hepat*, v.9(6), p.450-4, 2002.

KONNICK, E.Q., WILLIAMS, S.M., ASHWOOD, E.R., HILLYARD, D.R. Evaluation of the COBAS Hepatitis C Virus (HCV) TaqMan analyte-specific reagent assay and comparison to the COBAS Amplicor HCV Monitor V2.0 and Versant HCV bDNA 3.0 assays. *J Clin Microbiol*, v.43(5), p.2133-40, 2005.

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.

LAPERCHE, S., LUNEL, F., IZOPET, J., ALAIN, S., DÉNY, P., DUVERLIE, G., GAUDY, C., PAWLOTSKY, J.M., PLANTIER, J.C., POZZETTO, B., THIBAUT, V., TOSETTI, F., LEFRÈRE, J.J. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J Clin Microbiol*, v.43(2), p.733-9, 2005.

LAW, M.G., DORE, G.J., BATH, N., THOMPSON, S., CROFTS, N., DOLAN, K., GILES, W., GOW, P., KALDOR, J., LOVEDAY, S., POWELL, E., SPENCER, J., WODAK, A. Modelling hepatitis C virus incidence, prevalence and long-term sequelae in Australia. 2001. *Int J Epidemiol*, v.32, p.717-724, 2003.

LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, v.436, p.933-938, 2005.

LUNEL, F., CRESTA, P., VITOUR, D., PAYAN, C., DUMONT, B., FRANGEUL, L., REBOUL, D., BRAULT, C., PIETTE, J.C., HURAU, J.M. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. *Hepatology*, v.29(2), p.528-35, 1999.

LUNGE, V.R., IKUTA, N., FONSECA, A.S.K., MARQUES, E.K., CHEINQUER, H. Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes in North and Northeast Regions from Brazil. In: *XX World Congress of Pathology and Laboratory Medicine*, p. 81-86, 1999.

MAJID, A.M., GRETCH, D.R. Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. *Microbes Infect.* v.4(12), p.1227-36, 2002.

MANGIA, A., SANTORO, R., MINERVA, N., *et al.* Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med*, v.352(25), p.2609-17, 2005.

MANNS, M.P., MCHUTCHISON, J.G., GORDON, S.C., *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* v.358(9286), p.958-65, 2001.

MARISON, G., PIROLA, R., LACARINI, S., *et al.* Acute Hepatitis C. *Australian Family Physician* (Special Issue), v.28, p.46- 50, 1999.

MARTINS, R.M.B., TELES, S.A., FREITAS, N.R., MOTTA-CASTRO, A.R.C., SOUTO, F.J.D., MUSSI, A., AMORIM, R.M.S., MARTINS, C.R.F. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop*, v.48, p.53-55, 2006.

MAZZEO, C., AZZAROLI, F., GIOVANELLI, S., DORMI, A., FESTI, D., COLECCHIA, A., MIRACOLO, A., NATALE, P., NIGRO, G., ALBERTI, A., RODA, E., MAZZELLA, G. Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut*, v.52(7), p.1030-1034, 2003.

MCGARVEY, M.J., HOUGHTON, M., WEINER, A.J. Hepatitis C Virus: Structure and Molecular Virology. In: ZUCKERMAN, A.J; THOMAS, H.C. *Viral Hepatitis*, London: Churchill Livingstone, p.253-270, 1998.

McLAUHLAN, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*, v.7, p.2-14, 2000.

McOMISH, F., YAP, P.L., DOW, B.C., FOLLETT, E.A., SEED, C., KELLER, A.J., COBAIN, T.J., KRUSIUS, T., KOLHO, E., NAUKKARINEN, R., et al., Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol*, v.32(4), p.884-92, 1994.

MEYERS, C.M., SEEFF, L.B., STEHMAN-BREEN, C.O., HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C and renal disease: an update [review]. *Am J Kidney Dis*, v.42(4), p.631-657, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Portaria MS 863 de 4/11/2002– Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral crônica C. Disponível em:

<http://dtr2001.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite/legislacao/download/portaria863de2002protocolodetratamentohepatitec.doc>

Acesso em junho de 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. "Relatório Avaliação da assistência das hepatites virais no Brasil -2002". Disponível em:

[http://dtr2001.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite/conteudo/download/avaliacao\\_da\\_assistencia\\_hepatites\\_virais\\_no\\_brasil.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite/conteudo/download/avaliacao_da_assistencia_hepatites_virais_no_brasil.pdf)

Acesso em junho de 2006.

MINISTÈRIO DA SAÚDE – BRASIL. Hepatites Virais: O Brasil está atento. 2 ed, Brasília: 2005. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>  
Acesso em fevereiro de 2008.

MINISTÈRIO DA SAÚDE – BRASIL. Casos confirmados de hepatite C no Brasil. Grandes regiões e Unidades Federadas, 1996-2006. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_hepatite\\_c.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_hepatite_c.pdf)  
Acesso em fevereiro de 2008.

MOGHADDAM, A., REINTON, N., DALGARD, O. A rapid real-time PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes 1, 2 and 3a. *J Viral Hepat*, v.13(4), p.222-9, 2006.

MORADPOUR, D., BRASS, V., BIECK, E., FRIEBE, P., GOSERT, R., BLUM, H.E., BARTENSCHLAGER, R., PENIN, F., LOHMANN, V. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, v.78, p.13278-13284, 2004.

MORISHIMA, C., CHUNG, M., NG, K.W., BRAMBILLA, D.J., GRETCH, D.R. Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol*, v.42(1), p.421-5, 2004.

MURPHY, D.G., WILLEMS, B., DESCHÊNES, M., HILZENRAT, N., MOUSSEAU, R., SABBAH, S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol*, v.45(4), p.1102-1112, 2007.

NGUYEN, M.H., WHITTEMORE, A.S., GARCIA, R.T., TAWFEEK, S.A., NING, J., LAM, S., WRIGHT, T.L., KEEFFE, E.B.L. Role of ethnicity in risk for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, v.2(9): p.820-824, 2004.

NGUYEN, M.H., KEEFFE, E.B. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol*, v.3, p.S97-S101, 2005.

NIH-NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C. *Hepatology*, v.36 (Suppl. 1), p.S3-20. 2002.

NOLTE, F.S. Hepatitis C virus genotyping: clinical implications and methods. *Mol. Diagn* v.6, p.265–277, 2001.

OKAYAMA, A., STUVER, S.O., TABOR, E., TACHIBANA, N., KOHARA, M., MUELLER, N.E., TSUBOUCHI, H. Incident hepatitis C virus infection in a community-based population in Japan. *J Viral Hepat*, v.9, p.43-51, 2002.

OLIVEIRA, U.B. Hepatitis C Virus Perinatal Transmission. *Braz J Infect Dis*, v.11(5) Suppl.1, p.10-11, 2007.

ORLAND, J.R., WRIGHT, T.L., COOPER, S. Acute hepatitis C. *Hepatology*, v.33(2), p.321-7, 2001.

PARANÁ, R., VITVITSKI, L., BERBY, F., PORTUGAL, M., COTRIM, H.P., CAVALCANTE, A., LYRA, L., TREPO, C. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol*, v.37, p.213-216, 2000.

PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol*, 31, 71-79, 1999.

PAWLOTSKY, J.M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*, v.36, p.65-73, 2002.

PENIN, F., DUBUISSON, J., REY, F.A., MORADPOUR, D., PAWLOTSKY, J.M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, v.39, p.5-19, 2004.

PYBUS, O.G., CHARLESTON, M.A., GUPTA, S., RAMBAUT, A., HOLMES, E.C., HARVEY, P.H. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science*. v.292(5525), p.2323-2325, 2001.

PYBUS, O.G., DRUMMOND, A.J., NAKANO, T., ROBERTSON, B.H., RAMBAUT, A. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol*, v.20(3), p.381-387, 2003.

POUPON, R. Hepatitis C: epidemiology, management and treatment. *Bull Acad Natl Med*, v.189, p.375-384, 2005.

RAY, R.B., RAY, R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett*, v.202, p.149-156, 2001.

PREMKUMAR, A., WILSON, L., EWART, G.D., GAGE, P.W. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, v.557, p.99-103, 2004.

REED, K.E., RICE, C.M. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*, v.242, p.55-84, 2000.

RICHTER, S.S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol*, v.40(12), p.4407-12, 2002.

ROLFE, K.J., ALEXANDER, G.J., WREGHITT, T.G., PARMAR, S., JALAL, H., CURRAN, M.D. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol*, v.34(2), p.115-121, 2005.

ROSEN, H.R., MARTIN, P. Viral hepatitis in liver transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am*, v.3, p.761-84, 2000.

ROSINI, N., MOUSSE, D., SPADA, C., TREITINGER, A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and Anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis*, v.7, p.262-267, 2003.

ROSS, R.S., VIAZOV, S.O., HOFFMANN, S., ROGGENDORF, M. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal*, v.15(6), p.308-13, 2001.

SAGNELLI, E., STROFFOLINI, T., MELE, A., ALMASIO, P., COPPOLA, N., FERRIGNO, L., SCOLASTICO, C., ONOFRIO, M., IMPARATO, M., FILIPPINI, P. The importance of HCV on the burden of chronic liver disease in Italy: a multicenter prevalence study of 9,997 cases. *J Med Virol*, v.75, p.522-527, 2005.

SAKAI, A., CLAIRE, M.S., FAULK, K., GOVINDARAJAN, S., EMERSON, S.U., PURCELL, R.H., BUKH, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.100, 11646-11651, 2003.

SARRAZIN, C., TEUBER, G., KOKKA, R., RABENAU, H., ZEUZEM, S. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. *Hepatology*, v.32, p.818-23, 2000.

SCOTT, J.D., GRETCH, D.R. Hepatitis C and G Viruses. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press, v2, p1437- 1451, 2007.

SEEFF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, v.36, p.S35-46, 2002.

SENE, D., LIMAL, M., CACOUB, P. Hepatitis C vírus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Met Brain Dis*, v.19, p.357-381, 2004.

SHEPARD, C.W., FINELLI, L., FIORE, A.E., BELL, B.P. Epidemiology of hepatitis B and hepatitis C virus infection in United States children. *Pediatr Infect Dis J*, v.24, p.755-760, 2005.

SHEPHERD, J., BRODIN, H., CAVE, C., WAUGH, N., PRICE, A., GABBAY, J. Pegylated interferon alpha-2a and -2b in combination with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, v.8(39), p.1-125, 2004.

SILVA, L.K., SILVA, M.B., LOPES, G.B., RODART, I.F., COSTA, F.Q., SANTANA, N.P., PARANÁ, R., SANTANA, A., REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the state of Bahia, Northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.38(6), p.496-502, 2005.

SILVA, L.K., SILVA, M.B.S., RODART, I.F., LOPES, G.B., COSTA, F.Q., MELO, M.E., GUSMÃO, E., REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res*, v.39, p.595-602, 2006.

SILVA, C.M.D., NIEL, C. Doenças infecciosas: *Doenças Infecciosas - Diagnóstico molecular*. In: ROSSETI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.123 -134, 2006.

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

SIMMONDS, P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.356(1411), p.1013-1026, 2001.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus . 15 years on. *J Gen Virol*, v.85, p.3173-3188, 2004.

SIMMONDS, P., BUKH, J., COMBET, C., DELEAGE, G., ENOMOTO, N., FEINSTONE, S., HALFON, P., INCHAUSPE, G., KUIKEN, C., MAERTENS, G. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, v.42, p.962–973, 2005.

STANKOVIC-DJORDJEVIC, D., DJORDJEVIC, N., TASIC, G., DINIC, M., KARANIKOLIC, A., PESIC, M. Hepatitis C virus genotypes and the development of hepatocellular carcinoma. *J Dig Dis*, v.8(1), p.42-47, 2007.

STRADER, D.B.T., WRIGHT, D.L., SEEFF, L.B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, v.39, p.1147–1171, 2004.

STRAMER, S.L., GLYNN, S.A., KLEINMAN, S.H., STRONG, D.M., CAGLIOTI, S., WRIGHT, D.J., DODD, R.Y., BUSCH, M.P. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med*, v.351(8), p.760-768, 2004.

TAN, S.L., KATZE, M.G. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, v.284, p.1-12, 2001.

TEIXEIRA, R., VASCONCELOS JÚNIOR, L., GALIZZI FILHO, J. Hepatites Virais Crônicas. In CASTRO LP & COELHO LGV. *Gastroenterologia*, Vol 2. Rio de Janeiro: Medsi. P. 1830, 2004.

TELLINGHUISEN, T.L., RICE, C.M. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, v.5, p.419-427, 2002.

TERRAULT, N.A. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*, v.36, p.S99-S105, 2002.

THIO, C.L., NOLT, K.R., ASTEMBORSKI, J., VLAHOV, D., NELSON, K.E., THOMAS, D.L. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol*, v.38, p.575-577, 2000.

VILLANO, S.A., VLAHOV, D., NELSON, K.E., COHN, S., THOMAS, D.L. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology*, v.29, p.908-14, 1999.

VOGLER, I.H., NISHIYA, A., MORIMOTO, H.K., REICHE, E.M., BORTOLIERO, A.L., MATSUO, T., SABINO, E.C., VAZ, A.J. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.46(6), p.303-8, 2004.

WASLEY, A., ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*, v.20(1), p.1-16, 2000.

WECK, K. Molecular methods of hepatitis C genotyping. *Expert Rev. Mol. Diag.* v.5, p.507-520, 2005.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C – global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec*, v.75, p.17-28, 2000.

WIESE, M., BERR, F., LAFRENZ, M., PORST, H., OLSEN, V. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*, v.32, p.91-96, 2000.

XAVIER, F., BUKH, J. Methods for determining the hepatitis C genotype. *Viral Hepatitis Rev*, v.4, p.1-19, 1998.

YEN, T., KEEFFE, E.B., AHMED, A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol*, v.36(1), p.47-53, 2003.

YOON, J., LEE, J.I., BAIK, S.K., LEE, K.H., SOHN, J.H., LEE, H.W., NAMKUNG, J., CHANG, S.J., CHOI, J.W., KIM, H.W., YEH, B.I. Predictive factors for interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*, v.13(46), p.6236-42, 2007.

ZARIFE, M.A.S., DE OLIVEIRA, E.C.P., ROMEU, J.M.S.L., DOS REIS, M.G. Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.39(6), p.567-9, 2006a.

ZARIFE, M.A.S., SILVA, L.K., SILVA, M.B.S., LOPES, G.B., BARRETO, M.L., TEIXEIRA, M.G., DOURADO, I., REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus infection in northeastern Brazil: a population-based study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.100, p.663-668, 2006b.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*, v.13, p.223-235, 2000.

ZEUZEM, S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med*, v.140, p.370–381, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)