

***NORMA DE PAULA CAVALHEIRO***

**ANÁLISE DOS SOROTIPOS DO VHC  
IDENTIFICADOS EM PACIENTES DA CIDADE  
DE SÃO PAULO, ATRAVÉS DE MÉTODO  
IMUNOENZIMÁTICO**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Fisiopatologia Experimental**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone**

**São Paulo**

**1999**

**Ao**

***Laboratório de Hepatites***

## AGRADECIMENTOS

*Prof. Dr. Antonio Alci Barone*

*Sérgio Suematsu*

*Antonia Magali Dias de Souza*

*Rose Aparecida Borges Tosta*

*José Maria Biazon*

*Dra. Fátima Mitiko Tengan*

*Dean Dominic de Lucia*

*Maria de Lourdes de Paula*

*Rudney Mendes Cavalheiro*

*Verena de Paula Cavalheiro*

*Matheus de Paula Cavalheiro*

*Vera Garcia*

*Murex Diagnostics Ltd., Dartford, United Kingdom*

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Figuras

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

bp	Pares de base
C	Core
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
DTT	Dithiothreitol
E	Envelope
EIA	Imunoenzimático
ELISA	Imunoenzimático de fase sólida
gp	Glicoproteína
HNANB	Vírus da hepatite não A, não B
Ig	Imunoglobulina
LIPA	Line Probe Assay
NC	Não codificadora
NS	Não estrutural
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Restriction fragment length polymorphism

RHV	Região hiper variável
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcriptase reversa
SAI-3	Imunoenzimático de diagnóstico dos sorotipos 1, 2 e 3 do VHC
SAI-6	Imunoenzimático de diagnóstico dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do VHC
VHA	Vírus da hepatite A
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC.....	13
Tabela 2	Distribuição mundial dos tipos do VHC.....	24
Tabela 3	Ciclos de temperatura e tempo da reação nested-PCR.....	33
Tabela 4	Distribuição dos sorotipos do VHC para 166 amostras diagnosticadas.....	41
Tabela 5	Distribuição dos pacientes entre os tipos do VHC de 1 a 6.....	42
Tabela 6	Epidemiologia: distribuição dos pacientes estudados, segundo sexo e idade.....	43
Tabela 7	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo sexo e idade.....	45
Tabela 8	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo sexo e idade.....	46
Tabela 9	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo sexo e idade.....	47
Tabela 10	Distribuição dos pacientes estudados segundo forma presumida de aquisição do VHC.....	49
Tabela 11	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo forma presumida de aquisição.....	50
Tabela 12	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo forma presumida de aquisição.....	51
Tabela 13	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo forma presumida de aquisição.....	52
Tabela 14	Diagnóstico de fatores selecionados, segundo sorotipo diagnosticado.....	53

Tabela 15	Diagnóstico de sorotipos múltiplos não confirmados e não reproduzidos.....	54
Tabela 16	Resultados dos sorotipos e respectivos seqüenciamentos.....	54
Tabela 17	Sensibilidade do teste de ELISA (Murex HCV Serotyping Assay) para sorotipagem do VHC.....	60
Tabela 18	Concordância entre o teste de sorotipagem SAI-6 e diferentes testes de genotipagem.....	72



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Evolução das descobertas dos tipos e subtipos do VHC ao longo dos anos 1989 a 1996.....	15
Gráfico 2	Distribuição dos pacientes entre os tipos do VHC de 1 a 6..	42
Gráfico 3	Epidemiologia: distribuição dos pacientes estudados, segundo sexo e idade.....	43
Gráfico 4	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo sexo e idade.....	45
Gráfico 5	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo sexo e idade.....	46
Gráfico 6	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo sexo e idade.....	47
Gráfico 7	Distribuição dos pacientes estudados segundo forma presumida de aquisição do VHC.....	49
Gráfico 8	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo forma presumida de aquisição.....	50
Gráfico 9	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo forma presumida de aquisição.....	51
Gráfico 10	Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo forma presumida de aquisição.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do genoma do VHC.....	5
Figura 2	Árvore filogenética representando os tipos de 1 a 6 do VHC e seus subtipos.....	14
Figura 3	Resultados da PCR em gel de agarose corados com brometo de etídeo.....	34
Figura 4	Base para o ensaio de sorotipagem do VHC.....	37
Figura 5	Resultados positivos de sorotipagem para os tipos de 1 a 6 do VHC.....	39

## RESUMO

CAVALHEIRO, N.P. **Análise dos sorotipos do VHC identificados em pacientes da cidade de São Paulo, através de método imunoenzimático.** São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Com o objetivo de analisar a prevalência dos diferentes tipos do vírus da Hepatite C (VHC) em uma população de pacientes portadores crônicos do VHC, através de um método sorológico (MUREX HCV Serotyping Assay), foram estudados 219 pacientes, que apresentaram positiva a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nested-PCR. Estes soros foram submetidos ao teste imunoenzimático para detecção dos anticorpos contra os tipos 1,2,3,4,5,6 do VHC. As amostras foram diluídas e incubadas na presença de peptídeos heterólogos de competição, com antígenos sorotipo-específicos do VHC. Dos 219 pacientes, foi possível detectar o sorotipo do VHC em 166, revelando uma sensibilidade de 75,8%. Os resultados apresentaram a predominância do tipo 1 (70,0%) em nosso meio, seguido pelo tipo 3 (22,3%) e tipo 2 (4,2%). Os sorotipos 4 e 5 estiveram presentes para 1,8% dos pacientes, sempre associados com o sorotipo 1. Estas amostras, apesar de cumprirem os quesitos de validade do teste, apresentaram leituras de Densidade Ótica muito altas para todos os tipos virais testados, inclusive controles positivo e negativo e a possibilidade de reações cruzadas, nestes casos, deve ser considerada. A confirmação por genotipagem e uma investigação mais detalhada sobre a procedência e formas de aquisição do VHC destes pacientes devem ser pesquisados. O tipo 6 não foi confirmado em nenhuma das amostras testadas e provavelmente não estava presente nesta coleção de amostras avaliadas. Os parâmetros epidemiológicos avaliados foram: idade, sexo e vias de transmissão. Dos 166 pacientes com diagnóstico para o tipo do VHC, 108 (65,1%) eram homens e 58 (34,9%) mulheres. A idade dos pacientes variou de 12 a 73 anos (média 41,1). As formas de transmissão mencionadas foram 52 (31,3%) transfusão de sangue, 18 (10,8%) uso de drogas injetáveis, 8 (4,8%) tatuagens, 6 (3,6%) provável via sexual, 3 (1,8%) acidente com agulha, 2 (1,2%) trabalho em área de saúde, 1 (0,6%) acupuntura, 1 (0,6%) hemofílico. Sessenta e um pacientes (36,7%) não apresentaram fatores de risco que justificassem a aquisição da infecção pelo VHC. Não foi verificada diferença significativa entre os tipos do VHC encontrados e os parâmetros epidemiológicos estudados. A predominância dos tipos 1, 3 e 2 é compatível com outros estudos, de genotipagem, que envolveram amostras brasileiras, particularmente da cidade de São Paulo. As amostras que apresentaram

leituras de Densidade Ótica altas ou baixas, para todos os poços de uma mesma amostra testada, inclusive controles positivo e negativo, sugerem a possibilidade de reações inespecíficas ou cruzadas e devem ser confirmadas por outras técnicas de genotipagem ou seqüenciamento. A praticidade oferecida pelo teste de sorotipagem do VHC, apesar de não identificar os subtipos, pode ser útil na prática clínica e auxiliar no prognóstico da doença, não necessitando da tecnologia exigida pelos testes que envolvem biologia molecular.

## SUMMARY

CAVALHEIRO, N.P. **Analysis of serotypes of HCV in patients from the city of São Paulo, by means of a enzyme-immunoassay method.** São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

With the objective of analysing the prevalence of the different types of Hepatitis C Virus (HCV) in a population of chronic carriers of HCV, through a serologic method (MUREX HCV Serotyping Assay), 219 patients were studied who showed a positive polymerase chain reaction. These sera were submitted to immunoenzymatic tests for the detection of antibodies in relation to HCV types 1, 2,3,4,5 and 6. The samples were diluted and incubated in the presence of heterologous competing peptides, with microwells coated with serotype-specific antigens of HCV. Of the 219 patients, it was possible to detect the HCV serotype in 166, revealing a sensitivity of 75.8%. The results showed a predominance of type 1 (70.0%) in our medium, followed by type 3 (22.3%) and type 2 (4.2%). Serotypes 4 and 5 were present in 1.8% of the patients, but always associated with serotype 1. These samples, in spite of fulfilling the prerequisites of validity for testing, showed a very high optical density reading for all types of viruses tested, including positive and negative controls. The possibility of cross reactions in these cases should be considered. Confirmation by genotyping and a more detailed investigation on the origin and mode of acquisition of the HCV of these patients should be researched. Type 6 was not confirmed in any of the samples tested and probably was not present in this particular collection. The epidemiological parameters evaluated were: age, sex and means of transmission. Of the 166 patients diagnosed with the HCV, 108 (65.1%) were men and 58 (34.9%) were women. The age of the patients varied from 12 to 73 years, the average being 41.1 years. The means of transmission mentioned were blood transfusion in 52 (31.3%) cases, intravenous drug use in 18 (10.8%) cases, by tattoos in 8 (4.8%) cases, 6 (3.6%) cases were sexually transmitted, 3 (1.8%) were by accident with a needle, 2 (1.2%) through work in the health field, one (0.6%) through acupuncture and one by being hemophiliac. Sixty one (36.7%) patients were not able to offer any risk factor which justified the acquisition of the HCV infection. No significant difference was verified among the different types of HCV found and the different epidemiological parameters studied. The predominance of types 1, 3 and 2 is compatible with other genotyping studies which involved Brazilian samples, particularly in the city of São Paulo. The samples which showed high or low dense optical reading for all the wells of the same samples tested even the positive or negative

controls, suggested confirmation by sequencing or genotyping. The practicality obtained by the HCV serotyping test, in spite of the fact that it does not identify the sub type, can be useful in clinical practice and helpful in the prognostication of the disease, not needing the technology demanded by the tests which involve molecular biology.

## INTRODUÇÃO

O termo “icterícia epidêmica” aparece nos escritos de Hipócrates na Grécia há mais de dois mil anos, e essa forma foi provavelmente devido a hepatite A (VHA). Diferentemente, a hepatite B (VHB) foi possivelmente reconhecida há aproximadamente 100 anos e a descoberta do “antígeno Austrália” por Blumberg e cols., em 1963 (publicada em 1965) representou um passo fundamental na caracterização etiológica de seu agente. (DA SILVA, 1995)

Em 1974 introduziu-se o termo “hepatites não-A, não-B” (HNANB). Esta entidade representava os casos de hepatites diagnosticados após exclusão dos vírus já identificados: VHA, VHB, Citomegalovírus e o Epstein-Barr. As HNANB eram responsáveis por mais de 90% dos casos de hepatites associadas a transfusão de sangue nos Estados Unidos da América, após exclusão dos doadores com marcadores para o VHB. (CHOO e col., 1989; SMITH e col., 1995)

O agente responsável pela grande maioria dos casos de HNANB de transmissão parenteral foi descoberto por CHOO e cols. em 1989 e a pesquisa por marcadores sorológicos prosseguiu, permitindo desta forma avaliar parâmetros como prevalência, incidência e transmissão do chamado vírus da hepatite C (VHC). Estima-se que nos 10 anos precedentes a descoberta dos marcadores sorológicos para o VHC, aproximadamente 150.000 pessoas tenham sido infectadas por ano nos Estados Unidos,

sendo que em 40% dos casos não se identificam fatores de risco de transmissão. A prevalência aproximada do VHC nos Estados Unidos da América é considerada de 1,4%, e no mundo varia de 0,14% a 26%. A mais comum e aparentemente mais eficiente rota de transmissão é parenteral, incluindo administração de produtos terapêuticos derivados de sangue, uso de drogas endovenosas, transmissão nosocomial de paciente para paciente em hemodiálise, acidentes pérfuro-cortantes em trabalhadores da área da saúde e outros procedimentos invasivos. (MORTON & KELEN, 1998; QUER & ESTEBAM, 1998)

O vírus da Hepatite C é considerado um flavivírus. Sua identificação foi fruto de estudos da Chiron Corporation e do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) americano no ano de 1989. Um chimpanzé foi identificado com altos títulos de um agente que tinha capacidade de transmitir HNANB. Do soro deste animal foi obtida uma suspensão que provavelmente continha o vírus causador da hepatite. Um ácido nucléico foi então extraído, posteriormente sintetizado um DNA complementar (cDNA), inserido em um clone vetor (gt11) e expresso em *Escherichia coli*. Estes clones foram lisados para expressar suas proteínas e hibridizados com soros de pacientes que apresentavam diagnóstico de HNANB. Um único clone, chamado 5-1-1 foi reativo. A clonagem e expressão desse gene na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a fusão com a enzima superóxido-desmutase (SOD), resultaram no antígeno C100-3. Esse antígeno foi o primeiro a ser utilizado em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o VHC. Na continuidade, novas gerações de testes, cada vez mais específicos e



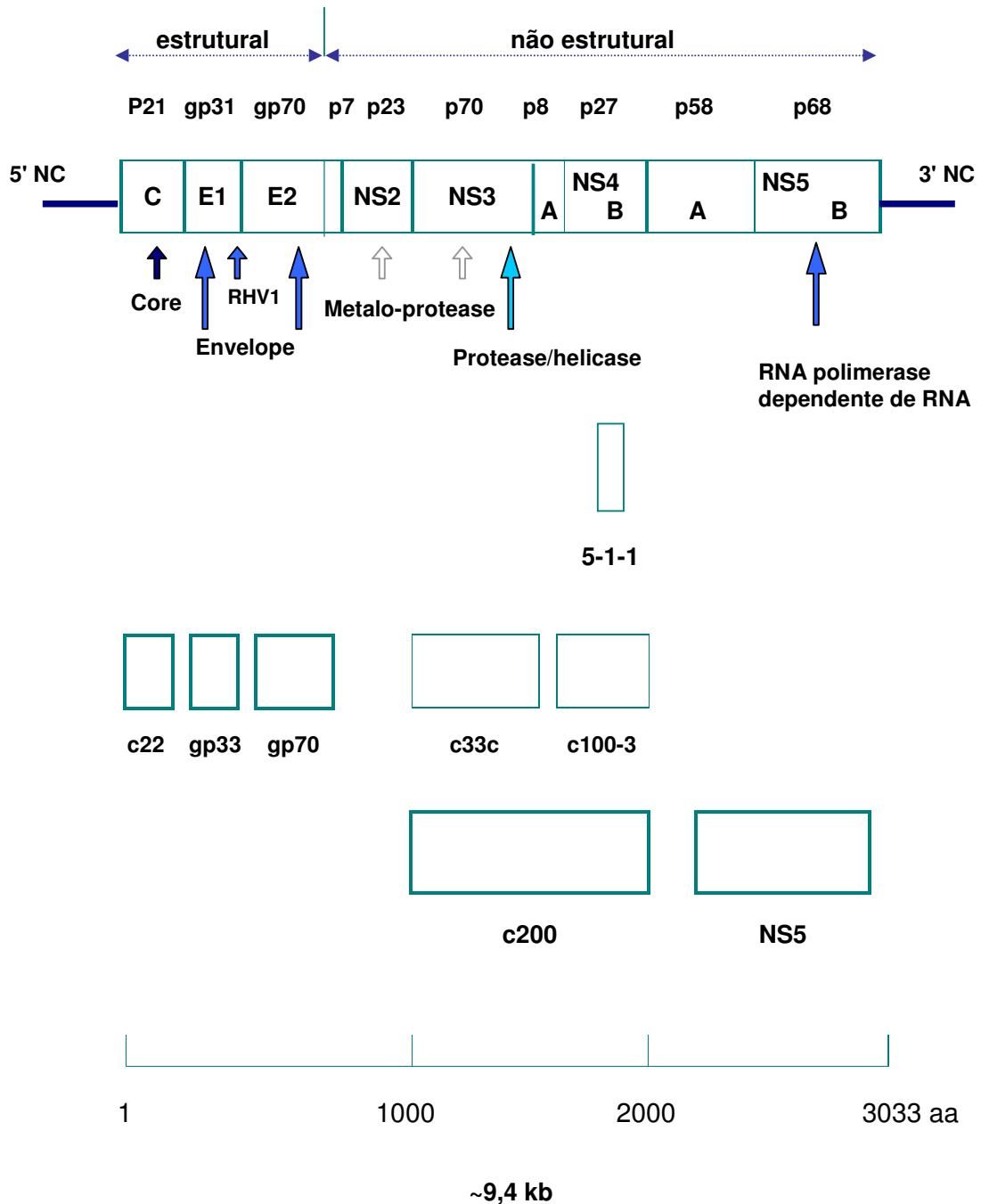
sensíveis tem sido descritos e pesquisados em todo o mundo. (KUO e col., 1989; CHOO e col., 1991; ALTER & SEEFF, 1993; MORTON & KELEN, 1998)

A infecção pelo VHC é progressiva em pelo menos 80% dos casos e pode levar ao aparecimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. Aproximadamente 20% dos portadores crônicos podem desenvolver cirrose hepática após 20 anos e 10% carcinoma hepatocelular após 30 anos do início da doença. Portanto, as mais sérias conseqüências da infecção pelo VHC não se manifestam por um longo período, sugerindo que a identificação precoce destes pacientes assintomáticos seria aconselhável. (DOORN e col., 1996; WEBBER e col., 1996)

O VHC é um pequeno vírus envelopado de diâmetro em torno de 30 a 38nm, possui genoma RNA de fita simples, polaridade positiva e aproximadamente 9.400 nucleotídeos, que apresenta nas suas extremidades as regiões 3'NC e 5'NC (não codificadoras). A região 5'NC é altamente conservada dentre os VHC estudados em todo o mundo, mostrando uma igualdade de mais de 99% e sugerindo um papel regulador importante durante a replicação viral. Normalmente é a região eleita para a seleção de primers na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) devido a essa homogeneidade encontrada entre os VHC estudados em todo o mundo. Esta região é seguida por uma longa fase de leitura aberta (ORF - open reading frame) que compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína de tamanho aproximado entre 3.010 e 3.011 aminoácidos. Estes aminoácidos estão subdivididos em nove proteínas, nesta ordem: nucleocapsídeo ou

Core (C) e duas glicoproteínas do envelope viral “E1” e “E2/NS1”, que compreendem o domínio estrutural do genoma e NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b, que são domínios não estruturais (Figura 1). (KUO e col., 1989; CHOO e col., 1991; ALTER & SEEFF, 1993; MORTON & KELEN, 1998)

**Figura 1 - Estrutura do genoma do VHC**



Esquema do genoma do VHC, apresentando as regiões não codificadoras 5'NC e 3'NC; estruturais, Core (C), e do envelope E1, E2/NS1 e não estruturais NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b. Seguem abaixo representadas as proteínas utilizadas como antígenos nos testes sorológicos correspondentes as regiões do VHC.

## **Regiões não codificadoras do VHC (3'NC e 5'NC)**

### **5'NC**

A região 5'NC é composta por 341nt e apresenta um alto grau de conservação entre as seqüências do VHC (>99%) estudadas em todo o mundo. Reflete um papel de grande importância em alguns aspectos como translação, replicação e/ou montagem do vírus. Esta homogeneidade também elege a região 5'NC para o desenho dos primers usados na PCR para amplificação e diagnóstico da presença da partícula viral. Também as técnicas de genotipagem, análise dos fragmentos polimórficos gerados por enzimas de restrição (RFLP) e a de hibridação reversa (LIPA-Line probe assay), baseiam-se no produto da PCR da região 5'NC para discriminação dos tipos e subtipos do VHC em consequência da acentuada distinção existente entre os genótipos de 1 a 6 nesta região. (CHOO, e col., 1991; HOUGHTON, e col., 1991; CHAN e col., 1992; HAYASHI e col., 1993; DAVIDSON e col., 1995; SIMMONDS, 1995; SMITH e col., 1995; LAU e col., 1996; TANAKA & SHIMOTOHNO, 1998)

### **3'NC**

A região 3'NC compõe-se de apenas 27nt a 45nt, dependendo da partícula viral isolada, sendo extremamente heterogênea. A diversidade dos nucleotídeos é de aproximadamente 10% entre os vírus de mesmo tipo e altamente diferenciada (mais de 80%) entre os diferentes tipos do VHC. Supõe-se que, ao menos parcialmente, seja responsável pela diferença no

potencial de patogenicidade e sensibilidade à terapia com interferon. Recentemente identificada a porção final da região 3'NC que apresenta-se como uma estrutura comum entre as cadeias estudadas do VHC, ao que parece tem um papel importante na iniciação e regulação da replicação do VHC, também é sugerida uma função de interação com alguns vírus e proteínas celulares. (HOUGHTON e col., 1991; HOUGHTON e col., 1993; HAYASHI e col., 1993; MONDELLI e col., 1994; TANAKA & SHIMOTOHNO, 1998)

### **Regiões estruturais do genoma do VHC (Core, E1, E2/NS1)**

#### **Core (C)**

O Core compreende a região do nucleocapsídeo do VHC. É uma proteína de peso aproximado de 19kD e altamente conservada entre os genótipos do VHC. Apresenta um alto conteúdo de resíduos de arginina e lisina, um achado típico de proteínas de nucleocapsídeo. Esta região é alvo da seqüência de primers tipo-específicos da técnica de genotipagem descrita por Okamoto e cols.; também a técnica de sorotipagem (Chiron RIBA HCV serotyping strip diagram) utiliza fitas de nitrocelulose com peptídeos sintéticos da fração do Core e NS4 como antígenos. (OKAMOTO e col., 1992; MONDELLI e col., 1994; BUKH e col., 1995; DIXIT e col., 1995; SIMMONDS, 1995; SHERMAN e col., 1997)

### **Envelope (E1, E2/NS1)**

No genoma do VHC, a região 2 do envelope (E2) é considerada uma região com altos índices de mutação; em destaque observa-se a região hipervariável 1 (RHV1), um pequeno domínio localizado na porção amino terminal. Esta RHV1 provavelmente é resultante de uma alta variação nucleotídea em resposta a pressão imune seletiva do hospedeiro, o que sugere um papel importante no desenvolvimento da cronicidade da doença. Esta heterogeneidade elege a região como uma boa alternativa no estudo das quasispécies do VHC. Outra região hipervariável 2 (RHV2), tem sido observada em algumas cadeias de VHC. A região 1 do envelope (E1), tem sido apresentada como uma proteína glicosilada. (BUKH e col., 1995; BUKH e col., 1995a; McGARVEY e col., 1998; MIZOKAMI & OHNO, 1998; MORTON & KELEN, 1998)

### **Regiões não estruturais do genoma do VHC (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b)**

Como outros membros da família flaviviridae, as proteínas não-estruturais estão provavelmente envolvidas no processo de replicação do VHC. (SIMMONDS, 1995; SMITH e col., 1995)

#### **NS3**

Proteína multifuncional com atividade de protease e seqüências modificadas que sugerem uma atividade de helicase; foi clonada a partir do tipo 1b do VHC isolado na Europa e parece apresentar baixa reatividade aos

tipos 2 e 3 do VHC. (SIMMONDS, 1995; MAERTENS e col., 1998a)

#### **NS4**

A pequena proteína NS4, está associada à protease NS3 como um cofator.

A região NS4 apresenta uma grande variabilidade genotípica o que justifica seu uso nos testes sorológicos (Murex HCV serotyping 1-6 assay e Chiron RIBA HCV serotyping strip diagram) para determinação dos tipos do VHC. As proteínas recombinantes da região NS4 tem sido substituídas por peptídeos sintéticos em muitos testes diagnósticos. (DIXIT e col., 1995; MAERTENS e col., 1998a)

#### **NS5**

Provavelmente apresenta uma atividade RNA-polimerase RNA-dependente, necessária durante a replicação do genoma do VHC. (SIMMONDS, 1995; SMITH e col., 1995; MORTON & KELEN, 1998)

O VHC foi o primeiro vírus a ser descoberto exclusivamente por técnicas de biologia molecular. A primeira geração de testes imunoenzimáticos (EIA) detectava diretamente os anticorpos anti C100-3, um antígeno da região não estrutural do genoma do VHC. A segunda geração de testes, disponível em maio de 1991, basicamente introduziu uma combinação de antígenos da região estrutural (Core) e não estrutural (NS2, NS3 e NS4); mais recentemente, a terceira geração inclui antígenos da

fração NS5. Estes antígenos estão representados na Figura 1. Na tentativa de confirmação da positividade dos testes EIA várias alternativas suplementares têm sido usadas fazendo uso dos mesmos antígenos que os testes EIA, mas com diferentes apresentações. O método immunoblot tem os antígenos fixados em bandas individuais, sobre tiras de nitrocelulose ou nylon; outra opção são pérolas de resina com os antígenos fixados na superfície. Estes ensaios evidenciam indiretamente a infecção pelo VHC, caracterizando a presença de anticorpos. A detecção direta e a quantificação dos vírus são possíveis usando-se uma variedade de técnicas de biologia molecular que permitem o diagnóstico também de amostras soronegativas. A mais comum seria a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que segue após uma reação de transcriptase reversa (RT). A PCR qualitativa utiliza primers principalmente da região 5'NC do genoma do VHC. (GARSON e col., 1990; GARSON e col., 1990a; SMITH e col., 1995; DOORN e col., 1996)

O tempo de origem dos tipos do VHC é muito difícil de ser estimado devido à saturação das substituições nucleotídeas, mas provavelmente tenha ocorrido entre 500 a 2000 anos atrás. Recentemente, vários estudos têm revelado que o VHC exibe uma heterogeneidade considerável em sua estrutura molecular, provavelmente como resultado de pequenos erros na replicação e de mutações espontâneas que ocorrem no genoma. A média de mutação no genoma do VHC em um único indivíduo infectado tem sido estimada entre 1 e  $2 \times 10^{-3}$  trocas nt/sítio/ano e tem-se observado um alto índice de variação na extremidade 5' do genoma que codifica a porção N-



terminal da glicoproteína E2 (HVR1). (BUKH e col., 1995; MIZOKAMI e col., 1996; SMITH e col., 1997; McGARVEY e col., 1998)

Análises das seqüências de ácido nucléico dos VHC, isolados em diferentes partes do mundo, tem demonstrado uma diversidade de até 30% e levando-se em conta essa variabilidade estão divididos em quatro categorias: tipos, subtipos, isolados e quasispécies. Para identificar essas diferenças no genoma do VHC, vários métodos de genotipagem, onde a identificação das seqüências genômicas tipo-específicas são obtidas a partir da análise do produto da PCR e técnicas de sorotipagem que baseiam-se na reação de anticorpos, presentes no soro, com peptídeos antigênicos tipo-específicos, estão sendo descritos. (OKAMOTO e col., 1992; SIMMONDS e col., 1993; DIXIT e col., 1995; DOORN e col., 1996; LAU e col., 1996; SIMMONDS e col., 1996a; CRETEL e col., 1997; PAWLOTSKY e col., 1997)

Para padronizar as várias nomenclaturas descritas em diferentes centros de pesquisa do mundo (Tabela 1), um sistema único de classificação dos genótipos do VHC tem sido proposto. A comparação das seqüências da região NS5 do VHC de variantes de diferentes partes do mundo foram avaliadas e estabeleceu-se que as seqüências genômicas com similaridade menor que 72% com alguma seqüência conhecida, evidencia a existência de um novo tipo viral. Entre aqueles considerados de um mesmo subgrupo (subtipo) o grau de similaridade varia entre 75% e 86% (média 80%); os isolados individuais, para cada um dos grupos apresentados tem 88% de similaridade. Os tipos do VHC devem ser identificados por numerais arábicos para evitar confusão com nomenclaturas anteriores, para os

subtipos a indicação se faz por letras minúsculas, ambos por ordem de descoberta. Seis genótipos (1, 2, 3, 4, 5, 6), apresentando entre 2 e 3 subtipos (a, b, c) para alguns destes genótipos, tem sido sugeridos como padrão de nomenclatura para os VHC. Novas variantes dos VHC têm sido citadas no Vietnã, Tailândia, Burma e Indonésia. Estas variantes foram originalmente classificadas como genótipos 7, 8, 9, 10 e 11. Porém, análises complementares sugeriram que os grupos 7, 8, 9 e 11 deveriam ser classificados dentro do genótipo 6a e o tipo 10 agrupado dentro do tipo 3a. A Figura 2 mostra a árvore filogenética do VHC, com seus tipos e subtipos representados. (SIMMONDS e col., 1994; SIMMONDS e col., 1994a; SIMMONDS, 1995; SIMMONDS e col., 1996a; MIZOKAMI e col., 1996; ADAMS e col., 1997; McGARVEY e col., 1998)

O termo quasispécie representa a heterogeneidade do VHC ocorrida em um mesmo hospedeiro durante o curso da infecção e sugere importantes implicações patobiológicas. A natureza da quasispécie do VHC provavelmente constitui um mecanismo pelo qual o VHC promove um escape imunológico e estabelece a infecção crônica no hospedeiro e por outro lado, também pode estar influenciando os resultados da terapia com interferon em pacientes infectados pelo VHC. As seqüências dos genomas do VHC estão agora disponíveis para todos os seis tipos e diversos subtipos. (BUKH e col., 1995)

**Tabela 1 - Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC**

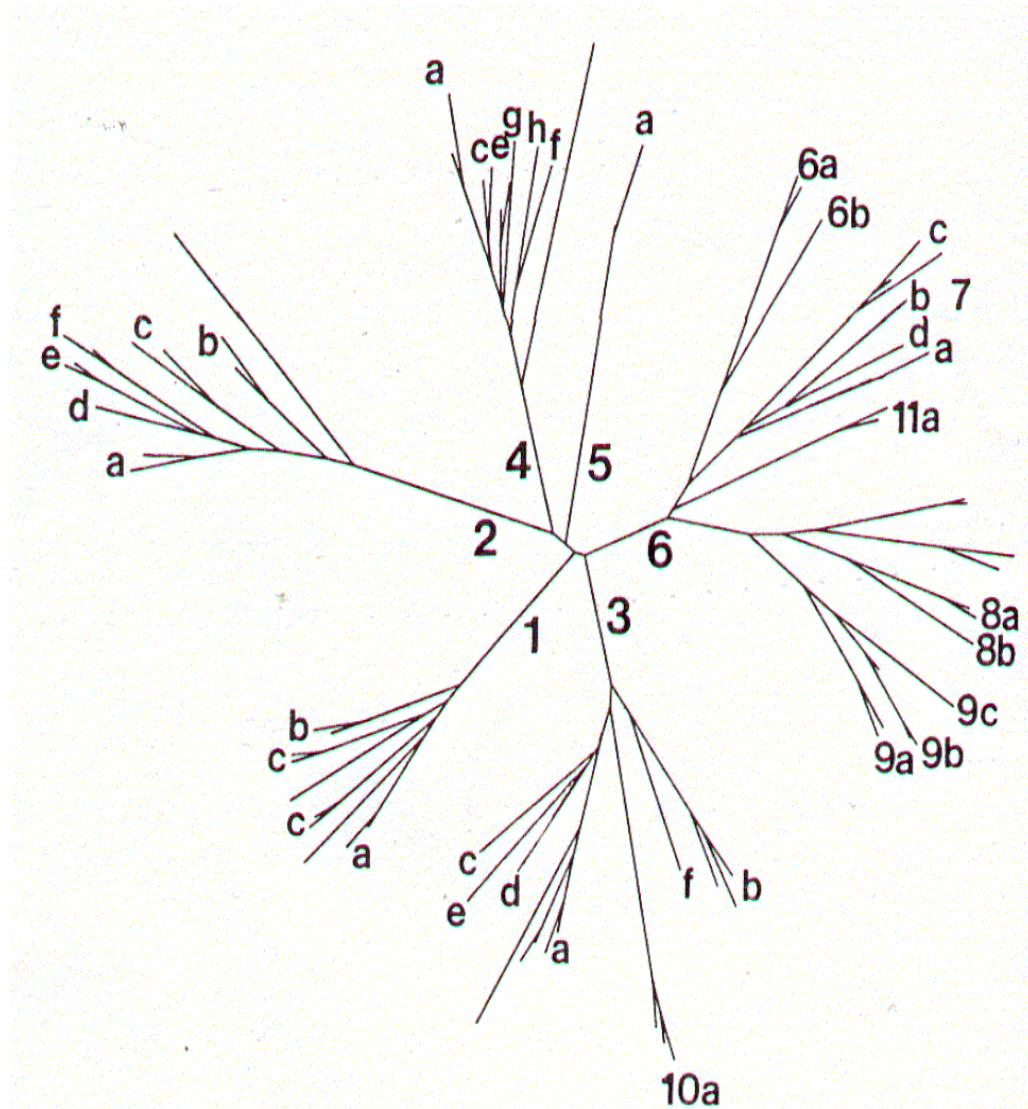
*Genótipo	Chiron	Enomoto	Mori / Okamoto	Chayama	Kohara	Houghton / Cha	Simmonds
1a	I	K-PT	I	I	I	I	1a
1b	II	K-1	II	II	I	II	1b
1c	nc	nc	Nc	nc	nc	nc	nc
2a	III	K-2a	III	III	II	III	2a
2b	III	K-2b	IV	IV	II	III	2b
2c	III	nc	Nc	nc	nc	III	nc
3a	IV	nc	V	nc	nc	IV	3
3b	IV	nc	VI	V	nc	IV	nc
4a **	nc	nc	nc	nc	nc	nc	4
5a	V	nc	nc	nc	nc	V	nc
6a	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc

\* Proposta de nomenclatura unificada das seqüências do VHC (em comparação com os esquemas preexistentes) (Chayama, Chiron, Enomoto, Houghton/Cha, Kohara, Mori/Okamoto, e Simmonds). Esta classificação está baseada na análise filogenética da região NS5 e outras codificadoras. As seqüências não classificadas originalmente pelos autores estão indicadas como "nc".

\*\* Tipo 4a foi um nome proposto para os genótipos encontrados no Egito e Oriente Médio, com base nas seqüências das regiões do Core e NS5. Existem semelhanças com outras variantes do tipo 4 encontradas na África Central que estão sendo investigadas a partir de outras regiões do genoma do VHC. (SIMMONDS e col., 1993; SIMMONDS, 1995; LAU e col., 1995)

Esta classificação tem interesses epidemiológicos óbvios, e atualmente também, implicações clínicas. A influência do tipo do VHC sobre o desenvolvimento de cirrose tem sido reportado. Porém, tem se observado recentemente que a cirrose pode ocorrer indiferentemente ao tipo viral infectante. Também a relação entre os tipos do VHC e a resposta à terapia com interferon tem sido investigada. De fato, pacientes infectados com os tipos 2 ou 3 são os que mais apresentaram resposta sustentada a terapia, quando comparados aos pacientes portadores do tipo 1. (LERUEZ-VILLE e col., 1998)

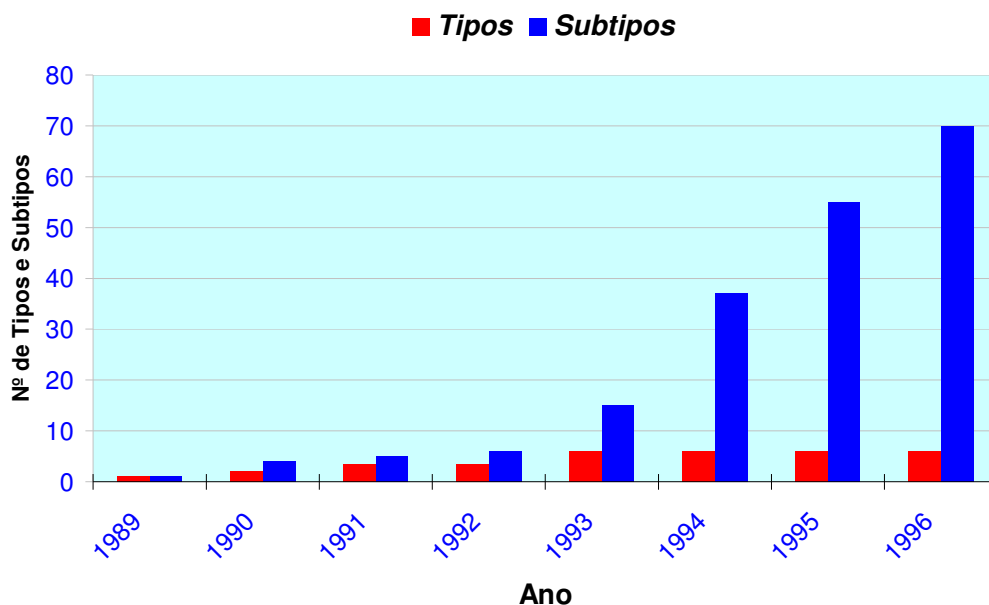
**Figura 2 - Árvore filogenética representado os tipos de 1 a 6 do VHC e seus subtipos**



Árvore filogenética das seqüências NS5b do VHC. Seqüências nucleotídeas das posições 7975-8196 (numeradas a partir codon de iniciação da poliproteína AUG) da região NS5b. Nos ramos maiores estão numerados os tipos e nos menores, discriminados por letras, os subtipos. A variante "10a" pode ser considerada como um subtipo do tipo 3 e as variantes "7a", "7b", "8a", etc, como subtipos do tipo 6. (ADAMS e col., 1997; SMITH & SIMMONDS, 1998)

O Gráfico 1 mostra a evolução das descobertas dos tipos e subtipos do VHC ao longo dos anos 1989 a 1996. (SMITH & SIMMONDS, 1998)

**Gráfico 1 - Evolução das descobertas dos tipos e subtipos do VHC ao longo dos anos 1989 a 1996**



Os tipos do VHC estão representados pelas linhas vermelhas, e os subtipos pelas linhas azuis.

A importância clínico-patológica de cada genótipo é assunto corrente e de intensa investigação, vários estudos discutem os diferentes prognósticos da hepatite C e a resposta ao tratamento com interferon-alfa, teoricamente vinculados aos diversos tipos do VHC. (WEBBER e col., 1996)

O genótipo do VHC pode ser determinado em uma amostra clínica de várias formas. O método mais direto e preciso seria o seqüenciamento do genoma do vírus em uma região que seja suficientemente divergente para distinguir entre os tipos virais e seus subtipos. As regiões eleitas, as quais estão citadas em grande número de referências, incluem o Core, E1, NS4b e

NS5b. A amplificação do genoma e o seqüenciamento, seguidos pela comparação das seqüências e construção da árvore filogenética para confirmação, seriam as metodologias consideradas como “padrão ouro”. Porém, o seqüenciamento apresenta altos custos e grandes dificuldades prático-laboratoriais inclusive a necessidade de pessoal e equipamento técnico especializado, que dificultariam o estudo dos tipos do VHC em um número grande de pacientes ou em um laboratório sem estrutura para técnicas de biologia molecular. (KUO e col., 1989; MAHANEY e col., 1994; LAU e col., 1995; LAU e col., 1996; YUN e col., 1996; LERUEZ-VILLE e col., 1998; SMITH & SIMMONDS, 1998)

A identificação dos genótipos torna-se importante na investigação da história natural e avaliação clínica da infecção pelo VHC. Diferentes métodos os quais apresentam um leque de vantagens e desvantagens existem para identificar e diferenciar os genótipos. Vários aspectos devem ser levados em consideração como a especificidade e sensibilidade, também devem ser avaliados itens como custo, tempo de manuseio e facilidades de uso. (PRESCOTT e col., 1996)

Vários laboratórios produziram suas próprias técnicas e nomenclaturas para identificação dos genótipos do VHC que têm sido exaustivamente descritas na literatura como a PCR tipo-específica descrita por Okamoto e cols. e a Inno-LIPA, uma alternativa que parte da hibridação reversa do cDNA amplificado da região 5'NC com probes de oligonucleotídeos específicas immobilizadas sobre fitas de nitrocelulose. O VHC também pode ser tipado pela análise dos fragmentos polimórficos gerados por enzimas de

restrição oriundos de várias regiões do genoma viral, inclusive 5'NC. A identificação dos maiores tipos do VHC também pode ser obtida pela hibridação dos amplicons da região 5'NC com probes marcadas radioativamente. Além das técnicas de genotipagem, uma nova alternativa para a identificação dos tipos do VHC seria a sorotipagem, ou seja, a identificação de anticorpos tipo-específicos contra as regiões NS4 e também do Core do VHC, sem a necessidade da presença da partícula viral ou de técnicas de biologia molecular. (FORNS e col., 1996; PRESCOTT e col., 1996)

### **Técnicas de tipagem do VHC: Genotipagem (Biologia Molecular)**

#### **Tipo-específico com utilização de primers da região do Core**

##### **Diferencia os genótipos de 1 a 6**

Esta técnica, descrita por Ohno e cols. em 1997. Consiste em uma PCR que utiliza um par de primer universal e amplifica um fragmento da região do Core do VHC, seguido de uma segunda amplificação (nested-PCR) com primers tipo-específicos para os genótipos 1a, 1b, 1d, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a e 6a. A revelação dos genótipos é feita em gel de agarose e brometo de etídeo. Pode haver dificuldades na interpretação de algumas bandas o que levaria a necessidade de um teste complementar ou o seqüenciamento do genoma para confirmação dos resultados. (OHNO e col., 1997; OHNO & MISOKAMI, 1998)

### **Tipo-específico com utilização de primers da região NS5**

#### **Diferencia os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a e 3b**

Esta técnica, descrita por Chayama em 1993, consiste na PCR de um fragmento da região NS5 do VHC, apenas uma etapa de amplificação, onde são utilizados primers tipo-específicos para os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a e 3b. A revelação é feita em gel de agarose. Alguns fragmentos gerados, devido ao pequeno tamanho, apresentam-se como negativos na interpretação visual do gel. (CHAYAMA e col., 1993; KAZUAKI, 1998)

### **Tipo-específico com utilização de primer da região do Core**

#### **Diferencia os genótipos, 1a, 1b, 2a, 2b e 3a**

Esta técnica, descrita por Okamoto e cols., consiste em uma PCR, onde o par de primer universal baseia-se na região do Core do genoma do VHC. Uma segunda amplificação (nested-PCR) faz uso de primers tipo-específicos para os genótipos 1a, 1b, 2a e 2b. Posteriormente, em 1993, foram acrescentados primers para diagnóstico do genótipo 3a. (OKAMOTO e col., 1992; OKAMOTO e col., 1993; OHNO e col., 1995; YUN e col., 1997)

### **Reação de hibridação reversa (LIPA- Line Probe Assay), região 5'NC**

#### **Diferencia os genótipos de 1 a 6 e os subtipos 1a, 1b, 2a/c, 2b, 2d, 2i, 3a-c, 4a-h, 5a, 6a e 10a**



Esta técnica descrita por Stuyver e cols., faz uso de fitas de nitrocelulose, onde estão imobilizadas paralelamente sondas de oligonucleotídeos da região 5'NC complementares a cada tipo ou subtipo específicos do VHC. Estas fitas são hibridizadas em condições de alta estringência com o produto da PCR marcados com primers biotinilados no processo de amplificação. Após a hibridação, um conjugado de avidina com enzimas que terá a função de ligar-se ao híbrido biotinilado, é adicionado. O substrato proporcionará a formação de um produto colorido que irá precipitar-se na fita e revelar o tipo viral presente na amostra. (STUYVER e col., 1993; MAERTENS & STUYVER, 1998)

### **RFLP (análise dos fragmentos polimórficos gerados por enzimas de restrição), região 5'NC**

#### **Diferencia os genótipos de 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4, 5 e 6**

Na técnica de RFLP descrita por Nakao, e cols., após a PCR da região 5'NC o produto é submetido a digestão por enzimas de restrição que conseqüentemente geram fragmentos de tamanhos característicos para cada um dos genótipos do VHC. O método permite a diferenciação dos genótipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5 e 6. Primeiramente, o diagnóstico e diferenciação dos fragmentos necessitavam de marcação com radioisótopos. A partir de 1995, Davidson, e cols., a separação feita em gel de agarose de alta resolução eliminou a necessidade do uso de material radioativo. (NAKAO e col., 1991; McOMISH e col., 1993; DAVIDSON e col., 1995; MARSHALL e col., 1997; DAVIDSON & SIMMONDS, 1998)

## **Técnicas de tipagem do VHC: Métodos sorológicos**

### **Enzima imunoensaio (ELISA) modificado (SAI-3 / SAI-6)**

#### **(Murex HCV Serotyping Assay)**

#### **Utiliza peptídeos sintéticos derivados da região NS4**

Este método descrito por Simmonds e cols., em 1993 é realizado através de um ELISA modificado que utiliza peptídeos sintéticos derivados das regiões genômicas NS4a e NS4b na captura dos anticorpos específicos aos genótipos 1, 2 e 3 do VHC. Posteriormente, em 1995, Bhattacharjee, e cols., acrescentaram os peptídeos para os tipos 4, 5 e 6. Este método discrimina os tipos e não os subtipos do VHC. (SIMMONDS e col., 1993; BHATTACHERJEE e col., 1995; PRESCOTT & SIMMONDS, 1998)

### **Immunoblot sobre fitas de nitrocelulose (RIBA HCV-serotyping strip)**

#### **Utiliza peptídeos da região do Core e NS4**

Este método descrito por Dixit, em 1995 consiste em um suporte sólido de nitrocelulose onde estão fixadas cinco linhas com peptídeos sintéticos sorotipo-específicos do VHC. Nestas fitas encontramos cinco diferentes peptídeos sorotipo-específicos da região NS4 e dois da região do Core do genoma do VHC que possibilitam a discriminação dos tipos virais 1, 2 e 3. (DIXIT e col., 1995; CRETEL e col., 1997; LEÓN e col., 1997)

A introdução de testes comerciais para genotipagem e mais recentemente os imunoenzimáticos de sorotipagem, tem favorecido estudos epidemiológicos e de distribuição dos tipos e subtipos do VHC em todo o mundo. Porém, estes métodos devem ser continuamente modificados para acompanhar o rápido aumento de informações coletadas sobre a heterogeneidade das seqüências do VHC. Baseados nessa premissa, nosso trabalho faz parte deste processo evolutivo de investigação e avaliação dos tipos VHC circulantes na cidade de São Paulo. (DAVIDSON e col., 1995; SACCO e col., 1997)

Do ponto de vista epidemiológico, fatores prognósticos, clínicos, virológicos e de severidade no que diz respeito à hepatite C não estão bem definidos. Os fatores que têm sido considerados são a modalidade da infecção, idade do paciente, duração da doença, genótipo do vírus, quantificação viral, grau de variação do vírus infectante, imunidade do hospedeiro e co-fatores (hepatite B e abuso de álcool). (MOYER e col., 1999)

Na população em geral, os altos índices de prevalência de infecção pelo VHC são encontrados em pessoas do sexo masculino e com idade entre 30 e 49 anos. A respeito do padrão étnico-racial na doença aguda, os negros têm uma prevalência substancialmente mais alta de infecção quando comparados com os de raça branca, mas a prevalência varia na população com base nos fatores de risco para a infecção. (ALTER e col., 1998)

A prevalência mundial da infecção pelo VHC em doadores de sangue varia de 0.04% a 26%. Índices muito baixos (0,04% a 0,09%) têm sido

reportados no Reino Unido e Escandinávia, Nova Zelândia e algumas áreas do Japão (Okimawa). Índices de baixas prevalências (0,15% a 0,5%) têm sido encontrados nos Estados Unidos, Jamaica, Europa Ocidental e Austrália. Prevalências moderadas (0,6% a 1%) têm sido documentadas em algumas áreas do Sul da Europa, Quênia, Tailândia e Rússia (Moscou). Índices entre 1% e 1,5% tem sido documentados na Índia (Delhi), China, Cuba e Etiópia. Altas prevalências (1,6% a 3,5%) no Japão, Indonésia, algumas áreas da Rússia, Brasil e Oriente Médio. Índices extremamente altos em algumas regiões de Camarões (6,4%) e Egito (14%). Prevalências consideradas altíssimas foram encontradas na cidade do Cairo (26%). (QUER & ESTEBAN, 1998)

No Brasil, o estudo recentemente publicado por Focaccia e cols., onde especificamente a população da cidade de São Paulo foi investigada, não foram incluídos dados de banco de sangue, a prevalência estimada de 1,42% para a hepatite C foi mencionada após análise de 1.055 amostras de soros. (FOCACCIA e col., 1998)

Informações recentes sobre as divergências dos genótipos do VHC, podem auxiliar no entendimento das várias características de sua distribuição geográfica. Para certas regiões do mundo, um único tipo de VHC ocorre com seus diversos subtipos, sugerindo um modelo de infecção endêmica de longa data. Estas regiões endêmicas potencialmente são a Guiné e costa-ocidental Africana para o tipo 1, centro-oeste Africano para tipo 2, o norte Indiano e subcontinente para o tipo 3, África central para tipo 4 e Ásia sul-oriental para o tipo 6. Uma área endêmica para o tipo 5 está

sendo investigada e parece ser na região sul-africana com o tipo 5a.

Contrastando, para outras partes do mundo, mais de um tipo de vírus estão presentes e cada um destes representados por poucos subtipos. Estes achados são compatíveis com áreas endêmicas de introdução relativamente recente e limitadas do VHC. Por exemplo, o norte europeu e América do Norte onde os tipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3a são comuns e Japão onde apenas os tipos 1b, 2a e 2b ocorrem. (SIMMONDS e col., 1993a; LAU e col., 1996; SMITH e col., 1997; GONZÁLES-PERALTA, 1998; SMITH & SIMMONDS, 1998)

O conhecimento da variabilidade genética tem ampliado as investigações sobre as relações dos tipos do VHC quanto aos aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção. Deste modo, tem sido particularmente estudadas as diferenças geográficas e as prevalências de genótipos distintos, assim como as influências dos fatores de risco sobre sua distribuição. Também, tem-se prestado especial atenção ao significado clínico (gravidade da doença hepática e resposta ao tratamento com interferon) da infecção relacionado aos diversos genótipos do VHC. Outro tema de interesse seria o estudo das repercussões que a heterogeneidade genética e antigênica do VHC poderiam ter sobre o diagnóstico da doença. (ALONSO e col., 1998)

Existem algumas importantes variações geográficas na prevalência dos genótipos. Os tipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3a são os mais comuns encontrados no Brasil, Europa Ocidental e Estados Unidos, porém 1b, 2a e 2b são mais freqüentemente encontrados no Japão e Taiwan. O tipo 3 é mais prevalente

na Índia, Bangladesh e outras partes da Ásia. O tipo 4 no Oriente Médio, tipo 5 na África do Sul e tipo 6 em Hong Kong e Macau. Recentemente, na Tailândia, Burma, Indonésia e Vietnã foram identificados os tipos 7, 8, 9, 10 e 11. Porém posteriormente foram agrupados no tipo 6 as variantes 7, 8, 9 e 11 e a variante 10a, incluída como subtipo do tipo 3. (DIXIT e col., 1995; HOLLAND e col., 1996; MIZOKAMI e col., 1996; SIMMONDS e col., 1996a; ADAMS e col., 1997; BASSIT e col., 1999a;)

Estão abaixo mencionados alguns dados sobre a distribuição mundial dos tipos VHC. (Tabela 2)

**Tabela 2 - Distribuição mundial dos tipos do VHC**

<b>País</b>	<b>tipo VHC predominante</b>	<b>Referência</b>
<i>Américas</i>		
Brasil	1,3,2	HOLLAND e col., 1996; KRUG e col., 1996; PEIG GINABREDA e col., 1997; CAMPIOTTO e col., 1998; CAVALHEIRO & BARONE, 1998; BASSIT e col., 1999; BASSIT, e col., 1999a
Peru	1b	BUKH e col., 1995; PEIG GINABREDA e col., 1997
Argentina	1a,1b,2c	BUKH e col., 1995; PEIG GINABREDA e col., 1997
Honduras	1a,1b,3a	YUN e col., 1996
Canadá	1,2,3	ANDONOV & CHAUDHARY, 1994; BUKH e col., 1995
USA	1,2,3	MAHANEY e col., 1994; LAU e col., 1995; ZEIN e col., 1995; LAU e col., 1996; MARSHALL e col., 1997

continuação

<b>País</b>	<b>tipo VHC predominante</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Europa</i></b>		
Escócia	1a,3a,2a,1b	DAVIDSON e col., 1995
Finlândia	2,3,1	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995
Bélgica	1,4,3,2	BUKH e col., 1995
Holanda	1b,1a,2a,3a	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995
Suécia	1,3,2	BUKH e col., 1995
Hungria	1b,1a	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995
Inglaterra	1,3,2	WATSON e col., 1996
Espanha	1b,3a,1a	BASARAS e col., 1997; ALONSO e col., 1998
França	1a,1b,2a,3,4	DUSHEIKO e col., 1994; QU e col., 1994; BUKH e col., 1995; GOURNAY e col., 1995
Itália	1b,1a,2c,2b,2a,3,4	DUSHEIKO e col., 1994; PISTELLO e col., 1994; SACCO e col., 1997; SPADA e col., 1998
Reino Unido	1,2,3	DUSHEIKO e col., 1994; BUKH e col., 1995
Portugal	1	DUSHEIKO e col., 1994
Europa Ocidental	1,3,2	SIMMONDS e col., 1996
Noruega	3,1,2	BELL e col., 1996
Alemanha	1,2,3	BUKH e col., 1995
Grécia	1,2,3	BUKH e col., 1995

continuação

<b>País</b>	<b>tipo VHC predominante</b>	<b>Referência</b>
<i>Ásia</i>		
Japão	1b,2a,2b	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995
Rússia	1,3	BUKH e col., 1995
Nepal	1,3	BUKH e col., 1995
Nova Zelândia	1,3,2	BUKH e col., 1995
Taiwan	1b,2a,2b	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995
Índia	1,3	VALLIAMMAI e col., 1995
Vietnã	1,2,6 (7,8,9)	BUKH e col., 1995; ADAMS e col., 1997
Hong Kong	1,6a,3	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995; ; PRESCOTT e col., 1996; ADAMS e col., 1997
Macau	6a	DAVIDSON e col., 1995; ADAMS e col., 1997
Singapura	1b,3a,2a	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995
Malásia	3a,1	DAVIDSON e col., 1995
Tailândia	3a,6 (7,8,9),1	ADAMS e col., 1997; SONGSIVILAI e col., 1998
Indonésia	1,2,3 (10),6 (11)	BUKH e col., 1995; ADAMS e col., 1997
Israel	1,2,3	BUKH e col., 1995
China Ocidental (*norte)	1b, 1a*,2a	WANG e col., 1993; BUKH e col., 1995; NIU e col., 1995; WU e col., 1995
Korea	1,2	BUKH e col., 1995



continuação

País	tipo VHC predominante	Referência
<b>África</b>		
Tanzânia	4	RAPICETTA e col., 1998
Burundi	4	BUKH e col., 1995; KLETER e col., 1998
Gabão	4	KLETER e col., 1998
Zaire	4	BUKH e col., 1995
África do Sul	1,5a	BUKH e col., 1995; CHAMBERLAIN e col., 1997
África Central (Gabão)	4	XU e col., 1994
Nigéria	1,4	ONI & HARRISON, 1996
Egito	4	DUSHEIKO e col., 1994; BUKH e col., 1995; KLETER e col., 1998; RAPICETTA e col., 1998
Camarões	4	BUKH e col., 1995
<b>Oriente Médio</b>		
Arábia Saudita	1,4	DUSHEIKO e col., 1994; BUKH e col., 1995
Turquia	1,3	BUKH e col., 1995
Yemen	4	DUSHEIKO e col., 1994
<b>Austrália</b>		
Austrália	1,2,3,5	BUKH e col., 1995; DAVIDSON e col., 1995

conclusão

A determinação dos genótipos do VHC pode apresentar implicações importantes na epidemiologia podendo também ser útil no prognóstico e tratamento da infecção pelo VHC. Estas e outras investigações sobre a importância da identificação dos tipos VHC enfatizam a necessidade de um método simples de genotipagem na prática clínica, auxiliando no prognóstico do tratamento e talvez no direcionamento apropriado relativo a maioria dos pacientes. (PRESCOTT & SIMMONDS, 1998; SPADA e col., 1998)

Diferentes métodos tem sido desenvolvidos para identificar os diferentes tipos virais infectantes do VHC. A maioria destas técnicas necessita da PCR para amplificação das seqüências genômicas, porém a PCR consome um tempo exaustivo de trabalho, apresenta altos custos e torna-se impraticável na rotina com grandes quantidades de amostras. O ensaio proposto em nosso trabalho é um ELISA competitivo que faz uso de peptídeos sintéticos para identificação dos seis grandes tipos do VHC já descritos. A grande vantagem do método sorológico sobre os de biologia molecular seria a capacidade de processamento de um grande número de amostras em um único dia de trabalho, além da expectativa de uso em laboratórios de rotina que não possuam estrutura para desenvolverem técnicas voltadas para a biologia molecular. (KUO e col., 1989; CERINO e col., 1996; PRESCOTT & SIMMONDS, 1998)

## **OBJETIVO**

Analisar a prevalência dos diferentes tipos do vírus da hepatite C em uma população de pacientes portadores crônicos do VHC, através de um método sorológico (Murex HCV Serotyping 1-6 Assay).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras de sangue dos pacientes**

O sangue dos pacientes foi coletado por punção venosa, a vácuo com uso de tubo seco de 10ml. Destas amostras foram separados os soros, num prazo máximo de 2 horas após colheita, por centrifugação a 1.500 rpm/10 min., aliquotados e conservados a -20°C até o uso.

### **Pacientes estudados**

Um total de 219 pacientes apresentaram diagnóstico clínico e laboratorial (ELISA 2<sup>a</sup> geração) para hepatite C. A PCR para o VHC pelo método nested-PCR, também evidenciou a presença da partícula viral no soro deste grupo estudado. Todos os envolvidos na pesquisa relataram domicílio atual na cidade de São Paulo, exceto dois residentes em Brasília. Os pacientes passaram por avaliação clínica e coleta de amostras no período entre 1990 e 1997. Os dados relativos à idade, sexo e modo e transmissão foram obtidos dos prontuários dos pacientes.

### **PCR - Reação em Cadeia da Polimerase para o VHC (Nested-PCR)**

Todos os pacientes incluídos na pesquisa apresentaram positividade para a reação da PCR, ou seja, foi evidenciada a presença da partícula do VHC no soro. Para a PCR, foram utilizados primers da região 5'NC do genoma viral, os dois pares de primers, internos e externos utilizados na reação estão descritos a seguir: (GARSON e col., 1990; GARSON e col., 1990a)

PTC1- 5'CGT TAG TAT GAG TGT CGT G3'  
NCR2-5'ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT3'  
PTC3- 5'AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG3'  
NCR4-5'CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT3'

#### **Reação de extração do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA) do VHC**

O RNA do VHC foi extraído a partir de 100µl de soro somados a 250 µl de Trizol LS (Gibco BRL). Após rápida agitação, foi acrescentado 50µl de Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e o tubo submetido novamente a agitação vigorosa. Em seguida a solução foi centrifugada a aproximadamente 10.000xg por 5 minutos. Com a separação da fase aquosa, que foi transferida para um novo tubo contendo 300µl de Isopropanol, houve uma centrifugação de 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado resultante lavado com Etanol. Após a retirada do volume líquido, com a secagem completa do Etanol residual, o precipitado de RNA foi submetido a uma reação de transcriptase reversa para obtenção do cDNA. Os componentes da solução para a transcriptase reversa foram:

5µl de tampão 5x concentrado para enzima transcriptase reversa

(Gibco BRL)

2 $\mu$ l de dithiothreitol (DTT) 0,1 M (Gibco BRL)

2 $\mu$ l de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM (Pharmacia Biotech)

1 $\mu$ l de inibidor de ribonuclease clonado (Gibco BRL) 10U/ $\mu$ l

1 $\mu$ l de enzima transcriptase reversa (Super Script II - Gibco BRL)

0,5 $\mu$ l de primer NCR2 a 50pmol/ $\mu$ l

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 25 $\mu$ l

A reação de transcriptase reversa ocorreu a uma temperatura de 42°C por 60 minutos, seguido por 15 minutos a 95°C.

O cDNA resultante foi submetido a nested-PCR nas seguintes condições:

### **Reação em cadeia da polimerase (nested-PCR)**

#### **Primeira amplificação**

Ao volume de 10 $\mu$ l de cDNA, foi adicionado 40 $\mu$ l de uma solução contendo:

5 $\mu$ l de tampão da enzima Taq-DNA-polimerase 10x concentrado (Gibco BRL)

2 $\mu$ l de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM (Pharmacia Biotech)

1,2 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 50mM (Gibco BRL)

0,5µl de primer (externo) PTC1 á 50pmol/µl

0,5µl de primer (externo) NCR2 á 50pmol/µl

0,5µl de enzima Taq-DNA-polimerase (Gibco BRL)

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 40µl

Este cDNA foi submetido ao primeiro ciclo de amplificação, em termociclador automático (Pharmacia LKB-Gene ATAQ Controler), de acordo com as seqüências de tempo e temperatura descritas a seguir na Tabela 3.

**Tabela 3 - Ciclos de temperatura e tempo da reação nested-PCR**

Temperatura	Tempo	
94°C	40seg	25 vezes
55°C	40seg	
Seguidos por		
72°C	7min	1 vez

#### **Segunda amplificação (nested-PCR)**

Ao volume de 5µl resultante da primeira amplificação, foi adicionado 45µl de uma solução contendo:

5µl de tampão da enzima Taq-DNA-polimerase 10x concentrado (Gibco BRL)

3µl de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM (Pharmacia Biotech)

1,2µl de MgCl<sub>2</sub>, 50mM (Gibco BRL)

0,5µl de primer (interno) PTC3 á 50pmol/µl

0,5µl de primer (interno) NCR4 á 50pmol/µl

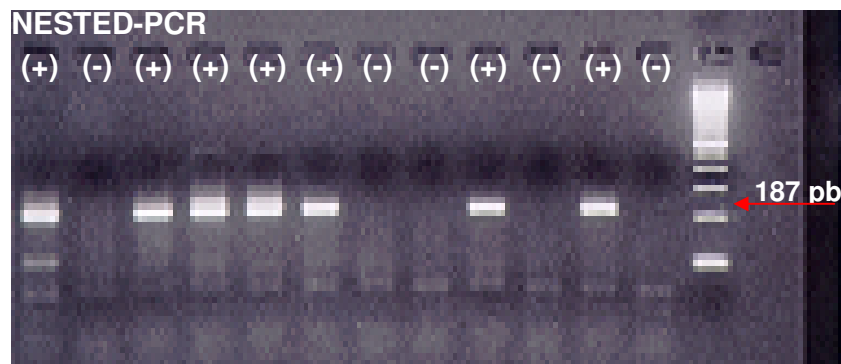
0,5µl de enzima Taq-DNA-polimerase (Gibco BRL)

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 45µl

Os ciclos de temperatura foram os sugeridos para o primeiro ciclo de amplificação (Tabela 3).

Somente o produto da segunda amplificação foi submetido corrida a eletroforética, em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídeo (Gibco BRL) e visualizados através de radiação ultravioleta. A positividade, ou seja, a presença de fragmentos amplificados foi evidenciada com a visualização de uma banda fluorescente localizada a altura de 187pb. Foi utilizado, como referência, padrão de peso molecular de 100pb (Figura 3). (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987; GARSON e col., 1990; GARSON e col., 1990a)

**Figura 3 - Resultados da PCR em gel de agarose corados com brometo de etídeo**





## **Sorotipagem do VHC**

O diagnóstico sorológico dos tipos do VHC foi realizado com a metodologia descrita por Simmonds e cols. e trata-se de teste comercialmente disponível no mercado (Murex HCV Serotyping 1-6 Assay).

O mapeamento dos epítomos da proteína NS4 do genoma do VHC revelou duas grandes regiões antigênicas (aminoácidos residuais 1691 a 1708 e 1710 a 1728) que se mostraram altamente variáveis entre os genótipos 1, 2 e 3 e cujos anticorpos tipo-específicos puderam ser detectados. Peptídeos tipo-específicos foram sintetizados e corresponderam a estas duas regiões e posteriormente foram empregados na técnica de ELISA indireto. Como mais genótipos foram descobertos, uma linha completa de peptídeos para os seis genótipos foi projetada e incluída no ensaio, um total de 21 peptídeos.

Para a detecção dos anticorpos tipo-específicos e eventualmente para eliminação de reações cruzadas com peptídeos heterólogos, um ELISA de competição foi planejado. Amostras do soro foram incubadas junto a soluções bloqueadoras contendo peptídeos heterólogos, estes absorvidos numa reação cruzada. Uma linha de oito poços é usada para cada amostra testada, que inclui um poço positivo e um negativo como referência e seis poços para tipagem de cada amostra. Anteriormente aos soros uma solução bloqueadora de peptídeos heterólogos de competição é adicionada da seguinte forma para cada poço. Por exemplo: o poço para tipagem do VHC tipo 1 terá uma solução bloqueadora contendo peptídeos para os genótipos

de 2 a 6, para o VHC tipo 2 estarão bloqueados os tipos 1,3,4,5 e 6. A mesma lógica é seguida para todos os seis tipos em teste. Ao final, os anticorpos provenientes da amostra testada, só encontrarão disponíveis os peptídeos, na fase sólida, que não se ligaram a nenhum dos peptídeos heterólogos de competição. Ao poço de referência positiva não foram adicionados peptídeos de competição, o que leva qualquer anticorpo anti-NS4 presente na amostra a fixar-se na fase sólida. Ao poço de referência negativa foram adicionados peptídeos de competição para os seis tipos, evitando-se desta forma a ligação de qualquer anticorpo anti-NS4. Na continuidade, uma reação de ELISA clássica acontece, como vamos descrever em seguida. (SIMMONDS e col., 1993; BHATTACHERJEE e col., 1995; PRESCOTT & SIMMONDS, 1998)

### **Reação de ELISA para sorotipagem do VHC**

Cada amostra fez uso de uma linha de 8 poços de uma placa de ELISA.

1. Primeiramente 10µl das soluções bloqueadoras foram adicionadas, como mostra a Figura 4.

**Figura 4 - Base para o ensaio de sorotipagem do VHC**

<b>NB</b>	<b>TB</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>PEPTÍDIOS</b>
U	U	U	U	U	U	U	U	
■	□	■	□	□	□	□	□	<b>1</b>
■	□	□	■	□	□	□	□	<b>2</b>
■	□	□	□	■	□	□	□	<b>3</b>
■	□	□	□	□	■	□	□	<b>4</b>
■	□	□	□	□	□	■	□	<b>5</b>
■	□	□	□	□	□	□	■	<b>6</b>

**NB** Não Bloqueado

**TB** Totalmente Bloqueado

■ peptídeo ausente na solução de competição

□ peptídeo presente na solução de competição

2. Acrescentado as amostras de soro a serem testadas na diluição de 1/20 e feita uma incubação a 37°C por 1 hora.
3. Feitas 4 lavagens com PBST, para eliminação das partículas de anticorpos e peptídeos de competição não fixados a fase sólida da placa.
4. Imediatamente após as lavagens, adicionado 100µl de solução de conjugado (anticorpos anti IgG humana HRP horsedish) na diluição de 1/20.000 com PBST 2% BSA e incubado a 37°C por 1 hora.
5. Feitas 4 lavagens com BPST, para eliminação do conjugado não fixado ao complexo Ag-Ac.
6. Imediatamente após as lavagens, acrescentado 100µl da solução de

substrato (OPD) em cada poço e mantida a placa na temperatura de 37°C por trinta minutos, preferencialmente em ambiente escuro. Uma cor rosa desenvolveu-se nos poços que apresentaram amostras reativas.

7. Acrescentado 50µl de uma solução de Ácido Sulfúrico em cada poço a fim de interromper a reação num mesmo momento para todas as amostras.
8. Feita a leitura da absorbância a 450nm (A450) num prazo máximo de 15 minutos.
9. Interpretados os resultados\*.

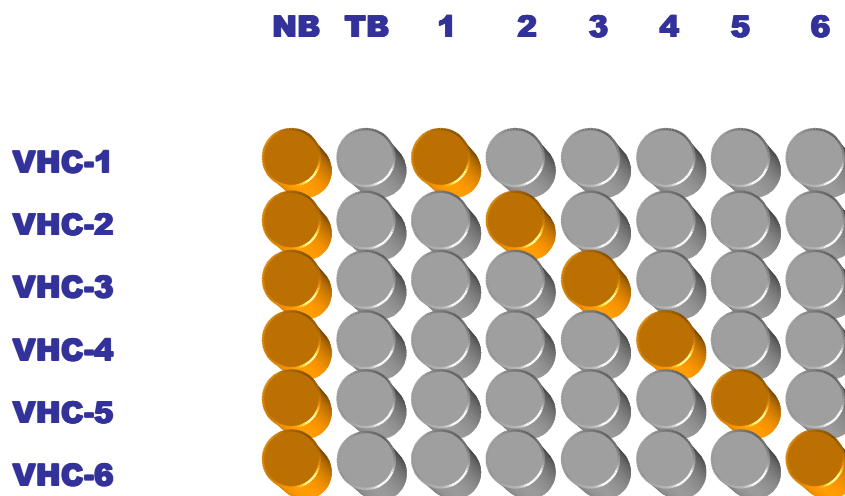
#### **\* Interpretação dos resultados**

Muitas amostras podem ser interpretadas claramente apenas pela leitura visual, apresentando uma alta leitura da densidade ótica no poço não bloqueado (controle positivo) e também em um ou mais dos seis poços da mesma linha, no caso de múltipla infecção. O poço que foi completamente bloqueado deve apresentar-se negativo ou com baixa leitura de densidade ótica. As amostras que apresentaram baixas reatividades podem ser identificadas por uma comparação dos valores das D.O., porém estas amostras devem ser novamente testadas com uma concentração mais alta de soro (diluição 1:10) para confirmação do resultado.

A reação tipo-específica foi considerada significativa quando apresentou valores da DO superiores em duas vezes ou mais os valores da D.O. apresentado pelo poço de referência negativa (completamente

bloqueado). Um esquema de resultados positivos para os tipos de 1 a 6 está representado na Figura 5.

**Figura 5 - Resultados positivos de sorotipagem para tipos de 1 a 6 do VHC**



NB-(controle positivo), poços não bloqueados, não foram adicionados os peptídeos de competição.

TB-(controle negativo), poços completamente bloqueados, foram adicionado peptídeos de competição para todos os tipos testados.

### **Controle de qualidade/Cálculo de resultado**

1. Do valor da absorbância ( $A_{450}$ ) do poço não competidor (poço correspondente à linha H), portanto o controle positivo, deve ser subtraído o valor da absorbância do poço totalmente bloqueado (poço correspondente à linha G), ou controle negativo, e o resultado deve ser maior ou igual a 0,1.
2. Valor da absorbância ( $A_{450}$ ) do poço de maior leitura dividido pelo valor da absorbância do poço não competidor (poço correspondente à linha H),

deve ser maior ou igual a 0,4.

Os critérios 1 e 2 apresentam-se como condição necessária para validação do resultado positivo da amostra testada. (SIMMONDS e col., 1993; LAU e col., 1996; MONTESANO e col., 1996; WEBBER e col., 1996; CRETEL e col., 1997; PAWLOTSKY e col., 1997; LERUEZ-VILLE e col., 1998; PRESCOTT & SIMMONDS, 1998)

Todas as amostras submetidas aos testes da PCR e sorotipagem, foram manipuladas no Laboratório de Investigação Médica, LIM-47, do Instituto dos LIM's do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Considerando-se que as amostras com sorotipo 1, 2 e 3 são independentes e casuais, a comparação das idades entre os 3 grupos foi feita utilizando-se a análise de variância (Estatística F). A comparação das proporções, entre os 3 grupos, dos modos presumidos de aquisição do HCV foi feita através do teste  $\chi^2$ . Não foi possível fazer comparações para algumas variáveis, pois as frequências esperadas foram menores que 1. Na análise final, consideramos antecedentes de transfusão de sangue e hemofilia no mesmo grupo. Assim como os de formas de transmissão desconhecida e os pacientes cujo prontuário não constava a informação (Ignorado).

Nos testes estatísticos utilizados, consideramos  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

Dos 219 pacientes incluídos na pesquisa, todos com resultado positivo pela PCR-VHC, foi possível obter o diagnóstico do tipo do VHC, pela técnica de sorotipagem (Murex HCV Serotyping 1-6 Assay) em 166 pacientes, revelando uma sensibilidade de 75,8%. Os resultados apresentados revelaram a predominância do tipo 1 (70%), seguido pelo tipo 3 (22,3%) e tipo 2 (4,2%). Infecção mista, por 2 ou mais tipos corresponderam a 3,6% destas amostras. (Tabela 4). Os sorotipos foram descritos usando-se a nomenclatura proposta por SIMMONDS e cols., 1994. Quanto à distribuição dos pacientes entre os seis tipos do VHC, temos o seguinte diagnóstico, representado na Tabela 5.

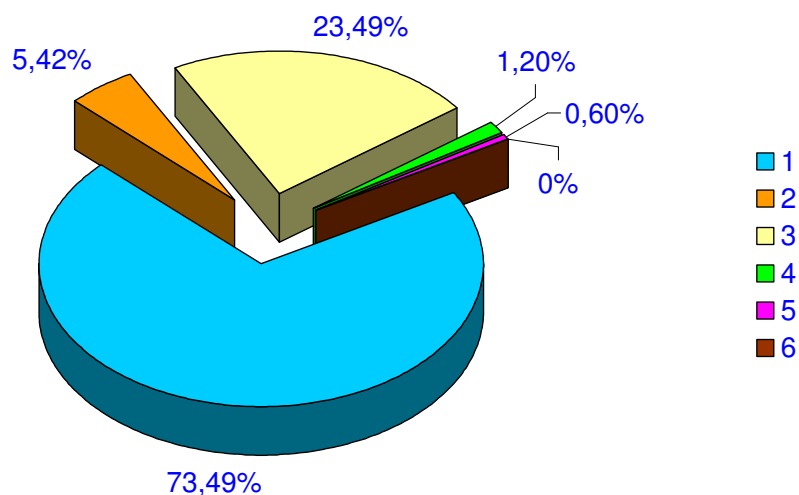
**Tabela 4 - Distribuição dos sorotipos do VHC para 166 amostras diagnosticadas**

Sorotipo	Nº de pacientes	%
1	116	70.0
2	7	4.2
3	37	22.3
1+2	1	0.6
1+3	2	1.2
1+4	2	1.2
1+2+5	1	0.6
<b>Total</b>	166	100.0

**Tabela 5 - Distribuição dos pacientes entre os tipos do VHC de 1 a 6**

Sorotipo	Nº	%*
1	122	73,49
2	9	5,42
3	39	23,49
4	2	1,20
5	1	0,60
6	0	0,00

\* total de pacientes considerados = 166

**Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes entre os tipos do VHC de 1 a 6**

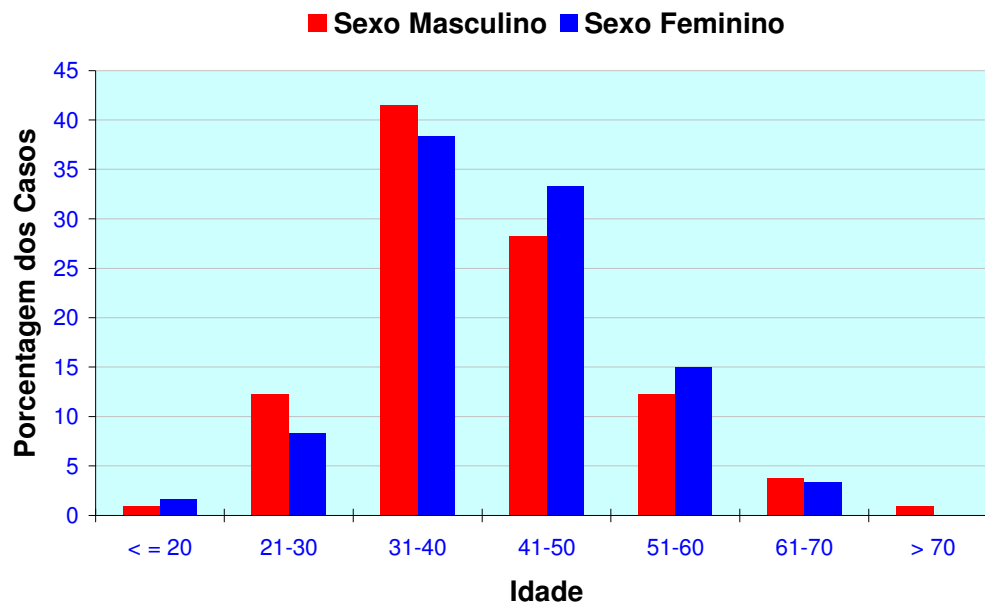
Quanto aos aspectos epidemiológicos, foram analisados a idade, sexo e modo de transmissão. Dos 166 pacientes, 106 (63,9%) eram do sexo masculino e 60 (36,1%) feminino. A idade destes pacientes variou de 12 a 73 anos (média 41,1 anos). (Tabela 6)



**Tabela 6 - Epidemiologia: distribuição dos pacientes estudados, segundo sexo e idade**

Faixa etária (anos)	Sexo				TOTAL	
	Masculino		Feminino		n	%
	n	(%)	n	%	n	%
< = 20	1	0,94	1	1,67	2	1,20
21-30	13	12,26	5	8,33	18	10,84
31-40	44	41,51	23	38,33	67	40,36
41-50	30	28,30	20	33,33	50	30,12
51-60	13	12,26	9	15,00	22	13,25
61-70	4	3,77	2	3,33	6	3,61
> 70	1	0,94	0	0,00	1	0,60
<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>63,86</b>	<b>60</b>	<b>36,14</b>	<b>166</b>	<b>100,00</b>

**Gráfico 3 - Epidemiologia: distribuição dos pacientes estudados, segundo sexo e idade**



Os pacientes foram agrupados em 3 grupos para análise dos dados epidemiológicos, idade, sexo e formas presumidas de aquisição da doença: grupo sorotipo 1, sorotipo 2 e sorotipo 3.

O grupo sorotipo 1, quanto ao sexo, era composto de 74 pacientes do sexo masculino e 48 feminino e a idade variou de 12 a 73 anos (média 40,6 anos). (Tabela 7 e Gráfico 4)

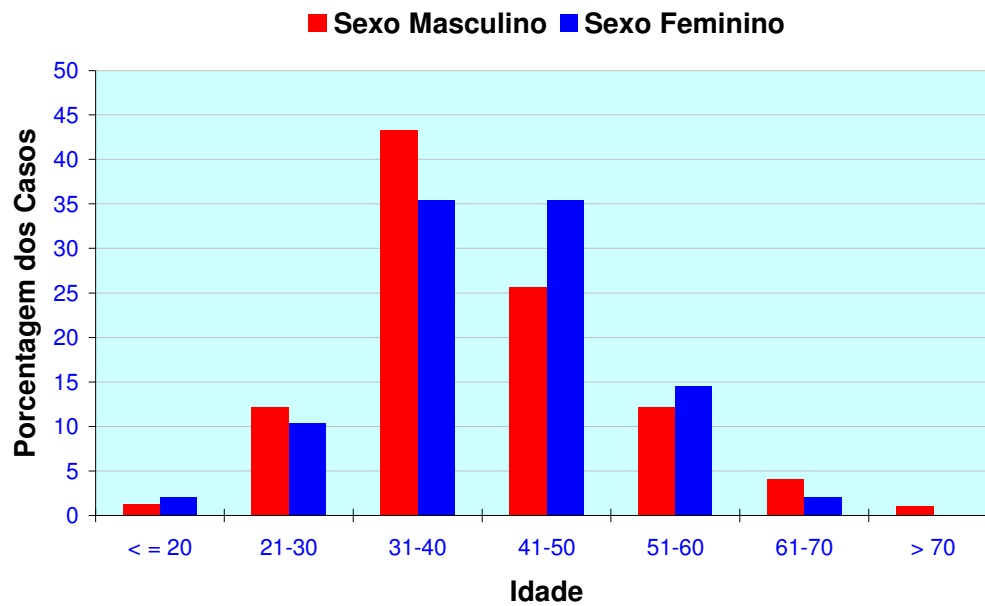
O grupo sorotipo 2, seis eram do sexo masculino e 3 feminino e a idade destes pacientes variou de 35 a 62 anos (média 47,6 anos). (Tabela 8 e Gráfico 5)

O grupo sorotipo 3, vinte e oito eram do sexo masculino 31 feminino e a idade destes pacientes variou de 26 a 67 anos (média 41,1 anos). (Tabela 9 e Gráfico 6)

**Tabela 7 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo sexo e idade**

Faixa etária (anos)	Sexo				TOTAL	
	Masculino		Feminino		n	%
	n	%	n	%	n	%
< = 20	1	1,35	1	2,08	2	1,64
21-30	9	12,16	5	10,42	14	11,48
31-40	32	43,24	17	35,42	49	40,16
41-50	19	25,68	17	35,42	36	29,51
51-60	9	12,16	7	14,58	16	13,11
61-70	3	4,05	1	2,08	4	3,28
> 70	1	1,35	0	0,00	1	0,82
<b>Total</b>	74	100	48	100	122	100

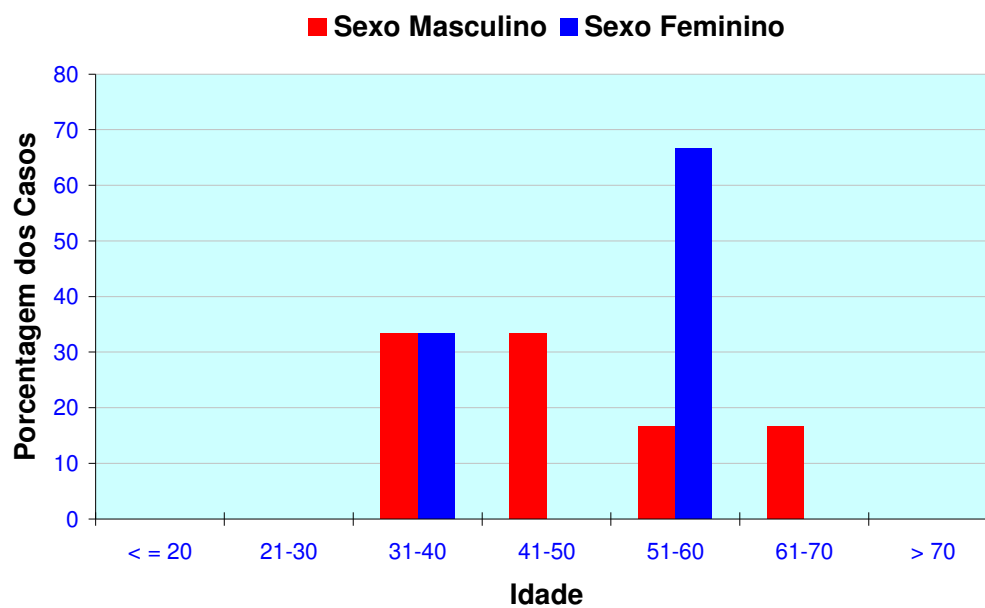
**Gráfico 4 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo sexo e idade**



**Tabela 8 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo sexo e idade**

Faixa etária (anos)	Sexo				TOTAL	
	Masculino		Feminino		n	%
	n	%	n	%	n	%
< = 20	0	0,00	0	0,00	0	0,00
21-30	0	0,00	0	0,00	0	0,00
31-40	2	33,33	1	33,33	3	33,33
41-50	2	33,33	0	0,00	2	22,22
51-60	1	16,67	2	66,67	3	33,33
61-70	1	16,67	0	0,00	1	11,11
> 70	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>3</b>	<b>100</b>	<b>9</b>	<b>100</b>

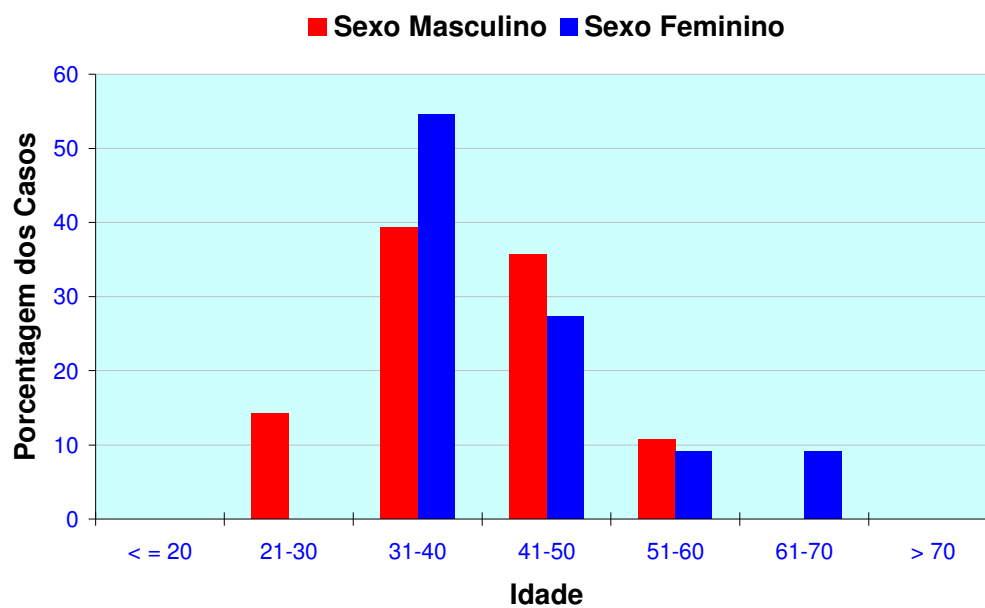
**Gráfico 5 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo sexo e idade**



**Tabela 9 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo sexo e idade**

Faixa etária (anos)	Sexo				TOTAL	
	Masculino		Feminino		n	%
< = 20	n	%	n	%	n	%
< = 20	0	0,00	0	0,00	0	0,00
21-30	4	14,29	0	0,00	4	10,26
31-40	11	39,29	6	54,55	17	43,59
41-50	10	35,71	3	27,27	13	33,33
51-60	3	10,71	1	9,09	4	10,26
61-70	0	0,00	1	9,09	1	2,56
> 70	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>100</b>	<b>39</b>	<b>100</b>

**Gráfico 6 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo sexo e idade**



A distribuição geral, segundo forma presumida de aquisição da doença revela a transfusão de sangue como o antecedente mais observado. (Tabela 10 e Gráfico 7)

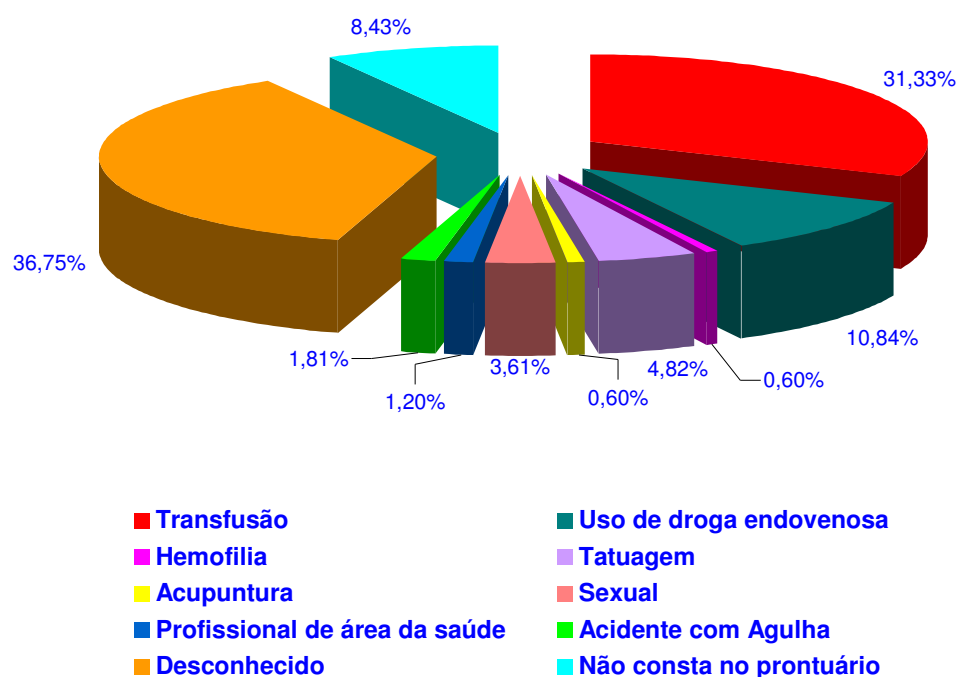
No grupo sorotipo 1, dos 122 pacientes, 38 (31,2%) relataram a transfusão de sangue como provável modo de aquisição do VHC. (Tabela 11 e Gráfico 8)

No grupo sorotipo 2, 33,3% (3/9) dos pacientes relataram a transfusão de sangue e no grupo sorotipo 3, 30,8% (12/39) também a transfusão de sangue foi citada. (Tabelas 12 e 13, Gráficos 9 e 10)

**Tabela 10 - Distribuição dos pacientes estudados segundo forma presumida de aquisição do VHC**

<b>Modo de Aquisição/Antecedente</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Transfusão	52	31,33
Uso de droga endovenosa	18	10,84
Hemofilia	1	0,60
Tatuagem	8	4,82
Acupuntura	1	0,60
Sexual	6	3,61
Profissional de área da saúde	2	1,20
Acidente com agulha	3	1,81
Desconhecido	61	36,75
Não consta no prontuário	14	8,43
<b>Total</b>	<b>166</b>	<b>100</b>

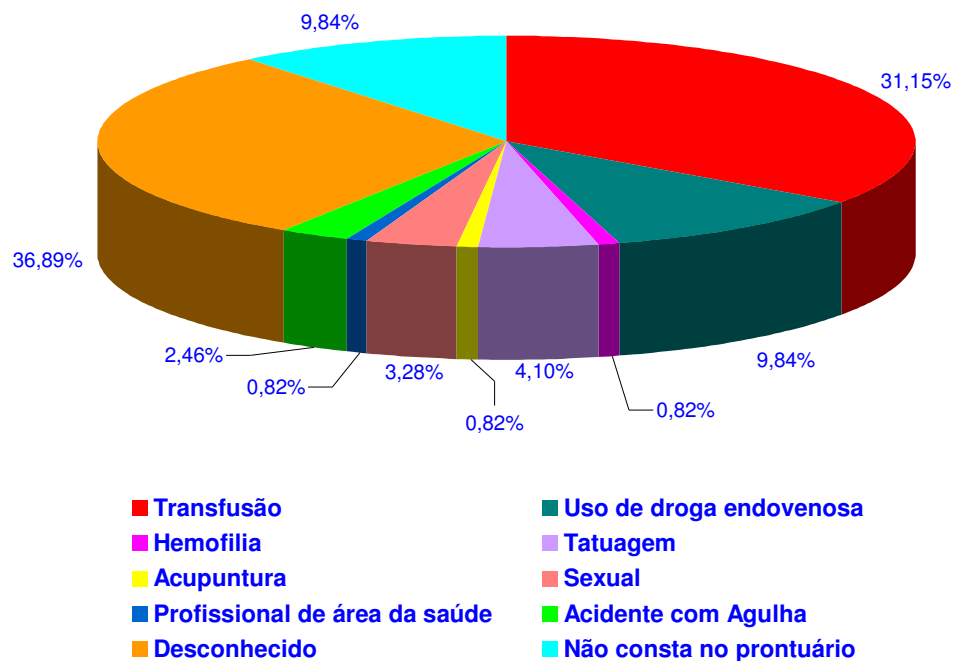
**Gráfico 7 - Distribuição dos pacientes estudados segundo forma presumida de aquisição do VHC**



**Tabela 11 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo forma presumida de aquisição**

<b>Modo de aquisição/Antecedente</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Transfusão	38	31,15
Uso de droga endovenosa	12	9,84
Hemofilia	1	0,82
Tatuagem	5	4,10
Acupuntura	1	0,82
Sexual	4	3,28
Profissional de área da saúde	1	0,82
Acidente com agulha	3	2,46
Desconhecido	45	36,89
Não consta no prontuário	12	9,84
<b>Total</b>	<b>122</b>	<b>100</b>

**Gráfico 8 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 1, segundo forma presumida de aquisição**

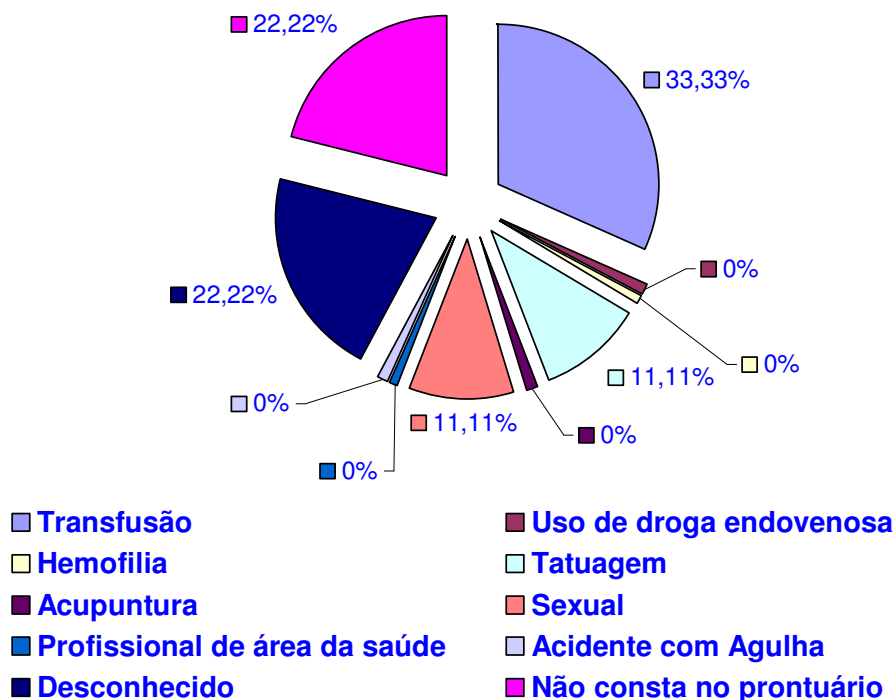




**Tabela 12 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo forma presumida de aquisição**

<b>Modo de aquisição/Antecedente</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Transfusão	3	33,33
Uso de droga endovenosa	0	0,00
Hemofilia	0	0,00
Tatuagem	1	11,11
Acupuntura	0	0,00
Sexual	1	11,11
Profissional de área da saúde	0	0,00
Acidente com agulha	0	0,00
Desconhecido	2	22,22
Não consta do prontuário	2	22,22
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>100</b>

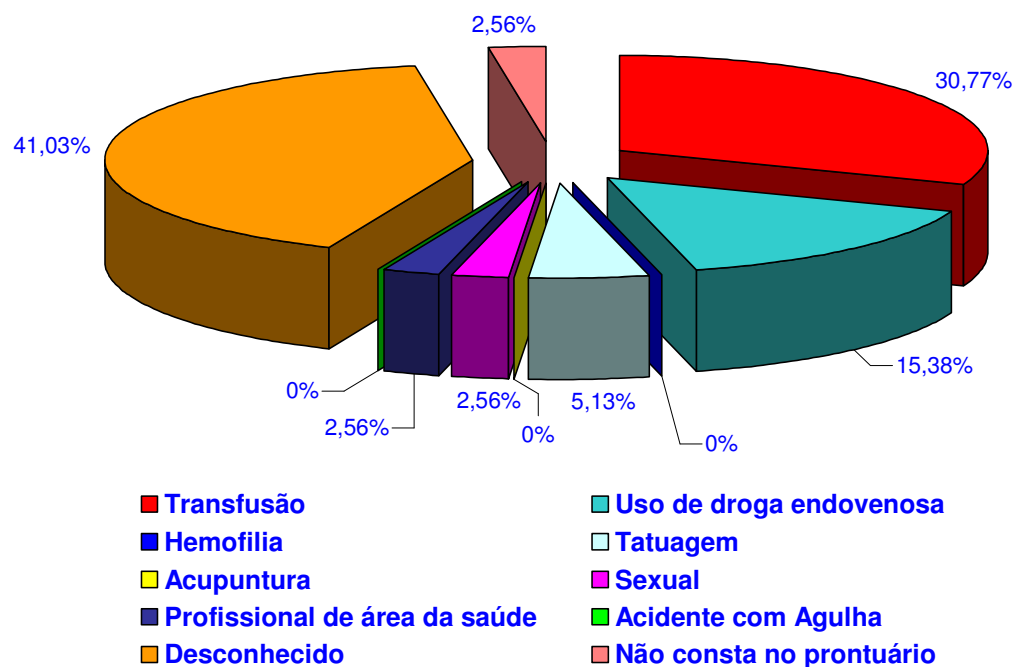
**Gráfico 9 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 2, segundo forma presumida de aquisição**



**Tabela 13 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo forma presumida de aquisição**

<b>Modo de aquisição/Antecedente</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Transfusão	12	30,77
Uso de droga endovenosa	6	15,38
Hemofilia	0	0,00
Tatuagem	2	5,13
Acupuntura	0	0,00
Sexual	1	2,56
Profissional de área da saúde	1	2,56
Acidente com agulha	0	0,00
Desconhecido	16	41,03
Não consta do prontuário	1	2,56
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>100</b>

**Gráfico 10 - Distribuição dos pacientes com infecção pelo VHC sorotipo 3, segundo forma presumida de aquisição**



Notamos que os fatores idade e história de transfusão de sangue, entre os sorotipos 1, 2 e 3, não foram fatores de risco significantes em nosso estudo. Em relação aos outros fatores observados, não foi possível testar a distribuição dos fatores selecionados, segundo o sorotipo diagnosticado, pois as freqüências esperadas foram menores que 1. (Tabela 14)

**Tabela 14 - Distribuição de fatores selecionados, segundo sorotipo diagnosticado**

Fator	Sorotipo				
	1	2	3		
Idade (média)	40,62	47,57	41,14	F=1,64	p= 0,2
História de transfusão (%)	31,9	28,6	32,4	$\chi^2= 0,04$	p= 0,98
Ignorado (%)	45,7	42,9	40,5	$\chi^2= 0,31$	p= 0,86

Para 53 (24,2%) pacientes (não incluídos na Tabela 4) não foi possível determinar o sorotipo do VHC; em 42 (19,2%), provavelmente devido aos baixos níveis de anticorpos presentes na amostra, que não atingiram a sensibilidade do teste. Outros 9 (4,1%) apresentaram resultados para dois ou mais tipos virais, porém não houve reprodutibilidade destes valores nas repetições para confirmação. (Tabela 15). Finalmente, para 2 pacientes (0,9%) foram detectadas a infecções pelo tipo 6, mas também estes resultados não apresentaram reprodutibilidade, mesmo nas repetições com amostras de diferentes momentos do curso da infecção, de um mesmo paciente.

**Tabela 15 - Diagnósticos de sorotipos múltiplos não confirmados e não reproduzidos**

<b>Paciente</b>	<b>Sorotipos</b>
1	1,4,6
2	1,2 e 1,5 e 1,6
3	1,6
4	1,4
5	1,2 e 1,2,3
6	1,2 e 3
7	1,5,6
8	3,6
9	2,3

Foram seqüenciadas sete amostras e a comparação dos resultados das sorotipagens e dos seqüenciamentos estão dispostos na Tabela 16.

**Tabela 16 - Resultados dos sorotipos e respectivos seqüenciamentos**

<b>Sorotipo</b>	<b>Seqüenciamento</b>
1	1b
1,3	1b
2*	1b
2 e 2,5	2b
3	3a
3 e 6	3a
6	1b

\* sorotipagem repetida 3 vezes

Durante o andamento dos testes, o tipo 6 apresentou reatividade nas sorotipagens por 15 vezes, porém nenhuma amostra foi confirmada apesar de terem sido exaustivamente repetidas. Duas amostras, com positividade única para o tipo 6, uma foi seqüenciada e revelou o genótipo 1b, a outra não tivemos a oportunidade de seqüenciar e esta permaneceu sem

diagnóstico confirmatório. Entre as 13 restantes, todas com resultados associados a outros tipos virais, 5 foram definidas como sorotipo 1 (4 eram a princípio tipos 1 e 6 e uma tipos 1,4,5,6), uma definida como sorotipo 3 (antes 3,6) e uma seqüenciada apresentando o genótipo 3a, sendo esta sorotipada anteriormente com resultados diferentes, em uma primeira reação tipo 3 e na segunda repetição tipo 6.

Duas amostras apresentaram resultados diferentes a cada reação, uma repetida três vezes revelou os resultados 1,6; 1,2 e 1,5, a outra 1,3 e 1,2,3,6. As 4 restantes, apresentaram diagnóstico associado com o tipo 6 em um único teste (1,6; 1,4,6; 1,5,6 e 3,6) sendo que nas tentativas outras de repetição, não atingiram os níveis de sensibilidade do teste de sorotipagem e ficaram sem definição.

O sorotipo 5 apresentou resultados positivos para 8 amostras e em apenas um caso houve confirmação do resultado, associado aos tipos 1 e 2. Outras 4 amostras, a princípio com diagnóstico de dupla infecção (sorotipos 1,5), após repetição dos testes, foram definidas como tipo 1. Uma amostra com resultado de infecção dupla, 2,5, foi seqüenciada e apenas o genótipo 2 confirmado. E finalmente, 2 amostras permaneceram sem definição.

O sorotipo 4 mostrou-se positivo por 6 vezes. Resultados de infecção associada, (1,4), foram reprodutivos em 2 amostras, para outras duas, apenas o sorotipo 1 se confirmou. Os dois últimos casos permaneceram sem definição.

Infecção mista, por dois ou mais tipos do VHC, foram observadas em 33 (15,1%) do total de 219 amostras testadas, sendo que apenas 6 (2,7%)

destas foram confirmadas (Tabela 4), para 18 (8,2%) apenas 1 tipo confirmou-se após repetição da sorotipagem (15 amostras tipo 1, uma amostra tipo 2 e duas tipo 3). Outros 9 (4,1%) pacientes permaneceram sem diagnóstico (Tabela 15), pois estes resultados não apresentaram reprodutibilidade e não puderam ser considerados.

## DISCUSSÃO

O mapeamento dos epítomos da proteína NS4 do genoma do VHC revelou duas importantes regiões antigênicas (aminoácidos residuais 1691 a 1708 e 1710 a 1728) que mostraram ser altamente variáveis entre os genótipos 1,2,3,4,5,6 e cujos anticorpos tipo-específicos puderam ser detectados. Peptídeos tipo-específicos foram sintetizados correspondentes a estas duas regiões e estes foram posteriormente empregados na técnica de ELISA indireto onde uma linha completa de peptídeos para os seis tipos do VHC foi projetada e incluída no ensaio (um total de 21 peptídeos). (PRESCOTT & SIMMONDS, 1998)

A utilização desta metodologia pode ampliar o uso do diagnóstico dos tipos do VHC, independentemente da necessidade de um laboratório especializado em biologia molecular. Desta forma, diminuindo custos com pessoal e equipamentos necessários para manutenção destas técnicas. Ressaltando que em um laboratório de rotina onde o método de ELISA esteja incorporado, seria perfeitamente possível a execução da sorotipagem do VHC. Por outro lado, pode-se ampliar o uso dessa ferramenta, o diagnóstico dos diversos tipos do VHC, na prática médica auxiliando o clínico no prognóstico da doença para os pacientes portadores do VHC. (SIMMONDS e col., 1993; BHATTACHERJEE e col., 1995; FORNS e col., 1996; MONTESANO e col., 1996; WEBBER e col., 1996)

O método de sorotipagem pode facilitar estudos baseados em um grande número de amostras e auxiliar na identificação particularizada da distribuição geográfica dos tipos do VHC e suas prováveis rotas de transmissão. (SIMMONDS e col., 1996; WEBBER e col., 1996; ALONSO e col., 1998)

Foram incluídos nesta pesquisa 219 pacientes e o diagnóstico sorológico foi possível para 166, revelando uma sensibilidade de 75,8%.

A sensibilidade projetada em nosso experimento talvez tenha sido prejudicada pelo fato de todo o percurso da reação não ser automatizado, aumentando o tempo total da reação e talvez comprometendo a qualidade das lavagens. A competência imunológica dos pacientes envolvidos também deve ser considerada, pois entre os eleitos não foram excluídos os que estavam em tratamento com interferon-alfa ou qualquer outro tipo de medicação ou mesmo os que apresentavam outras patologias associadas.

A literatura mostra dados comparativos das técnicas de genotipagem e sorotipagem e sugerem que a sensibilidade dos métodos de sorotipagem são significativamente menores que as técnicas de biologia molecular. Também a sensibilidade do ensaio de sorotipagem pode estar limitada pela imunocompetência do hospedeiro. Bhattacharjee e col., após avaliarem 210 amostras mostraram que a sensibilidade deste teste variou de 100% (tipo 2) a 66,7% (tipo 6) e com valores de concordância de 97,3%. A freqüência de detecção dos anticorpos tipo-específicos para os tipos do VHC foi de 87%, apresentando diferença entre os vários genótipos. Altos índices de sensibilidade (92-100%) foram notados para os genótipos 1a, 2a, 2b e 3a, e



baixos para os genótipos 1b e 4 (83% e 81% respectivamente). Para os genótipos 5 e 6, as observações foram baseadas em um número pequeno de amostras e necessitam de maiores investigações. (BHATTACHERJEE e col., 1995; DOORN e col., 1996; MONTESANO e col., 1996; ; WEBBER e col., 1996; PAWLOTSKY e col., 1997)

Prescott e cols. divulgaram que a sensibilidade do ELISA para sorotipagem do VHC pode apresentar-se baixa para os genótipos 1b e 6a, se os peptídeos usados não representarem a variabilidade antigênica completa destes genótipos. A concordância pode ser menor em pacientes hemofílicos, que registram múltiplas exposições ao VHC. Leruez-Ville e col. observaram que em pacientes portadores do VHC com co-infecção pelo HIV, a sensibilidade do SAI-6 foi significativamente menor que em pacientes HIV-negativos. (PRESCOTT e col., 1996; LERUEZ-VILLE e col., 1998; PRESCOTT & SIMMONDS, 1998)

A Tabela 17 mostra a sensibilidade encontrada por outros autores com a utilização da metodologia do ELISA (Murex HCV Serotyping Assay) para sorotipagem do VHC.

**Tabela 17 - Sensibilidade do teste de ELISA (Murex HCV Serotyping Assay) para sorotipagem do VHC**

<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Autor</b>	<b>Referência</b>
78	Alonso, P. e cols.	(ALONSO e col., 1998)
*92	Basaras, M. e cols.	(BASARAS e col., 1997)
96,2%	Bell, H. e cols.	(BELL e col., 1996)
*51	Cerino, A. e cols.	(CERINO e col., 1996)
87	Chermello, L. e cols.	(CHERMELLO e col., 1994)
82	Cretel, E. e cols.	(CRETEL e col., 1997)
83	Doorn, L.-J.van e cols.	(DOORN e col., 1996)
*85	Forns, X. e cols.	(FORNS e col., 1996)
*100	Guido, M. e cols.	(GUIDO e col., 1996)
70,6	Leruez-Ville, M. e cols.	(LERUEZ-VILLE e col., 1998)
67,7	Montesano, L. e cols.	(MONTESANO e col., 1996)
89	Pawlotsky, J.-M. e cols.	(PAWLOTSKY e col., 1997)
*85	Pawlotsky, J.-M. e cols.	(PAWLOTSKY e col., 1995)
75	Prescott, L.E. e cols.	(PRESCOTT e col., 1996)
* 80	Preston, F.E.	(PRESTON e col., 1995)
*96	Sacco, R. e cols.	(SACCO e col., 1997)
89	Simmonds, P e cols.	(SIMMONDS e col., 1993)
*90	Simmonds, P. e cols.	(SIMMONDS e col., 1996)
58	Songsivilai, S. e cols.	(SONGSIVILAI e col., 1998)
35	Webber, L.M. e cols.	(WEBBER e col., 1996)

\* SAI-3 - Teste de sorotipagem para os tipos 1,2,3

Os resultados obtidos revelaram a predominância do tipo 1 (70%) em nosso meio, seguido pelo tipo 3 (22,3%) e tipo 2 (4,2%). Estes resultados são compatíveis com a literatura investigada. Ressalte-se que todos os trabalhos, mencionando amostras brasileiras, fizeram uso das técnicas de genotipagem, portanto essa nova metodologia de diagnóstico dos tipos VHC,

encontra compatibilidade nos seus resultados.

A predominância dos tipos 1, 3 e 2 no Brasil, foi mencionada por outros autores, que trabalharam com técnicas de biologia molecular, ou seja, genotipagem. Holland e cols. genotiparam 53 amostras brasileiras utilizando primers tipo-específicos da região do core do VHC e seus resultados confirmam a prevalência do tipo 1. Campiotto e cols. avaliaram 705 amostras, genotipadas a partir da região 5'NC do VHC, Krug e col., analisaram 100 amostras pela técnica RFLP, Bassit e cols. genotiparam 130 soros de pacientes, pela técnica LIPA-Line Probe Assay e Bukh e cols. mencionam 128 amostras brasileiras genotipadas. Todos estes autores concluíram a prevalência dos genótipos 1, 3 e 2 do VHC no Brasil. (DUSHEIKO e col., 1994; BUKH e col., 1995; HOLLAND e col., 1996; KRUG e col., 1996; PEIG GINABREDA e col., 1997; CAMPIOTTO e col., 1998; BASSIT e col., 1999; BASSIT, e col., 1999a)

A exceção na ordem de distribuição dos genótipos no Brasil foi observada na região Sul, mais especificamente no estado do Rio Grande do Sul, onde o genótipo 3 supera a predominância do genótipo 1. (CHEINQUER e col., 1997)

Os parâmetros epidemiológicos analisados foram idade, sexo e modos de transmissão do VHC.

Dos 166 pacientes com diagnóstico sorológico para o VHC, 106 (63,9%) eram do sexo masculino e 60 (36,1%) feminino. A idade variou de 12 a 73 anos (média de 41,1) e quanto aos modos de transmissão, a transfusão de sangue foi a mais freqüente forma de aquisição da hepatite C,

somando 31,3% dos casos. (Tabela 10)

Para estes parâmetros epidemiológicos avaliados, não foram verificados, no estudo, diferenças significativas entre os tipos 1, 2 e 3 do VHC estudados.

Nos Estados Unidos, MAHANEY e col., e WATSON e cols., mencionaram que não foram notadas diferenças significativas entre os genótipos do VHC e a distribuição da idade e sexo dos pacientes avaliados em seus estudos. (WATSON e cols., 1996; MAHANEY e col., 1999)

LAU e col., 1996, determinaram o genótipo de 438 pacientes americanos, portadores crônicos do VHC de 10 diferentes centros de referências e concluíram que não houve diferença quanto ao sexo na distribuição entre os diferentes tipos do VHC, também não houve diferença quanto a idade entre os pacientes infectados pelos tipos 1, 2 e 4. Porém, os infectados com o tipo 3, eram mais jovens quando comparados com os pacientes infectados pelos tipos 1 e 2. Neste trabalho, metade dos pacientes infectados pelo tipo 1, haviam adquirido a infecção por transfusão de sangue ou derivados.

Para SIMMONDS, e col., 1996, que avaliaram 610 pacientes infectados pelo VHC, existem diferenças quanto a idade e a distribuição dos tipos do VHC e para ambos, pacientes do sexo masculino e feminino, a infecção pelo tipo 3 foi mais comum no grupo mais jovem que 45 anos e a infecção pelo tipo 2 aumentou com a idade dos pacientes. Desta forma, a distribuição dos tipos do VHC pode, pelo menos em parte, apresentar diferenças, quando comparado os fatores de risco e a idade dos pacientes.

STUYVER e col., não observaram diferença entre as prováveis formas de aquisição do VHC e os tipos virais. Neste trabalho foram avaliados 49 doadores de sangue. Também, JOHNSON e col. e MAHANEY e col. não observaram diferenças na distribuição do sexo, idade e modo de aquisição do VHC entre os pacientes infectados pelos diferentes tipos de vírus. Porém, BERG e col., revelaram que ambos, idade e modo de aquisição, mas não sexo, foram variáveis significantes. Associaram o genótipo 3a e 1a aos pacientes que relataram uso de drogas endovenosas e o genótipo 1 a pacientes com hepatites pós-transfusionais e de origem desconhecida. O genótipo 1 apresentou uma freqüência maior entre os pacientes acima de 45 anos. Outra observação interessante foi que o genótipo 1b esteve mais freqüente (92%) em pacientes acima de 45 anos em comparação com o genótipo 1a (8%). Porém, entre os pacientes com idade abaixo de 45 anos estas freqüências permaneceram praticamente iguais 46% para o genótipo 1a e 54% para o genótipo 1b. (MAHANEY e col., 1994; JOHNSON e col., 1996; STUYVER e col., 1996; BERG, e col., 1997)

Para 53 (24,2%) dos pacientes avaliados não foi possível determinar o sorotipo do VHC. Em 42 (19,2%), provavelmente devido aos baixos níveis de anticorpos presentes na amostra, que conseqüentemente não atingiram a sensibilidade do teste; 9 (4,1%) com reatividade para 2 ou mais tipos do VHC (Tabela 15), porém sem reprodutibilidade e duas (0,9%) com positividade para o tipo 6 apenas uma vez, sem confirmação.

As 42 amostras que permaneceram sem esclarecimento do sorotipo do VHC, apresentaram leituras de DO muito baixas, na maioria das vezes, ou

extremamente altas, com menor frequência, para todos os tipos VHC testados, não mostrando diferenças acentuadas de leitura entre os diversos tipos, incluindo os controles positivo e negativo (linhas G e H). A pequena diferença entre os controles não cumpre os quesitos obrigatórios de validade do teste (ver em resultados). Portanto pode-se supor que o volume de anticorpos anti-NS4 ou tipo-específicos para o VHC, naquele momento da infecção pudessem estar muito baixos, prejudicando a performance deste teste sorológico ou em algumas situações com oferta de anticorpos tão farta que as reações cruzadas ou inespecíficas tiveram condições de se manifestarem. Para os testes onde as leituras DO apresentaram-se baixas, o experimento foi repetido com soros na diluição 1:10, porém este artifício esclareceu apenas uma pequena parte das amostras.

WEBBER e cols., 1996, trabalharam com 76 amostras Sul Africanas e mencionaram que a alta porcentagem de amostras não tipáveis pelo SAI-6 poderiam ser explicadas pelos baixos níveis de anticorpos presentes nas amostras ou devido a estocagem por longos períodos a -20°C ou ainda pela influência do tipo viral sobre a reação sorológica. O aprimoramento nas pesquisas de genotipagem também tem evidenciado novas variantes dos tipos do VHC, o que poderia interferir na resolução de algumas amostras e conseqüentemente exige um aprimoramento constante dos testes de sorotipagem.

Van Doorn e cols., trabalharam com 106 amostras e descrevem que a presença ou não de anticorpos anti a fração NS4 do genoma do VHC, não é indicativo para a sensibilidade do ensaio de sorotipagem e mencionam que a

imunocompetência do hospedeiro infectado também pode limitar a sensibilidade do ensaio. Cretel e cols., acreditam que os testes de sorotipagem do VHC apresentam melhores resultados se a população estudada não compor pacientes imunossuprimidos ou que apresentem repetidas exposições ao VHC. (VAN DOORN e cols., 1996; CRETEL e cols., 1997)

Leon e cols., mencionam que a incorporação de peptídeos da região do Core do VHC não parece melhorar a sensibilidade global frente aos métodos de sorotipagem que apresentam apenas peptídeos da região NS4. (LEÓN e cols., 1997)

SIMMONDS e cols., sorotiparam 137 amostras, pelo SAI-3, e 15 amostras não puderam ser sorotipadas, indicando que estas amostras continham uma quantidade insuficiente de anticorpos tipo-específicos. (SIMMONDS e cols., 1993; ALONSO e col., 1998)

Em nosso trabalho, 9 (4,1%) pacientes que apresentaram resultados para dois ou mais tipos do VHC (Tabela 15), não foram incluídos no cômputo geral, devido a não reprodutibilidade para confirmação.

Do total de 219 amostras testadas, 33 (15,1%) apresentaram pelo menos uma vez resultado para infecção mista e apenas 6 (2,7%) destas foram confirmadas (Tabela 4). Dezoito (8,2 %) apresentaram resultados para um só tipo do VHC após repetições dos testes de sorotipagem (15 amostras tipo 1, uma amostra tipo 2 e duas tipo 3).

As reações onde mais de um tipo viral, para cada amostra testada, foram revelados, apresentaram freqüentemente leituras de D.O.

extremamente baixas ou extremamente altas para todos os tipos do VHC testados. Apesar de cumprirem os quesitos de validade dos resultados (ver em resultados), estas reações necessariamente foram repetidas. Quando havia disponibilidade amostras de diferentes períodos da infecção, do mesmo paciente, eram testadas com a intenção de caracterizar a manutenção destes resultados em diferentes períodos da infecção pelo VHC.

A hipótese de reações cruzadas foi fortemente considerada, pois nos testes com resultados para mais de um tipo do VHC, os extremos de leituras de DO, muito altas ou muito baixas, foi um fato constante e a maioria das amostras foram esclarecidas para apenas um tipo viral quando repetidos os experimentos.

Leruez-Ville e cols., mencionaram um índice inicial de infecção mista de 7%, em 214 amostras e apenas 0,9% foram confirmadas. Alonso e cols., na Espanha, detectaram 8,3% de infecção por dois ou mais tipos do VHC em 84 pacientes estudados pela técnica de sorotipagem e observaram resultados semelhantes entre pacientes com história de uso de drogas endovenosas e os de epidemiologia desconhecida. Songsivilai e cols., avaliaram 133 pacientes sul asiáticos, onde o tipos 3 e 6 são mais freqüentes do que o tipo 1, e 21,4% de infecção mista foi descrito. Pawlotsky e cols., mencionaram que reações cruzadas entre os tipos 1 e 3, diagnosticadas pelo teste de sorotipagem, poderiam ser interpretadas como reações cruzadas ou infecções mistas realmente, apesar de muitas vezes não serem reconhecidas pelos testes de biologia molecular. Van Doorn e



cols., avaliaram 106 amostras de pacientes portadores do VHC e isolaram 7 (6,6%) infecções mistas, mas apenas 2 foram confirmados pelos teste de biologia molecular.

Estes resultados poderiam ter uma explicação devido à detecção sorológica de infecções passadas por diferentes tipos do VHC. A genotipagem detecta apenas o genoma presente e a natureza indireta do teste de sorotipagem poderia estar detectando anticorpos relacionados com infecções passadas. Porém a presença de reações cruzadas não deve ser descartada e provavelmente explicaria a maioria dos diagnósticos que sugerem a infecção por mais de um tipo do VHC. Estes resultados devem ser cuidadosamente interpretados, principalmente quando as leituras de D.O. apresentarem valores nos poços controle  $>2,5$  ou os poços totalmente bloqueados, controles negativos (linha G), persistirem  $>4,0$ . Isto poderia representar um excesso de anticorpos presentes na amostra e conseqüentemente resultados positivos para mais de um tipo do VHC. Desta forma, estas reações devem ser repetidas com os soros mais diluídos. (VAN DOORN e cols., 1996; PAWLOTSKY e cols.,1997; ALONSO e cols., 1998; LERUEZ-VILLE e cols., 1998; SONGSIVILAI e cols., 1998)

Dos resultados que acusaram a infecção pelo sorotipo 6, nenhum se confirmou. Estas amostras foram insistentemente repetidas, quando possível com soros de diferentes datas de coleta do mesmo paciente, procurando a confirmação dos dados. As duas amostras que tivemos a oportunidade de seqüenciar (Tabela 16), também não confirmaram o genótipo 6.

Os testes onde a presença de reatividade para o tipo 6 estavam presentes, apresentaram leituras de DO que tocavam os extremos, muito altas ou muito baixas, para todos os tipos do VHC. Onde as leituras D.O., apesar de baixas revelaram o tipo 6 uma vez, nas reações de repetição seguintes, os valores de D.O. não atingiram valores compatíveis com a sensibilidade do teste, dando a amostra como não tipável.

Estas evidências provavelmente indicam a ausência deste tipo viral na população estudada e a hipótese de reações cruzadas ou inespecíficas deve ser considerada.

O tipo 6a mostra-se como um dos tipos do VHC mais confinados a uma determinada região geográfica, podendo ser encontrado apenas na região de Hong Kong, Macau e Vietnã, ou em migrantes destas localidades. Simmonds e cols., Adams e cols. e Mizokami e cols. descreveram os tipos 7, 8, 9 e 11 do VHC, encontrados na Tailândia, Vietnã e Indonésia, como variantes do tipo 6a e mencionaram que estes genótipos devem ser apropriadamente classificados como subtipos do tipo 6. (SIMMONDS e col., 1993a; SIMMONDS e col., 1996a; MIZOKAMI e col., 1996; PRESCOTT e col., 1996; ADAMS e col., 1997)

Songsivilai e cols., avaliaram o teste de sorotipagem SAI-6 utilizando 133 amostras de soro provenientes da Tailândia, país onde os genótipos 3a, 6 e 1b são prevalentes e notaram que muitas das amostras de genótipo 6 foram não tipáveis pelo método de SAI-6. A baixa performance, neste caso, foi relacionada com o desenvolvimento do teste de sorotipagem que esta baseado no genótipo 6 encontrado em Hong Kong, que apresenta-se

diferente das variantes deste genótipo encontradas no Sudoeste Asiático. (SONGSIVILAI e cols., 1998)

Prescott e col., avaliaram 212 amostras de soro provenientes de Hong Kong e o teste de sorotipagem apresentou uma alta concordância com o teste de genotipagem (98%), porém uma reduzida sensibilidade (75%). Esta baixa sensibilidade pode ser explicada, pois os índices de detecção para os sorotipos 1b e 6 são menores do que para os outros sorotipos (83% para o tipo 1b, comparados com 96% para o tipo 1a e 67% para o tipo 6). Outra possibilidade seria que certas variantes destes genótipos apresentam alterações em suas seqüências que poderiam resultar em reações cruzadas com outros genótipos. (PRESCOTT e col., 1996)

Webber e cols., avaliaram amostras sul africanas e mencionaram a ocorrência de 2 amostras sorotipo 6, porém estes resultados provavelmente sejam fruto de reações cruzadas com peptídeos do sorotipo 1 e requerem confirmação pelos métodos de biologia molecular antes de se poder afirmar a presença do tipo 6 do VHC na África do Sul. Alonso e cols., sorotiparam amostras espanholas e as que acusaram a infecção pelo tipo 6 apresentaram valores de D.O. baixos, o que levou também a considerar a hipótese de falta de especificidade da prova de sorotipagem frente ao tipo 6 do VHC. (WEBBER e cols., 1996; ALONSO e cols., 1998)

O sorotipo 5 foi confirmado, após repetições das reações, para apenas uma paciente (0,6%), compondo uma infecção mista. O tipo 4, presente em 2 (1,2%) pacientes, em associação com o sorotipo 1 em ambos os casos. (Tabela 4)

Os testes que evidenciaram o tipo 5 (em conjunto com os tipos 1 e 2), duas amostras de diferentes datas de coleta, registraram leituras de D.O. altas para todos os tipos do VHC. Assim como os testes que apresentaram os sorotipos 4. Porém os critérios de validade dos resultados foram cumpridos nestes experimentos.

Estas amostras mostraram um excesso de anticorpos presentes nas reações, mesmo nos testes com soros de diferentes datas de coleta, do mesmo paciente. A possibilidade de reações cruzadas poderia ser considerada. Também, uma investigação mais detalhada sobre a procedência e formas de aquisição do VHC destes pacientes devem ser pesquisados.

CAMPIOTTO e col., 1998, genotiparam 705 brasileiras e os tipos 4 e 5 somaram 0,9%. Todas, tipos 4 e 5, foram localizadas no estado de São Paulo.

O tipo 4 do VHC é predominante nos países do centro e norte Africanos (Yemen, Kuwait, Iraque, Arábia Saudita, Zaire, Burundi, Gabão, Gâmbia e Egito) e o tipo 5 na África do Sul (Joanesburgo e Durban) e meridional, porém estes genótipos também são encontrados esporadicamente fora do continente Africano. Bhattacharjee e cols. descrevem 81% de frequência de detecção dos anticorpos tipo-específicos para o sorotipo 4, no teste SAI-6. (BHATTACHERJEE e col., 1995; BUKH e col., 1995; SIMMONDS, 1995; ADAMS e col., 1997)

Tivemos a oportunidade de seqüenciar 7 amostras (Tabela 16). Estas foram selecionadas com a intenção de confirmar pelo menos um resultado

dos sorotipos 1, 2 e 3, esclarecer algumas das infecções mistas e investigar uma amostra sorotipo 6. Portanto, a alta porcentagem de resultados não concordantes, era esperada. No teste de sorotipagem de resultado tipo 2, discrepante com o seqüenciamento que acusou o tipo 1b, as leituras de D.O. nas três reações, repetidas de sorotipagem, apresentaram-se muito baixas, apesar de cumprirem os requisitos preconizados pelo teste SAI-6. Talvez estas leituras e a hipótese que estas amostras continham um volume baixo de anticorpos tipo-específicos sejam um indicativo de uma reação inespecífica ou cruzada.

A sorotipagem está baseada em epítomos da região NS-4 e o seqüenciamento na região 5'NC do genoma do VHC. A hipótese de discordância em função de diferentes regiões do genoma do VHC exploradas também deve ser cogitada.

Pawlotsky e cols., avaliaram a concordância entre os testes de genotipagem Inno-LIPA VHC e sorotipagem SAI-6 e apresentaram resultados de 91% para o tipo 1, 100% para os tipos 2 e 3 e 67% para os tipos 4 e 5. A Tabela 18 apresenta os valores de concordância entre o teste de sorotipagem SAI-6 e diferentes testes de genotipagem. Bhattacharjee e cols., citaram que os valores de concordância, entre sorotipagem (SAI-6) e genotipagem, podem variar entre 72,6% e 97,3%. (BHATTACHERJEE e cols., 1995; PAWLOTSKY e cols., 1997)

Giannini, e cols., fizeram uma análise comparativa entre dois ensaios de genotipagem, Inno-LIPA que utiliza a região 5'NC e Okamoto que está baseado em primers tipo-específicos da região do Core. Dos 174 pacientes,

franceses e italianos, 145 foram concordantes. Ou seja, 29 (16,6%) apresentaram resultados discordantes. O genótipo 2a/III foi o que mais apresentou discrepância entre as duas técnicas avaliadas. (GIANNINI, e cols., 1995)

**Tabela 18 - Concordância entre o teste de sorotipagem SAI-6 e diferentes testes de genotipagem**

<b>Concordância %</b>	<b>Técnica de Genotipagem</b>	<b>Referência</b>
97,6	Seqüenciamento	(LERUEZ-VILLE e col., 1998)
100	Inno-LIPA HCV	(ALONSO e col., 1998)
96	Inno-LIPA HCV	(SONGSIVILAI e col., 1998)
72,6	Inno-LIPA HCV	(DOORN e col., 1996)
66,7	Inno-LIPA HCV	(MONTESANO e col., 1996)
86	Inno-LIPA HCV	(CRETEL e col., 1997)
98	RFLP	(PRESCOTT e col., 1996)

## CONCLUSÃO

A predominância do tipo 1 (70%), seguidos pelo tipo 3 (22,3%) e tipo 2 (4,2%), é compatível com outros trabalhos que envolvem amostras brasileiras e particularmente do estado de São Paulo. Os tipos 4 e 5 foram diagnosticados em 3 (1,8%) pacientes avaliados e sugerem confirmação por outras técnicas de genotipagem ou seqüenciamento. O tipo 6 não foi confirmado em nenhuma amostra e provavelmente não estava presente na coleção de pacientes avaliados.

Não se observou diferenças significativas entre os parâmetros epidemiológicos avaliados, idade sexo e modos de transmissão entre os pacientes portadores do VHC sorotipos 1, 2 e 3. A transfusão de sangue foi a mais freqüente forma de aquisição da hepatite C mencionada entre todos os tipos do VHC estudados.

O teste de sorotipagem (Murex HCV Serotyping 1-6 Assay) identificou o tipo VHC em 75,8% dos pacientes. As amostras onde a leitura visual e os valores de D.O. mostraram-se nítidos, ou seja, controles positivo (linha H) e negativo (linha G) distintos, positividade apenas em um poço (ou mais, caso infecção mista) e apresentando definição clara do sorotipo do VHC. Para os resultados que seguiram este padrão, os diagnósticos observados provavelmente estão corretos.

As amostras onde a leitura visual não foi distinta e os valores de D.O.

muito próximos, todos os poços (amostra e controles positivo e negativo) com forte intensidade de cor e altos valores de D.O. ou todos com fraca intensidade de cor e baixos valores de D.O., para estes testes, os resultados da sorotipagem devem ser repetidos e preferencialmente avaliados por técnicas de genotipagem ou por seqüenciamento.

As situações, mencionadas no parágrafo acima, podem estar refletindo reações inespecíficas ou cruzadas. Desta forma, o aperfeiçoamento dos testes de sorotipagem, na tentativa de se ampliar a quantidade e especificidade dos peptídeos sintéticos tipo-específicos para o VHC, além de se explorar diferentes regiões do genoma, devem ser constantes. O teste de sorotipagem, “Chiron RIBA HCV serotyping assay diagram”, seria uma nova alternativa onde são explorados peptídeos da região NS-4 e também do Core (C) do genoma do VHC. (DIXIT e col., 1995)

A praticidade oferecida pelos testes de sorotipagem na identificação dos tipos do VHC, apesar de não identificarem os subtipos, pode ser útil na prática clínica e auxiliar no prognóstico da doença, também estudos epidemiológicos de regiões ou países podem ser favorecidos, independentemente da tecnologia exigida pelos testes de genotipagem.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, N.J.; CHAMBERLAIN, R.W.; TAYLOR, L.A.; DAVIDSON, F.; LIN, C.K.; ELLIOTT, R.M.; SIMMONDS, P. Complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 6a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.234, p.393-6, 1997.

ALONSO, P.; ORDUÑA, A.; MIGUEL, A.S.; GUTIÉRREZ, M.P.; LORENZO, B.; EIROS, J.M.; BRATOS, M.A.; CUERVO, M.; TORRES, R. Variantes del virus de la hepatitis C en diferentes grupos de riesgo. Estudio comparativo de un método de genotipificación y otro de serotipificación. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v.16, p.111-7, 1998.

ALTER, H.J.; SEEFF, L.B. Transfusion-associated hepatitis. In: ZUCKERMAN A.J.; THOMAS H.C., ed. *Viral Hepatitis scientific basis and clinical management*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1993. cap.29, p.467-99.

ALTER, M.J.; MAST, E.E.; MOYER, L.A.; MARGOLIS, H.S. Hepatitis C. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v.12, p.13-26, 1998.

ANDONOV, A.; CHAUDHARY, R.K. Genotyping of canadian hepatitis C

virus isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.*,v.32, p.2031-34, 1994.

BASARAS, M.; LOMBERA, N.; HERAS, B.; LÓPES, C.; ARRESE, E.; CISTERNA, R. Distribution of HCV genotypes in patients infected by different sources. *Res. Virol.*, v.148, p.367-73, 1997.

BASSIT, L.; DA SILVA, L.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; MAERTENS, G.; CARRILHO, F.J.; FONSECA, L.E.P.; ALVES, V.A.F.; GAYOTTO, L.C.C.; PEREIRA, A.N.; TAKEI, K.; CHAMONE, D.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A. Chronic hepatitis C virus infections in brazilians patients with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.41, p.183-9, 1999.

BASSIT, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; DA SILVA, L.C.; TAKEI, K.; VILLAÇA, P.; DAVID-NETO, E.; CHAMONE, D.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found, [Letter]. *Hepatology*, v.29, p.994-5, 1999a.

BELL, H.; HELLUM, K.; HARTHUG, S.; MAELAND, A.; RITLAND, S.; MYRVANG, B.; LIPPE, B.V.D.; RAKNERUD, N.; SKAUG, K.; PRESCOTT, L.; SIMMONDS, P.; CONSTRUCT GROUP. Prevalence of hepatitis C genotypes among patients with chronic hepatitis C in Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* v.28, p.357-9, 1996.

BERG, T.; HOPF, U.; STARK, K.; BAUMGARTEN, R.; LOBECK, H.; SCHREIER, E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C : correlation with clinical and virological parameters. *J. Hepatol.*, v.26, p.484-91, 1997.

BHATTACHERJEE, V.; PRESCOTT, L.E.; PIKE, I.; RODGERS, B.; BELL, H.; EL-ZAYADI, A.R.; KEW, M.C.; CONRADIE, J.; LIN, C.K.; MARSDEN, H.; SAEED, A.A.; PARKER, D.; YAP, P.-L.; SIMMONDS, P. Use of NS-4 peptides to identify antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J. Gen. Virol.*, v.76, p.1737-48, 1995.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: Quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* v.15, p.41-63, 1995.

BUKH, L.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Biology and genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Clin. Exp. Rheumatol.* v.13, p.S3-S7, 1995a.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; DA SILVA, L.C.; COELHO, H.S.M.; CARRILHO, F.J.; SUMITA, L.M.; GUZ, B.; SILVA A.O.; BERNADINI, A.P. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C nas diferentes regiões do Brasil. Dados preliminares. *GED Gastroenterol. Endosc. Dig.*, v.17, p.63, 1998.

CAVALHEIRO, N.P.; BARONE A.A. Analysis of the type of hepatitis C viruses isolated by serotypes 1-6 in São Paulo, Brazil. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON INFECTIOUS DISEASES, 8.*, Boston, 1998, Abstracts, p.103.

CERINO, A.; CIVIDINI, A.; ASTI, M.; LANZA, A.; SILINI, E.; MONDELLI, M.U. Comparative evaluation of two serologic typing methods for hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* v.34, p.714-6, 1996.

CHAMBERLAIN, R.W.; ADAMS, N.J.; TAYLOR, L.A.; SIMMONDS, P.; ELLIOTT, R.M. The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.236, p.44-9, 1997.

CHAN, S.-W.; MCOMISH, F.; HOLMES, E.C.; DOW, B.; PEUTHERER, J.F.; FOLLETT, E.; YAP, P. L.; SIMMONDS, P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J. Gen. Virol.*, v.73, p. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap 131-41, 1992.

CHAYAMA, K.; TSUBOTA, A.; ARASE, Y.; SAITOH, S.; KOIDA, I.; IKEDA, K.; MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, M.; IWASAKI, S.; KOYAMA, S.; MORINAGA, T.; KUMADA, H. Genotypic subtyping of hepatitis C virus.

*J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.8, p.150-6, 1993.

CHEINQUER, H.; FONSECA, A.S.K.; LUNGE, V.R.; IKUTA, N.;  
CHEINQUER, N.; KRUG, L.P. Alta prevalência do genótipo 3 do vírus C  
em Porto Alegre, RS. *GED Gastroenterol. Endosc. Dig.*, v.16, p.197,  
1997.

CHERMELLO, L.; ALBERTI, A.; ROSE, K.; SIMMONDS, P. Hepatitis C  
serotype and response to interferon therapy. *N. Engl. J. Med.* v.330,  
p.143, 1994.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by  
acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.  
Biochem.* v.612, p.156-9, 1987.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.;  
HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne  
non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v.244, p.359-62, 1989.

CHOO Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.;  
GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER,  
A.J.; BRADLEY, D.W.; KUO, G.; HOUGHTON, M. Genetic organization  
and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.88,  
p.2451-5, 1991.

CRETEL, E.; GALLIAN, P.; OBADIA, Y.; ROUSSEAU, S.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X. Analysis of hepatitis C virus isolates using molecular and serological typing methods. *Acta Virol.*, v.41, p.269-75, 1997.

DA SILVA, L.C., Conceito, tipos de hepatites por vírus e evolução dos conhecimentos. In: DA SILVA, L.C. *Hepatites agudas e crônicas*. 2.ed. São Paulo, Sarvier, 1995, p.1-8.

DAVIDSON, F.; SIMMONDS, P.; FERGUSON, J.C.; JARVIS, L.M.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.C.; SEED, C.R.G.; KRUSIUS, T.; LIN, C.; MEDGYESI, G.A.; KIYOKAWA, H.; OLIM, G.; DURAISAMY, G.; CUYPERS, T.; SAEED, A.A.; TEO, D.; CONRADIE, J.; KEW, M.C.; LIN, M.; NUCHAPRAYOON, C.; NDIMBIE, O.K.; YAP, P. L. 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.

DAVIDSON, F.; SIMMONDS, P. Determination of HCV genotypes by RFLP. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.15, p.175-81.

DIXIT, V.; QUAN, S.; MARTIN, P.; LARSON, D.; BREZINA, M.; DINELLO, R.; SRA, K.; LAU, J.Y.N.; CHIEN, D.; KOLBERG, J.; TAGGER, A.; DAVIS, G.; POLITO, A.; GITNICK, G. Evaluation of a novel serotyping

system for hepatitis C virus: Strong correlation with standard genotyping methodologies. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.2978-83, 1995.

DOORN, L.J.D.; KLETER, B.; PIKE, I.; QUINT, W. Analysis of hepatitis C virus isolates by serotyping and genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.1784-7, 1996.

DUSHEIKO, G.; SCHMILOVITZ-WEISS, H.; BROWN, D.; MCOMISH, F.; YAP, P.-L.; SHERLOCK, S.; MCINTYRE, N.; SIMMONDS, P. Hepatitis C virus genotypes: Investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*, v.19, p.13-8, 1994.

FOCACCIA, R.; CONCEIÇÃO, O.J.G.; SETTE-JÚNIOR, H.; SABINO, E.; BASSIT, L.; NITRINI, D.R.; LOMAR, A.V.; LORENÇO, R.; SOUZA, F.V.; KIFFER, C.R.V.; SANTOS, E.B.; GONZALES, M.P.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; RISCAL, J.R.; CHAMONE, 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.269-84, 1998.

FORNS, X.; MALUENDA, M.D.; LÓPEZ-LABRADOR, F.X.; AMPURDANÈS, S.; OLMEDO, E.; COSTA, J.; SIMMONDS, P.; SÁNCHEZ-TAPIAS, J.M.; DE ANTA, M.T.J.; RODÉS, J. Comparative study of three methods for genotyping hepatitis C virus strains in samples from spanish patients. *J.*

*Clin. Microbiol.*, v.34, p.2516-21, 1996.

GARSON, J.A.; TEDDER, R.S.; BRIGGS, M.; TUKE, P.; GLAZEBROOK, J.A.; TRUTE, A.; PARKER, D.; BARBARA, J.A.J.; CONTRERAS, M.; ALOYSIUS S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet*, v.335, p.1419-22, 1990.

GARSON, J.A.; RING, C.; TUKE, P.; TEDDER, R.S. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet*, v.336, p.878-9, 1990a.

GIANNINI, C.; THIERS, V.; NOUSBAUM, J.B.; STUYVER, L.; MAERTENS, G.; BRÉCHOT, C. Comparative analysis of two assays for genotyping hepatitis C virus based on genotype-specific primers or probes. *J. Hepatol.*, v.23, p.246-53, 1995.

GONZÁLES-PERALTA, R. P. Detection of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by single-strand conformational polymorphism. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.19, p.213-20.

GOURNAY, J.; MARCELLIN, P.; PEIGNOUX, M.M.; DEGOTT, C.; GABRIEL, F.; COURTOIS, F.; BRANGER, M.; WILD, A.M.; ERLINGER, S.; BENHAMOU, J.-P. Hepatitis C virus genotypes in French blood donors.



*J. Med. Virol.*, v.45, p.399-404, 1995.

GUIDO, M.; RUGGE, M.; THUNG, S.N.; CHEMELLO, L.; LEANDRO, G.; ALBERTI, A.; CECCHETTO, A.; PONTISSO, P.; CAVALLETTO, L.; NINFO, V. Hepatitis C virus serotypes and liver pathology. *Liver*, v.16, p.353-357, 1996.

HAYASHI, N.; HIGASSHI, H.; KAMINAKA, K.; SUGIMOTO, H.; ESUMI, M.; KOMATSU, K.; HAYASHI, K.; SUGITANI, M.; SUZUKI, K.; TADAO, O.; NOZAKI, C.; MIZUNO, K.; SHIKATA, T. Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. *J. Hepatol.*, v.17, p.S94-S107, 1993.

HOLLAND, P.V.; BARRERA, J.M.; ERCILLA, G.; YOSHIDA, C.F.T.; WANG, Y.; OLIM, G.A.B.; BETLACH, B.; KURAMOTO, K.; OKAMOTO, H. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by simplified PCR method. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.2372-8, 1996.

HOUGHTON, M.; WEINER, A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q.-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, v.14, p.381-8, 1991.

HOUGHTON, M.; HAN, F.; KUO, G.; CHOO, Q.-L.; WEINER, A.F. Structure

and molecular virology. In: ZUCKERMAN A.J.; THOMAS H.C., ed. *Viral hepatitis. Scientific Basis and Clinical Management*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1993. v.13, p.229-240.

KAZUAKI, C., Genotyping hepatitis C virus by type-specific primers for PCR based on NS5 region. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.14, p.165-73.

KLETER,B.; BROUWER, J.T.; NEVENS, F.; VAN DOOR, L.-V.; ELEWAUT, A.; VERSIEK, J.; MICHIELSEN, P.P.; HAUTEKEETE, M.L.; CHAMULEAU, R.A.F.M.; BRÉNARD, R.; BOURGEOIS, N.; ADLER, M.; QUINT, W.G.V.; BRONKHORST, C.M.; HEIJTINK, R.A.; HOP, W.J.C.; FEVERY, J.; SCHALM, S.W.; BENELUX STUDY GROUP ON TREATMENT OF CHRONIC HEPATITIS C. Hepatitis C virus genotypes: epidemiological and clinical associations. *Liver*, v.18, p.32-8, 1998.

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.1629-32, 1996.

KUO, G.; CHOO, Q.L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L.; ALTER, M.J.; STEVENS, C.E.; TEGTMEIER, G.E.; BONINO, F.; COLOMBO, M.; LEE.

W.-S.; KUO, C.; BERGER, K.; SHUSTER, J.R.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, v.244, p.362-4, 1989.

LAU, J.Y.N.; MIZOKAMI, M.; KOLBERG, J.A.; DAVIS, G.L.; PRESCOTT, L.E.; OHNO, T.; PERRILLO, R.P.; LINDSAY, K.L.; GISH, R.G.; QIAN, K.-P.; KOHARA, M.; SIMMONDS, P.; URDEA, M. S. Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J.Infec. Dis.*, v.171, p.281-9, 1995.

LAU, J.Y.N.; DAVIS, G.L.; PRESCOTT, L.E.; MAERTENS, G.; LINDSAY, K.L.; QIAN, K.; MIZOKAMI, M.; SIMMONDS, P.; HEPATITIS INTERVENTIONAL THERAPY GROUP. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann. Intern. Med.*, v.124, p.868-76, 1996.

LEÓN, P.; LÓPEZ, J.A.; ELOLA, C.; QUAN, S.; ECHEVARRÍA, J.M. Typing of hepatitis C virus antibody with specific peptides in seropositive blood donors and comparison with genotyping of viral RNA. *Vox Sang.*, v.72, p.71-5, 1997.

LERUEZ-VILLE, M.; NGUYEN, Q.-T.; COHEN, P.; COCCO, S.; NOUYOU,

M.; FERRIÈRE, F.; DÉNY, P. Large-scale analysis of hepatitis C virus serological typing assay: effectiveness and limits. *J. Med. Virol.*, v.55, p.18-23, 1998.

MAERTENS, G. & STUYVER, L. HCV genotyping by line probe assay INNO-LIPA HCV II. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.16, p.183-98.

MAERTENS, G.; DEKEYSER, F.; GEEL, A.V.; SABLON, E.; BOSMAN, F.; ZREIN, M.; POLLET, D. Confirmation of HCV antibodies by the line immunossay INNO-LIA HCV Ab III. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.2, p.11-25.

MAHANEY, K.; TEDESCHI, V.; MAERTENS, G.; BISCEGLIE, A.M.D.; VERGALLA, J.; HOOFNAGLE, J.H.; SALLIE, R. Genotypic analysis of hepatitis C virus in american patients. *Hepatology*, v.20, p.1405-11, 1994.

MARSHALL, D.J.; HEISLER, L.M.; LYAMICHEV, V.; MURVINE, C.; OLIVE, D.M.; EHRlich, G.D.; NERI, B.P.; ARRUDA, M. Determination of hepatitis C virus genotypes in United States by cleavase fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.3156-62, 1997.

- MCGARVEY, M.J.; HOUGHTON, M.; WEINER, A.J. Structure and molecular virology. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.19, p.253-270.
- MCOMISH, F.; CHAN, S.-W.; DOW, B.C.; GILLON, J.; FRAME, W.D.; CRAWFORD, R.J.; YAP, P.-L.; FOLLETT, E.A.C.; SIMMONDS, P. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion*, v.33, p.7-13, 1993.
- MIZOKAMI, M.; GOJOBORI, T.; OHBA, K-I.; IKEO, K.; GE, X-M.; OHNO, T.; ORITO, E.; LAU, Y.N. Hepatitis C virus types 7, 8 and 9 should be classified as type 6 subtypes. *J. Hepatol.*, v.24, p.622-4, 1996.
- MIZOKAMI, M.; OHNO, T. Determination of quasispecies by cloning and sequencing. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.18, p.207-11.
- MONDELLI, M.U.; CERINO, A.; BONO, F.; CIVIDINI, A.; MACCABRUNI, A.; ARICÒ, M.; MALFITANO, A.; BARBARINI, G.; PIAZZA, V.; MINOLI, L.; SILINI, E. Hepatitis C virus (HCV) core serotypes in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.2523-27, 1994.

- MONTESANO, L.; GUTIÉRREZ, M.; BRAVO, R.; BAQUERO, M.; SORIANO, V. Correlation between serological and genetic methods for typing hepatitis C virus. *Vox Sang.*, v.71, p.190-1, 1996.
- MORTON, T.A.; KELEN, G.D. Hepatitis C. *Ann. Emerg. Med.*, v.31, p.381-90, 1998.
- MOYER, L.A.; MAST, E.E.; ALTER, M. J. Hepatitis C: part I. Routine serologic testing and diagnosis. *Am. Fam. Physician.*, v.59, p.79-88, 1999.
- NAKAO, T.; ENOMOTO, N.; TAKADA, N.; TAKADA, A.; DATE, T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J. Gen. Virol.*, v.72, p. 2105-12, 1991.
- NIU, J.; KUMAR, U.; PAN, Y.; LIU, Y.; ZHAN, Q.; THOMAS, H.; MONJARDINO, J. Hepatitis C virus type I (1a) in Northern China. *J. Med. Virol.*, v.46, p.56-60, 1995.
- OHNO, T.; MIZOKAMI, M.; YAMAUCHI, M.; OHBA, K.-I.; ORITO, E.; WU, R.-R.; MIZUNO, M.; SUGIHARA, K.; WAKITA, T.; KAKUMU, S. Genotype distribution in Nagoya and new genotype (genotype 3a) in Japanese patients with hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.*, v.30, p.209-14, 1995.

OHNO, T.; MIZOKAMI, M.; WU, R.R.; SALEH, M.G.; OHBA, K.-I.; ORITO, E.; MUKAIDE, M.; WILLIAMS, R.; LAU, J.Y.N. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a e 6a. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.201-7, 1997.

OHNO, T.; MIZOKAMI, M. Genotyping by type-specific primers. That can type HCV types 1-6. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.13, p.159-64.

OKAMOTO, H.; TOKITA, H.; SAKAMOTO, M.; HOROKITA, M.; KOJIMA, M.; IIZUKA, H.; MISHIRO, S. Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.2385-90, 1993.

OKAMOTO, H., SUGIYAMA, Y., OKADA, S., KURAI, K., AKAHANE, Y., SUGAI, Y., TANAKA, T., SATO, K., TSUDA, F., MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Typing hepatitis C virus by polimerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.*, v.73, p.673-9, 1992.

ONI, A.Ø.; HARRISON, T.J. Genotypes of hepatitis C virus in Nigeria. *J. Med. Virol.*, v.49, p.178-86, 1996.

PAWLOTSKY, J.-M.; THORAVAL, F.R.; SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; YAHIA, M.B.; ANDRÉ, C.; VOISIN, M.-C.; INTRATOR, L.; ZAFRANI, E.-S.; DURVAL, J.; DHUMEAUX, D. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. *Ann. Intern. Med.*, v.122, p.169-73, 1995.

PAWLOTSKY, J.-M.; PRESCOTT, L.; SIMMONDS, P.; PELLET, C.; LAURENT-PUIG, P.; LABONNE, C.; DARTHUY, F.; REMIRE, J.; DUVAL, J.; BUFFET, C.; ETIENNE, J.-P.; DHUMEAUX, D.; DUSSAIX, E. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.1734-39, 1997.

PEIG GINABREDA, M.G.; YOSHIDA, C.F.T.; NIEL, C. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.30, p.339-45, 1997.

PISTELLO, M.; MAGGI, F.; VATTERONI, L.; CECCONI, N.; PANICUCCI, F.; BRESCI, G.P.; GAMBARDELLA, L.; TADDEI, M.; BIONDA, A.; TUONI, M.; BENDINELLI, M. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.232-4, 1994.

PRESCOTT, L.E.; SIMMONDS, P.; LAI, C.L.; CHAN, N.K.; PIKE, I.; YAP, P.L.; LIN, C.K. Detection and clinical features of hepatitis C virus type 6



infections in blood donors from Hong Kong. *J. Med. Virol.*, v.50, p.168-75, 1996.

PRESCOTT, L.E.; SIMMONDS, P. Serological genotyping using synthetic peptides derived from the NS4 region. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.17, p.199-205.

PRESTON, F.E.; JARVIS, L.M.; MAKRIS, M.; PHILP, L.; UNDERWOOD, J.C.E.; LUDLAM, C.A.; SIMMONDS, P. Heterogeneity of hepatitis C virus genotypes in hemophilia: Relationship with chronic liver diseases. *Blood*, v.85, p.1259-62, 1995.

QU, D.; HANTZ, O.; GOUY, M.; VITVITSKI, L.; LI, J.-SU.; BERBY, F.; TONG, S.-P.; TRÉPO, C. Heterogeneity of hepatitis C virus genotypes in France. *J. Gen. Virol.*, v. 75, p.1063-70, 1994.

QUER, J.; ESTEBAN, J.I.; Epidemiology. In: ZUCKERMAN, A.J.; THOMAS, H.C., ed. *Viral Hepatitis. Scientific basis and clinical management*. Edinburg, Churchill Livingstone, 1998. v.20, p.271-83.

RAPICETTA, M.; ARGENTINI, C.; DETTORI, S.; SPADA, E.; PELLIZZER, G; GANDIN, C. Molecular heterogeneity and new subtypes of HCV genotype 4. *Res. Virol.*, v.149, p.293-7, 1998.

SACCO, R.; RANDONE, A.; FLICHTMAN, D.; OLIVERI, F.; COLOMBATTO, P.; SCARAGGI, F.A.; BONINO, F.; SCHIRALDI, O.; BRUNETTO, M.R.  
The prevalence of hepatitis C virus types in patients of the same geographic area, according to the source of infection and liver disease. *Clin. Diagn. Virol.*, v.8, p.189-94, 1997.

SHERMAN, K.E.; MENDENHALL, C.; THEE, D.L.; O'BRIEN, J.; ROUSTER, S.D. Hepatitis C serotypes in nonalcoholic and alcoholic patients. *Dig. Dis. Sci.*, v.42, p.2285-91, 1997.

SIMMONDS P.; ROSE, K.A.; GRAHAM, S.; CHAN, S.W.-.; MCOMISH, F.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.C.; YAP, P.L.; MARSDEN, H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1,2, and 3. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.1493-1503, 1993.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C.; CHA, T.-A.; CHAN, S.-W.; MCOMISH, F.; IRVINE, B.; BEALL, E.; YAP, P.L.; KOLBERG, J.; URDEA, M.S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.2391-99, 1993a.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J.; BONINO, F.; BRADLEY, D.W.;

BRECHOT, C.; BROUWER, J.T.; CHAN, S.W.; CHAYAMA, K.; CHEN, D.S.; CHOO, Q.L.; COLOMBO, M.; THEO, H.; CUYPERS, M.; DATE, T.; DUSHEIKO, G.M.; ESTEBAN, J.I.; FAY, O.; HADZIYANNIS, S.J.; HAN, J.; HATZAKIS, A.; HOLMES, E.C.; HOTTA, H.; HOUGHTON, M.; IRVINE, B.; KOHARA, M.; KOLBERG, J.A.; KUO, G.; LAU, J.Y.N.; LELIE, P.N.; MAERTENS, G.; MCOMISH, F.; MIYAMURA, T.; MIZOKAMI, M.; NOMOTO, A.; PRINCE, A.M.; REESINK, H.W.; RICE, C.; ROGGENDORF, M.; SCHALM, S.W.; SHIKATA, T.; SHIMOTOHNO, K.; STUYVER, L.; TRÉPO, C.; WEINER, A.; YAP, P.L.; URDEA, M.S. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, v.19, p.1321-24, 1994.

SIMMONDS, P.; SMIDT, D.B.; MCOMISH, F.; YAP, P.L.; KOLBERG, J.; URDEA, M.S.; HOLMES, E.C. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J. Gen. Virol.*, v.75, p.1053-61, 1994a.

SIMMONDS, P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, v.21, p.570-83, 1995.

SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; CRAXI, A.; SANCHEZ-TAPIAS, J.-M.; ALBERTI, A.; PRIETO, J.; COLOMBO, M.; RUMI, M.G.; IACANO, O.L.; AMPURDANES-MINGALL, S.; BERNHARDT, X.F.; CHERMELLO, L.; CIVEIRA, M.-P.; FROST, C.; DUSHEIKO, G. Epidemiological, clinical

and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients., *J. Hepatol.*, v.24, p.517-24, 1996.

SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; SAKULDAMRONGPANICH, T.; NUCHAPRAYOON, C.; TANPRASERT, S.; HOLMES, E.C.; SMITH, D.B. Evolucionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.3013-24, 1996a.

SMITH, B.C.; STRASSER, S.I.; DESMOND, P.V. Current perspectives in hepatitis C. *Aust. N. Z. J. Med.*, v.25, p.350-7, 1995.

SMITH, D.B.; MELLOR, J.; JARVIS, L.M.; DAVIDSON, F.; KOLBERG, J.; URDEA, M.; YAP, P.-L.; SIMMONDS, P.; THE INTERNATIONAL HCV COLLABORATIVE STUDY GROUP. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary struture, virus detection and typing. *J. Gen. Virol.*, v.76, p.1749-61, 1995.

SMITH, D.B.; PATHIRANA, S.; DAVIDSON, F.; LAWLOR, E.; POWER, J.; YAP, P. L.; SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J. Gen. Virol.*, v.78, p.321-8, 1997.

SMITH, D.B.; SIMMONDS, P. Hepatitis C virus. types, subtypes and beyond. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in*

*molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.11, p.133-46.

SONGSIVILAI, S.; KANISTANON, D.; DHARAKUL, T. A serotyping assay for hepatitis C virus in Southeast Asia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.5, p.737-9, 1998.

SPADA, E.; CICCAGLIONE, A.R.; DETTORI, S.; CHIONNE, P.; KONDILI, L.A.; AMOROSO, P.; GUADAGNINO, V.; GRECO, M.; RAPICETTA, M. Genotyping HCV isolates from Italy by type-specific PCR assay in the core region. *Res. Virol.*, v.149, p.209-18, 1998.

STUYVER, L.; ROSSAU, R.; WYSEUR, A.; DUHAMEL, M.; VANDERBORGHT, B.; HEUVERSWYN, H.V.; MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.1093-1102, 1993.

STUYVER, L.; FRETZ, C.; ESQUIVEL, C.; BOUDIFA, A.; JAULMES, D.; AZAR, N.; LUNEL, F.; LEROUX-ROELS, G.; MAERTENS, G.; FOURNEL, J.J. Hepatitis C virus (HCV) genotype analysis in apparently healthy anti-HCV-positive parisian blood donors. *Transfusion*, v.36, p. 552-8, 1996.

TANAKA, T.; SHIMOTOHNO, K. Detection and molecular cloning of extreme 3'-end of HCV. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols*:

*methods in molecular medicine*. Totowa, Humana Press, 1998, cap.34, p.373-84.

VALLIAMMAI, T.; THYAGARAJAN, S.P.; ZUCKERMAN, A.J.; HARRISON, T.J., Diversity of genotypes of hepatitis C virus in southern India. *J. Gen. Virol.*, v.76, p.711-6, 1995.

WANG, Y.; OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; NAGAYAMA, R.; TAO, Q.-M.; MISHIRO, S. Prevalence, genotype, and an isolate (HC-C2) of hepatitis C virus in chinese patients with liver disease. *J. Med. Virol.*, v.40, p.254-60, 1993.

WATSON, J.P.; BRIND, A.M.; CHAPMAN, C.E.; BATES, C.L.; GOULD, F.K.; JOHNSON, S.J.; BURT, A.D.; FERGUSON, J.; SIMMONDS, P.; BASSENDINE, M.F. Hepatitis C virus: epidemiology and genotypes in the north east of England. *Gut*, v. 38, p.269-76, 1996.

WEBBER, L.M.; ELS, S.; TAYLOR, M.B.; GRABOW W.O.K. Assessment of commercial enzyme immunoassay for hepatitis C virus serotype. *J. Clin. Pathol.*, v.49, p.994-7, 1996.

WU, R.-R.; MIZOKAMI, M.; LAU, J.Y.N.; OHNO, T.; FRANG, Z.-X.; OHBA, K.-I.; WU, X.-S.; HATA, A.; SASAKI, M.; IINO, S. Seroprevalence of hepatitis C virus infection and its genotype in Lanzhou, Western China. *J.*

*Med. Virol.*, v.45, p.174-8, 1995.

XU, L.-Z.; LARZUL, D.; DELAPORTE, E.; BRÉCHOT, C.; KREMSDORF, D.  
Hepatitis C virus genotype 4 is highly prevalent in central Africa (Gabon).  
*J. Gen. Virol.*, v.75, p.2393-8, 1994.

YUN, Z.; LARA, C.; JOHANSSON, B.; RIVERA, I.L.; SÖNNERBORG, A.  
Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic  
analysis of partial NS5 and Core sequences. *J. Med. Virol.*, v.49, p.155-  
60, 1996.

YUN, Z.; JOHANSSON, B.; WEILAND, O.; SÖNNERBORG, A. Genotyping  
of hepatitis C virus performed by type-specific PCR in comparison to  
nucleotide sequencing of NS5 and core regions. *Res. Virol.*, v.148, p.233-  
7, 1997.

ZEIN, N.N.; RAKELA, J.; PERSING, D.H. Genotype-dependent serologic  
reactivities in patients infected with hepatitis C virus in the United States.  
*Mayo Clin. Proc.*, v.70, p.449-52, 1995.