

Patrícia Martinez Levada

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS METODOLOGIAS DE  
HIBRIDIZAÇÃO REVERSA E SEQÜENCIAMENTO DIRETO PARA A  
GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP, *campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica (Área de Concentração: Biologia Molecular)

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Inês M. C. Pardini

Botucatu  
2009

**DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a minha família:  
a meus pais Leila e Gilberto, a minha avó Luiza  
e ao meu irmão Renato*

## AGRADECIMENTOS

- *Agradeço primeiramente a Deus por permitir a conclusão de mais esta etapa de meu aprendizado acadêmico e de vida;*
- *Ao Programa de Pós-Graduação “Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica” do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP;*
- *A minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Maria Inês M.C. Pardini pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa aprimorando meus conhecimentos sobre biologia molecular e virologia e pela confiança em me escolher como aluna do Programa de Pós-Graduação “Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica”;*
- *Aos docentes do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos;*
- *Ao Dr. Giovanni Faria Silva pelos preciosos ensinamentos da área clínica e pela pronta disposição de auxílio em todas as horas;*
- *Aos funcionários da área de Hepatites Virais do Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Biologia Molecular: Ms Silvia Corvino, Regina Assis e Rosângela Escolático Fernandes;*
- *À Dr<sup>a</sup> Rejane Maria T. Grotto e à Dr<sup>a</sup> Adriana Camargo Ferrasi pelas opiniões, conselhos e pela constante disposição em ensinar e ajudar;*
- *Aos amigos que integram ou fizeram parte do Laboratório de Biologia Molecular e com os quais tive a oportunidade de conviver e aprender: Camila Fernanda Verdichio de Moraes, Chiara Legnaro, Cristiane Alves, Denise Triglia, Elisabete Garcia Franco, Juliana Capannacci, Juliana Oliveira e Luciandro Sodrê;*
- *À empresa DOCT pelo apoio financeiro dispensado a mim, essencial para a conclusão deste trabalho;*
- *Aos meus pais Leila Aparecida Martinez Levada e Gilberto Carlos Levada pelo apoio e dedicação constantes ao longo destes dois anos de mestrado e de toda minha trajetória de aprendizado;*
- *Ao meu tio Celso Luis Levada pelo apoio em meus primeiros meses em Botucatu e incentivo nesta assim como nas etapas anteriores de minha vida acadêmica;*
- *A minha avó Luiza Jorge Martinez pelas orações, apoio incondicional e pelo modo carinhoso com o qual sempre demonstrou que acreditava em mim;*

- *Ao meu irmão Renato Martinez Levada e a minha cunhada Samara Pereira pelo apoio;*
- *As minhas tias Edna Fátima Martinez Gallo e Laura Lembo Coppi, a minha avó Maria Lembo Levada e a minha madrinha Aparecida Aquino pelas orações;*
- *À amiga Priscilla Vieira Lima pela paciência com que sempre me ouviu, compreensão e ajuda nos momentos difíceis;*
- *À Regina Assis, pela amizade, incentivo e auxílio;*
- *Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina e da Biblioteca da UNESP de Botucatu pela solução de dúvidas e pelo modo tão gentil com o qual sempre fui atendida;*
- *À secretária do Programa de Pós-Graduação, Janisse Pena Bispo, pelo auxílio e disponibilidade constantes;*
- *À secretária do Hemocentro, Cleonice Burber de Piere (Cleo), pela simpatia e bom-humor com que sempre me auxiliou;*
- *Aos amigos de São Carlos e a todos os amigos que de alguma forma me incentivaram;*
- *Finalmente, agradeço aos pacientes que compuseram o grupo de estudo deste trabalho;*

**EFÍGRAFE**

*A natureza é só uma superfície  
na sua superfície ela é profunda  
e tudo contém muito  
se os olhos bem olharem*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

A identificação dos diferentes genótipos e subtipos do VHC tem sido útil para o entendimento da evolução da doença e da epidemiologia do vírus em relação a fatores de risco. Atualmente, os métodos de genotipagem assim como a região do genoma viral a ser utilizada constituem temas de discussão. O presente trabalho teve por objetivo comparar a metodologia de hibridização reversa (kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v1.0) ao seqüenciamento direto das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *core* do genoma do VHC. Foram utilizadas 92 amostras de plasma de pacientes do Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Dentre as 92 amostras constituintes deste trabalho, 64 foram selecionadas aleatoriamente e 28 foram escolhidas segundo a genotipagem prévia realizada com o kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0. Dentre estas 28 amostras escolhidas, 10 foram genotipadas como 1a/1b, 2 como 2, 2 como 5, 7 apenas como 1 e 7 foram inconclusivas para a genotipagem com o kit comercial. A genotipagem por seqüenciamento direto foi efetuada seguindo as etapas de: extração do RNA viral, transcrição reversa, amplificação das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* por *Nested-PCR*, reação de marcação fluorescente e eletroforese em aparelho automático *ABI 377* (*Applied Biosystems*). Todas as amostras puderam ser amplificadas para a região *5'UTR* e 62 para *NS5B*. Para as 30 amostras que não puderam ser amplificadas para *NS5B* foi realizada a amplificação da região *5'UTR-core* que se mostrou eficiente na amplificação de 28 (93%) das amostras. A análise de seqüência permitiu uma maior precisão na classificação viral. O seqüenciamento direto foi eficaz na solução de 100% dos resultados inconclusivos pela metodologia de hibridização reversa. Assim como já reportado na literatura o kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0 produziu resultados errôneos com relação à subtipagem do VHC, entretanto, a genotipagem por seqüenciamento direto revelou também pelo menos uma troca de genótipo pelo kit comercial, influenciando na conduta terapêutica e questionando a eficiência do método também quanto à determinação dos tipos virais.

Palavras-chave: VHC, genotipagem, hibridização reversa, seqüenciamento direto

## ABSTRACT

The HCV genotypes and subtypes identification has been useful to understand the disease evolution and viral epidemiological regarding risk factors. Recently, the genotyping methods and viral genomic region used in viral typing have been very discussed in scientific community. The goal of this study was to compare the reverse hybridization methodology and sequencing of the HCV genomic regions 5'UTR, NS5B and core. Ninety-two plasma sample with viral RNA detected from patients assisted in the Department of Internal Medicine – Gastroenterology Division, Botucatu Medical School, University of São Paulo State - UNESP were used in this study. From these 92 samples, 64 were randomly selected and 28 choose according genotyping result by reverse hybridization. The genotyping by reverse hybridization were performed with INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0, according manufacturer's instructions. To genotyping by sequencing viral RNA isolated from plasma samples was used as a source for RT-PCR amplification and automatic sequencing in ABI 377 sequencer (Applied Biosystems). All samples were amplified to 5'UTR genomic region and 62 to NS5B. From 30 samples that showed insucess in NS5B amplification, 28 (93%) were amplified to 5'UTR-core region with efficiency. The genotyping by sequencing allowed more precision in viral classification. The sequencing showed efficient in the resolution of the 100% of cases inconclusive by reverse hybridization. The genotyping by INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0 showed wrong results in relation of viral subtyping, corroborating previous results of the scientific literature. The sequencing also demonstrated at least a change of viral genotype when compared with INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0, result that could influence the therapeutic decision, turning questionable the INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0 efficiency to determine the viral genotypes, too.

Key-words: HCV, genotyping, reverse hybridization, sequencing

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação do vírus da hepatite C (VHC) .....	18
Figura 2. Processamento da poliproteína precursora das proteínas do VHC .....	19
Figura 3. Organização do genoma viral do VHC, tradução e processamento da poliproteína precursora.....	21
Figura 4. Estrutura secundária da região 5'UTR do genoma do VHC .....	22
Figura 5. Árvore filogenética baseada na seqüência do genoma completo do VHC ...	23
Figura 6. Distribuição mundial dos genótipos do VHC .....	24
Figura 7. Distribuição dos genótipos do VHC no Brasil .....	25
Figura 8. Ciclo de vida do VHC .....	28
Figura 9. Representação da variabilidade genética das diferentes regiões do genoma do VHC.....	35
Figura 10. Representação do princípio de hibridização reversa utilizado para a genotipagem do VHC pelo ki comercial <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> .....	36
Figura 11. Fluxograma de amplificação da região <i>NS5B</i> do genoma do VHC.....	43
Figura 12. Análise da eletroforese em gel de agarose 2% das regiões <i>NS5B</i> (A), 5'UTR (B) e 5'UTR-core (C). .....	47
Figura 13. Cromatogramas de seqüências da região genômica 5'UTR do VHC de amostras com resultados inconclusivos pela genotipagem com o kit <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> .....	51
Figura 14. Cromatograma da seqüência da região genômica 5'UTR do VHC de uma amostra classificada como 1a/1b pela genotipagem com o <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> v.1.0. exibindo um pico de adenina (A) na posição 243 .....	53
Figura 15. Cromatograma da seqüência da região genômica 5'UTR do VHC de uma amostra classificada como 1a/1b pela genotipagem com o <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> v.1.0. exibindo um pico de guanina (G) na posição 243 .....	53
Figura 16. Cromatograma exibindo sobreposição de picos de adenina e guanina na posição 243 da região 5'UTR de uma amostra previamente classificada como 1a/1b pela genotipagem por meio do kit comercial <i>INNO-LiPA</i> v.1.0.....	53
Figura 17. Cromatogramas de seqüências exibindo sobreposições de picos de adenina e guanina na posição 243 da região 5'UTR de uma amostra com resultado	

inconclusivo e e outra determinada apenas como genótipo 1 pela genotipagem pelo kit comercial <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> v.1.0. ....	55
Figura 18. Representação das membranas de nitrocelulose constituintes das versões 1.0 (A) e 2.0 (B) do kit comercial de genotipagem <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> .....	58
Figura 19. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do VHC isolada da amostra 371 com as seqüências referência AF0F4248 (genótipo 1b), D90208 (genótipo 1b) e Y13184 (genótipo 5a) visualizado por meio do <i>software</i> <i>MEGA</i> v.4.1.....	60/61
Figura 20. Cromatograma de seqüência da região <i>core</i> do genoma do VHC exibindo sobreposições de picos característicos dos genótipos 5 e 1b.....	62

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1. Número de amostras selecionadas segundo determinação genotípica prévia com o kit comercial <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> .....	39
Tabela 2. Resultados das reações de amplificação das regiões genômicas <i>5'UTR</i> e <i>NS5B</i> do VHC para as 92 amostras do estudo e da região <i>5'UTR-core</i> para as 30 amostras que mostraram insucesso de amplificação pela região <i>NS5B</i> .....	48
Tabela 3. Genótipos e subtipos determinados pelas metodologias de hibridização reversa ( <i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup> ) e sequenciamento direto das regiões <i>5'UTR</i> , <i>NS5B</i> e <i>5'UTR-core</i> .....	49

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Lista de <i>primers</i> utilizados para a reação de amplificação das regiões 5'UTR, 5'UTR -core e NS5B do VHC.....	41
Quadro 2. Genótipos determinados pela metodologia de seqüenciamento direto das regiões 5'UTR, NS5B e 5'UTR-core para amostras com resultados inconclusivos pela genotipagem por hibridização reversa (INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0).....	50
Quadro 3. Genótipos determinados pela metodologia de seqüenciamento direto das regiões 5'UTR, NS5B e 5'UTR-core para amostras classificadas como 1a/1b pela genotipagem por hibridização reversa (INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0). ....	54
Quadro 4. Subtipos discrepantes entre as metodologias de seqüenciamento direto e hibridização reversa (INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0) e/ou com resultados discrepantes entre o seqüenciamento de 5'UTR e NS5B ou 5'UTR-core.....	56
Quadro 5. Genótipos determinados pela metodologia de seqüenciamento direto das regiões 5'UTR, NS5B para amostras classificadas como 2 pela genotipagem por hibridização reversa (INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0). ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>A</b>	Adenina
<b><i>bDNA</i></b>	<i>Branched DNA</i>
<b>C</b>	Citosina
<b><i>c22</i></b>	peptídeo sintético 22 derivado da proteína <i>core</i>
<b><i>cDNA</i></b>	DNA complementar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b><i>Core</i></b>	Nucleocapsídeo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<b><i>E1</i></b>	Envelope 1
<b><i>E2</i></b>	Envelope 2
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b><i>ELISA</i></b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b><i>et al.</i></b>	e colaboradores
<b><i>F</i></b>	<i>Frameshift</i>
<b>G</b>	Guanina
<b>g</b>	Unidade de aceleração centrífuga relativa
<b><i>HBsAg</i></b>	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis C virus</i>
<b><i>HVR</i></b>	<i>Hipervariable Region</i>
<b>IFN <math>\alpha</math></b>	<i>Interferon alfa</i>
<b><i>IRES</i></b>	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
<b>Kb</b>	Quilobase
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b><i>LDL</i></b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b><i>LiPA</i></b>	<i>Line Probe Assay</i>
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetros cúbicos

<b>NANB</b>	Não-A, Não-B
<b>NCR</b>	<i>Non-coding Region</i>
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NS2</b>	<i>Non-structural 2</i>
<b>NS3</b>	<i>Non-structural 3</i>
<b>NS4A</b>	<i>Non-structural 4A</i>
<b>NS4B</b>	<i>Non-structural 4B</i>
<b>NS5A</b>	<i>Non-structural 5A</i>
<b>NS5B</b>	<i>Non-structural 5B</i>
<b>nt</b>	Nucleotídeos
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RBV</b>	Ribavirina
<b>RdRp</b>	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RT</b>	<i>Reverse transcription</i>
<b>RVS</b>	Resposta Viroológica Sustentada
<b>T</b>	Timina
<b>TBE</b>	Tris-Borato- EDTA
<b>TCD8<sup>+</sup></b>	Células T CD8 <sup>+</sup>
<b>TMA</b>	<i>Transcription Mediated Amplification</i>
<b>U</b>	Unidade
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region</i>
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>V</b>	Volts
<b>VHA</b>	Vírus da hepatite A
<b>VHB</b>	Vírus da hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da hepatite C
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1. DESCOBERTA DO VÍRUS DA HEPATITE C .....	16
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	17
1.3. VÍRUS DA HEPATITE C (VHC).....	18
1.4. A ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL.....	20
1.5. DIVERSIDADE GENÉTICA DO VHC .....	23
1.6. CINÉTICA VIRAL .....	26
1.7. MECANISMO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	27
1.8. ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO .....	28
1.9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	30
1.10. GENOTIPAGEM.....	33
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>38</b>
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. CASUÍSTICA .....	39
3.2. MÉTODOS .....	39
3.2.1. Genotipagem pelo kit comercial INNO-LiPA® v.1.0 .....	39
3.2.2. Genotipagem baseada em seqüenciamento direto .....	40
3.2.2.1. Extração do RNA Viral.....	40
3.2.2.2. Transcrição reversa.....	40
3.2.2.3. Nested-PCR (Polymerase Chain Reaction).....	40
3.2.2.4. Eletroforese em gel de agarose a 2%.....	44
3.2.2.5. Purificação do produto amplificado.....	44
3.2.2.6. Quantificação do produto amplificado purificado .....	44
3.2.2.7. Reação de Marcação Fluorescente .....	44
3.2.2.8. Precipitação .....	45
3.2.2.9. Desnaturação do DNA e eletroforese em seqüenciador ABI Prism 377 .....	45
3.2.2.10. Análise dos dados .....	45
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
4.1. RESULTADOS DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO .....	47
4.2. GENOTIPAGEM.....	48

4.2.1. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras consideradas inconclusivas pela genotipagem com o kit INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0 .....	50
4.2.2. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras classificadas como 1a/1b pela genotipagem com o kit INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0 .....	52
4.2.3. Discrepâncias entre os resultados quanto à determinação dos subtipos 1a e 1b .....	55
4.2.4. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras classificadas como 2 e 3 pela genotipagem com o kit INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0 .....	57
4.2.5. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras classificadas como 5 pela genotipagem com o kit INNO-LiPA <sup>®</sup> v.1.0 .....	57
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DESCOBERTA DO VÍRUS DA HEPATITE C

O termo hepatite viral está associado a doenças causadas por um grupo de vírus que possuem em comum o hepatotropismo (Ferreira e Silveira *et al.*, 2004).

Os primeiros relatos de hepatite potencialmente infecciosa datam do século IV a.C. quando Hipócrates descreveu uma epidemia de doença icterica (Freitas *et al.*, 2003). Estudos realizados principalmente durante a Segunda Guerra Mundial confirmaram o caráter infeccioso envolvido em algumas doenças ictericas distinguindo duas formas gerais de contágio, uma fecal-oral, que foi chamada de hepatite infecciosa e outra de transmissão parenteral denominada sérica ou soro-homóloga (Hoolinger, 1996).

Em 1965, Baruch Blumberg descobriu um antígeno no soro de um aborígine australiano o qual denominou antígeno Austrália. Posteriormente, este antígeno foi associado a casos de hepatite pós-transfusional (Prince *et al.*, 1968; Blumberg *et al.*, 1969). Em 1970, Dane pôde visualizar, por imunoeletromicroscopia, a partícula viral íntegra em um soro positivo para o antígeno Austrália. Tal partícula passou a ser conhecida como vírus da hepatite B enquanto o antígeno Austrália, que estava presente no envoltório desta partícula, passou a ser denominado antígeno de superfície do vírus da hepatite B (*Hepatitis B surface antigen – HBsAg*).

A introdução de testes de triagem para o *HBsAg* diminuiu a incidência de hepatite pós-transfusional, entretanto, ainda havia ocorrência significativa destes relatos sugerindo a existência de outro agente etiológico envolvido nestes casos (Purcell *et al.* 1971). Em 1973 o vírus da hepatite A (VHA), responsável pela hepatite denominada anteriormente de infecciosa foi identificado e, em 1979, isolado de culturas celulares. (Resegue *et al.*, 1999). A possibilidade de relação do VHA na hepatite pós-transfusional foi testada e descartada (Freitas *et al.*, 2003). Estes casos foram extensivamente estudados e ficaram conhecidos por muitos anos como hepatite não-A, não-B (NANB) até a descoberta de seu agente etiológico, um terceiro vírus hepatotrópico identificado em 1989 e denominado vírus da hepatite C (VHC) (Alter e Houghon, 2000).

O VHC foi isolado por Choo *et al.*, em 1989, por meio de ferramentas de biologia molecular, utilizando plasma de um chimpanzé infectado. Testes baseados na pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C puderam, então, ser desenvolvidos e

introduzidos na rotina de triagem de doadores de sangue o que possibilitou redução significativa da incidência da hepatite pós-transfusional (Bellentani *et al.*, 2000).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é comum no mundo todo afetando cerca de 170 milhões de pessoas segundo dados da Organização Mundial de Saúde (McHutchison, 2004). Constitui um grave problema de saúde pública devido às altas taxas de cronificação e ao seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma (Strauss, 2001). No Brasil, a importância epidemiológica da infecção pelo VHC reflete-se no grande número de indivíduos infectados (cerca de 2% da população), constituindo a causa mais comum de doença hepática crônica assim como a mais freqüente indicação para transplante hepático (Coelho, 2001).

A transmissão do vírus da hepatite C ocorre predominantemente por meio do contato com sangue e/ou hemoderivados sendo consideradas populações risco: indivíduos transfundidos antes da introdução de testes de triagem, hemodialisados, usuários de drogas, pessoas com tatuagem, *piercings* ou que apresentem outras formas de exposição percutânea (Ferreira e Silveira, 2004; Zein *et al.*, 2000).

A difusão dos testes sorológicos de triagem de bolsas de sangue liderou um declínio significativo na incidência da infecção pós-transfusional pelo VHC nos últimos anos (Bellentani *et al.*, 2000), entretanto, novas fontes de infecção estão se tornando aparentes (Spada *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, o uso de drogas injetáveis tem sido o principal fator de novos casos de infecção pelo vírus, particularmente em países desenvolvidos (Zein *et al.*, 2000).

A possibilidade de transmissão sexual do VHC tem sido objeto de estudo de alguns grupos de pesquisa, porém, ainda constitui um assunto controverso que necessita de maior conhecimento. A grande maioria dos estudos menciona risco mínimo de transmissão sexual exceto aqueles que trabalharam com populações específicas como a de homossexuais ou profissionais do sexo (Rosemberg, 1999).

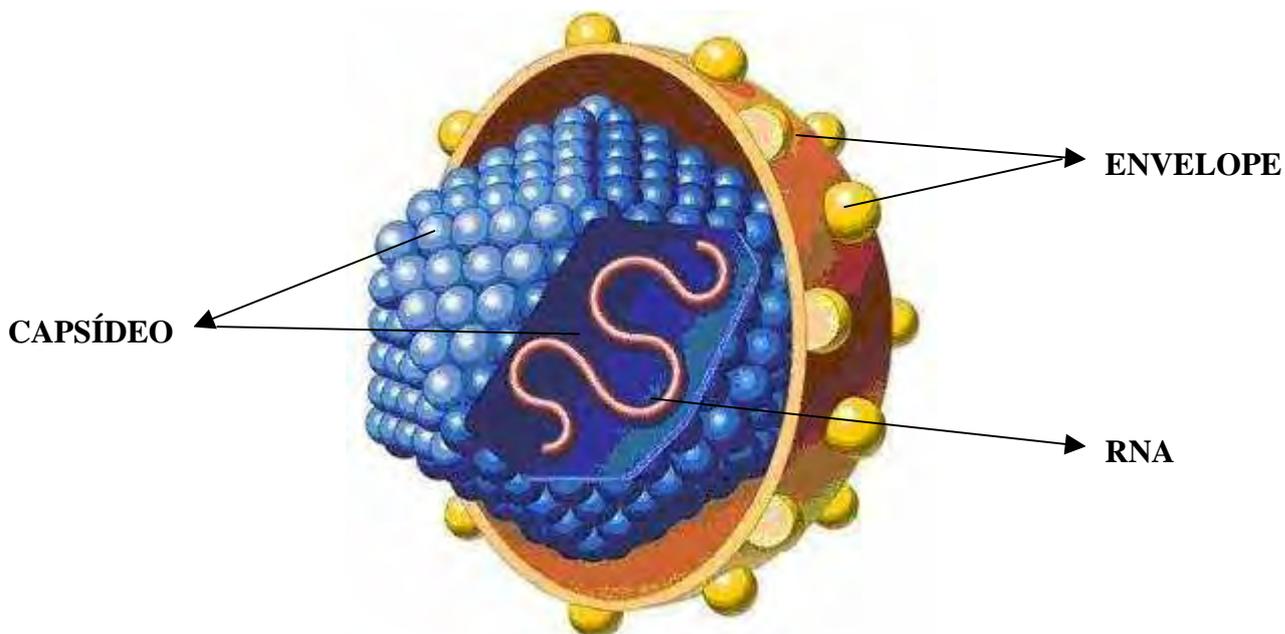
No Brasil, Cavalheiro, em 2004, avaliando a possibilidade de transmissão do VHC entre casais heterossexuais, encontrou alta similaridade entre as seqüências genômicas virais dos cônjuges. Mello, em 2006, realizou a análise filogenética de diferentes regiões genômicas de vírus isolados a partir do plasma de casais heterossexuais obtendo relações monofiléticas entre as linhagens virais dos cônjuges

infectados indicando uma fonte comum de transmissão. Contudo, em ambos os estudos, não há como avaliar se esta transmissão é sexual ou por outras formas de contato próximo.

Os riscos de transmissão ocupacional e perinatal do VHC também são baixos. No entanto, segundo Zein *et al.* (1997), os índices de transmissão perinatal elevam-se em casos de mães co-infectadas com HIV.

### 1.3. VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

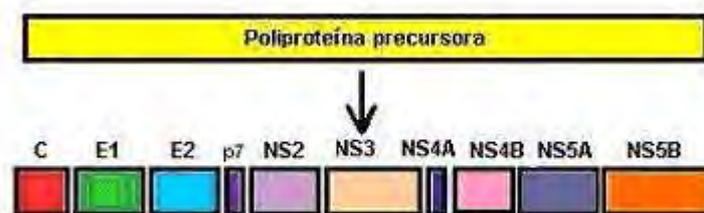
O VHC é um vírus de 55 a 65nm de diâmetro, da família *Flaviviridae* e gênero *Hepacivirus*. Os vírions de VHC ainda não puderam ser visualizados conclusivamente por meio de microscopia eletrônica e as informações sobre sua estrutura ainda são imprecisas. Por analogia com outros flavivírus, o VHC possui a estrutura clássica icosaédrica na qual se destacam o envelope e o capsídeo que envolve seu genoma e juntamente com este forma o nucleocapsídeo (Penin *et al.*, 2004) (figura 1).



**Figura 1. Representação do vírus da hepatite C (VHC) ressaltando o envelope, capsídeo e RNA virais. Fonte: <http://faculty.ksu.edu.sa/5115/pictures%20library/HCV%model.jpg> (com adaptações).**

Dentre as proteínas que fazem parte da constituição viral, distinguem-se as estruturais (*core*, *E1*, *E2*) e as não estruturais (*NS2*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B*, *NS5A* e *NS5B*)

sendo as últimas relacionadas com a replicação viral. Todas estas proteínas são originadas pela clivagem de uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos codificada pelo genoma viral. Além destas proteínas, a clivagem incompleta da proteína estrutural *E2* produz um peptídeo denominado *p7*. (Penin *et al.*, 2004).



**Figura 2. Processamento da poliproteína precursora das proteínas do VHC.**  
 Fonte: [http://www.seimc.org/control/revi\\_viro/variaVHC.htm](http://www.seimc.org/control/revi_viro/variaVHC.htm) (com adaptações).

A proteína *core* é a constituinte do nucleocapsídeo viral e tem sido associada com o desenvolvimento da esteatose por interferir no metabolismo intracelular de lipídios e lipoproteínas (Moradpour *et al.*, 2007). Além disso, têm-se demonstrado que a proteína *core* interage com várias proteínas celulares sugerindo-se que esteja envolvida na modulação de vários processos tais como proliferação, morte e sinalização celulares. Foi proposto recentemente que a proteína *core* suprimiria a resposta imune do hospedeiro, incluindo a atividade dos linfócitos T citotóxicos por meio da interação com receptores específicos (Penin, 2003).

As glicoproteínas *E1* e *E2*, que são clivadas por proteases do próprio hospedeiro, são componentes do envelope do VHC. Estudos recentes sugerem que estas proteínas seriam responsáveis pela ligação e fusão do vírus a receptores do hospedeiro. A Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein - LDL*) e a tetraspanina CD81+ foram descritas como possíveis receptores do VHC em linfócitos e hepatócitos (Moradpour *et al.*, 2007). Além disso, a glicoproteína *E2* exibe uma região hipervariável de aminoácidos envolvida na evasão à resposta imune do hospedeiro (Penin, 2003).

A função do peptídeo *p7*, ainda não está completamente esclarecida, porém sugere-se que esteja envolvido com a atividade de canal iônico, necessária para a replicação do VHC (Penin, 2003).

A proteína *NS2* associada à *NS3* (*NS2-NS3*) têm a propriedade de auto-protease, ou seja, acelera sua própria clivagem em *NS2* e *NS3* (Penin, 2003). Foram atribuídas para a proteína *NS2* madura as propriedades de inibição da apoptose, modulação da expressão gênica e fosforilação da *NS5A* (Liu *et al.*, 1999; Dumuolin *et al.*, 2003; Erdtmann *et al.*, 2003).

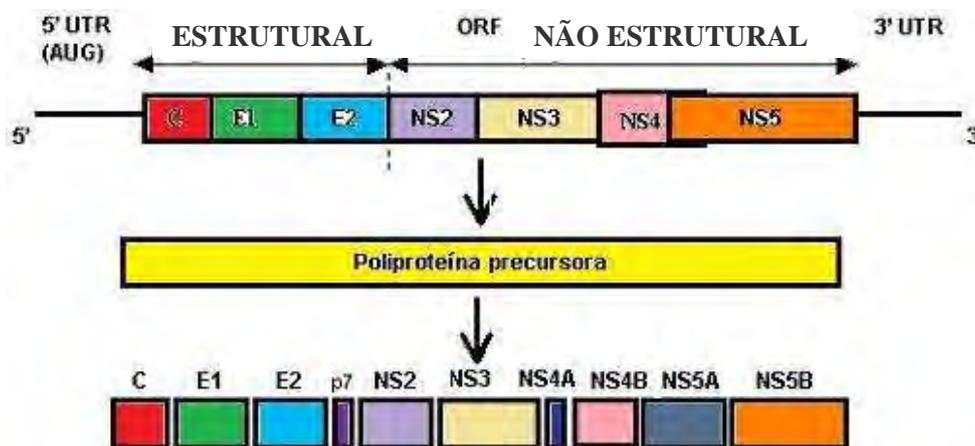
A *NS3* possui um domínio serino-protease na porção N-terminal, responsável por eventos de clivagem na região não estrutural da poliproteína, e um domínio *RNA helicase/NTPase* na porção C-terminal (Lindenbach *et al.*, 2005; Appel *et al.*, 2006). Acredita-se que a porção helicase da *NS3* esteja relacionada com o relaxamento da estrutura secundária do RNA e seja responsável por separar as fitas positiva e negativa durante a replicação constituindo um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas. A proteína *NS4A* funciona como um cofator do domínio serino-protease de *NS3* (Penin, 2003).

A *NS4B* é uma integrina de membrana de função desconhecida (Penin *et al.*, 2004). Já a *NS5A* é uma fosfoproteína que interage com muitas proteínas celulares e, recentemente, tem se destacado devido ao seu potencial de modulação da resposta ao Interferon (Moradpour *et al.*, 2007).

A *NS5B* é a RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase - RdRp*), enzima chave para a replicação do VHC via síntese de uma fita complementar de RNA usando o genoma como molde. Esta enzima viral tem sido extensivamente caracterizada e tem emergido como maior alvo para a intervenção anti-viral (Penin *et al.*, 2004).

#### **1.4. A ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL**

O genoma do VHC é constituído de uma molécula de RNA em fita simples, de polaridade positiva e aproximadamente 9,6 kilobases. Este genoma contém uma fase de leitura aberta (*Open Reading Frame-ORF*) responsável pela codificação de uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que será posteriormente clivada nas proteínas estruturais e não estruturais do VHC. A *ORF* é flanqueada por regiões não traduzidas (*Untranslated Region-UTR*) ou não codificadoras (*Non-coding Region-NCR*) de aproximadamente 341 e 230 nucleotídeos, denominadas 5' *UTR* e 3' *UTR* (Penin *et al.*, 2004) (figura 3).



**Figura 3. Organização do genoma viral do VHC, tradução e processamento da poliproteína precursora.** Fonte: [http://www.seimc.org/control/revi\\_viro/variaVHC.htm](http://www.seimc.org/control/revi_viro/variaVHC.htm) (com adaptações).

As regiões não codificadoras 5'UTR e 3'UTR são seqüências de RNA altamente conservadas (Penin *et al.*, 2004). A região 5'UTR contém um sítio interno de entrada ribossomal conhecido como *IRES* (*Internal Ribosomal Entry Site*) (figura 4) que se acopla diretamente à subunidade 40S do ribossomo e inicia a tradução em um domínio cap-independente, não necessitando de fatores pré-iniciação (Penin *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2006; Fraser e Doudna, 2007). Existem algumas diferenças estruturais entre os *IRES* dos diferentes genótipos de VHC (Smith *et al.*, 1995) sendo que a eficiência dos mesmos pode variar de acordo com estas diferenças (Kamoshita *et al.*, 1997).



A existência de uma fase alternativa de leitura que codificaria uma proteína denominada *F* (*Frameshift*), de função desconhecida, foi recentemente reportada (Penin, 2003).

### 1.5. DIVERSIDADE GENÉTICA DO VHC

Até o presente momento, são conhecidos seis genótipos de VHC classificados de 1 a 6 de acordo com a seqüência genômica (figura 5). Os genótipos descritos divergem em 30 a 35% entre si podendo ser divididos em subtipos, representados por letras minúsculas do alfabeto, que diferem de 20 a 25% na seqüência de nucleotídeos. Além disso, um mesmo indivíduo infectado pode apresentar uma população de variantes do VHC com seqüências similares derivadas de uma dominante denominadas *quasispecies* (Simmonds *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 2005). Esta grande variabilidade é decorrente da ausência de atividade corretiva da RNA polimerase viral que resulta em alta suscetibilidade ao surgimento de pequenas e constantes mutações durante a replicação do vírus. Estas mutações constantes propiciam o freqüente escape do vírus à resposta imunológica do hospedeiro (Missale *et al.*, 1998; Rosen e Gretch, 1999).

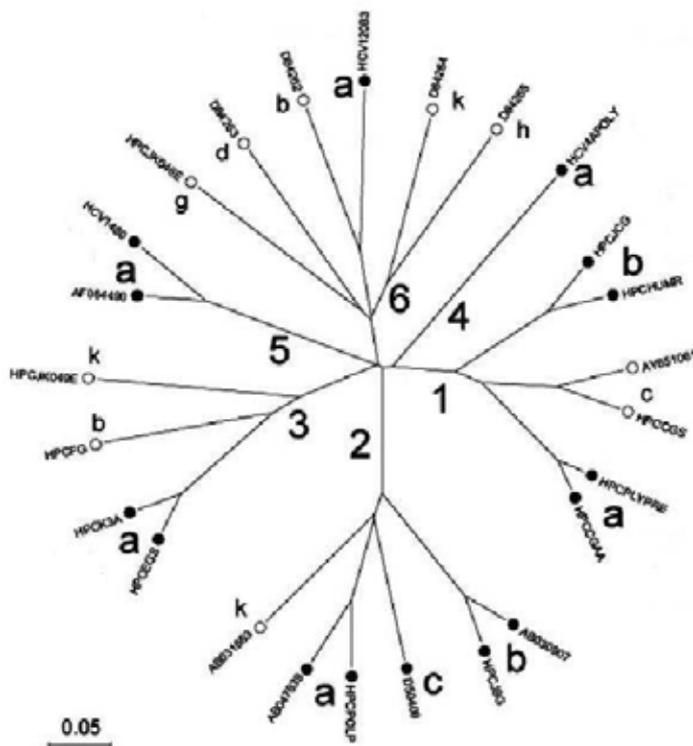
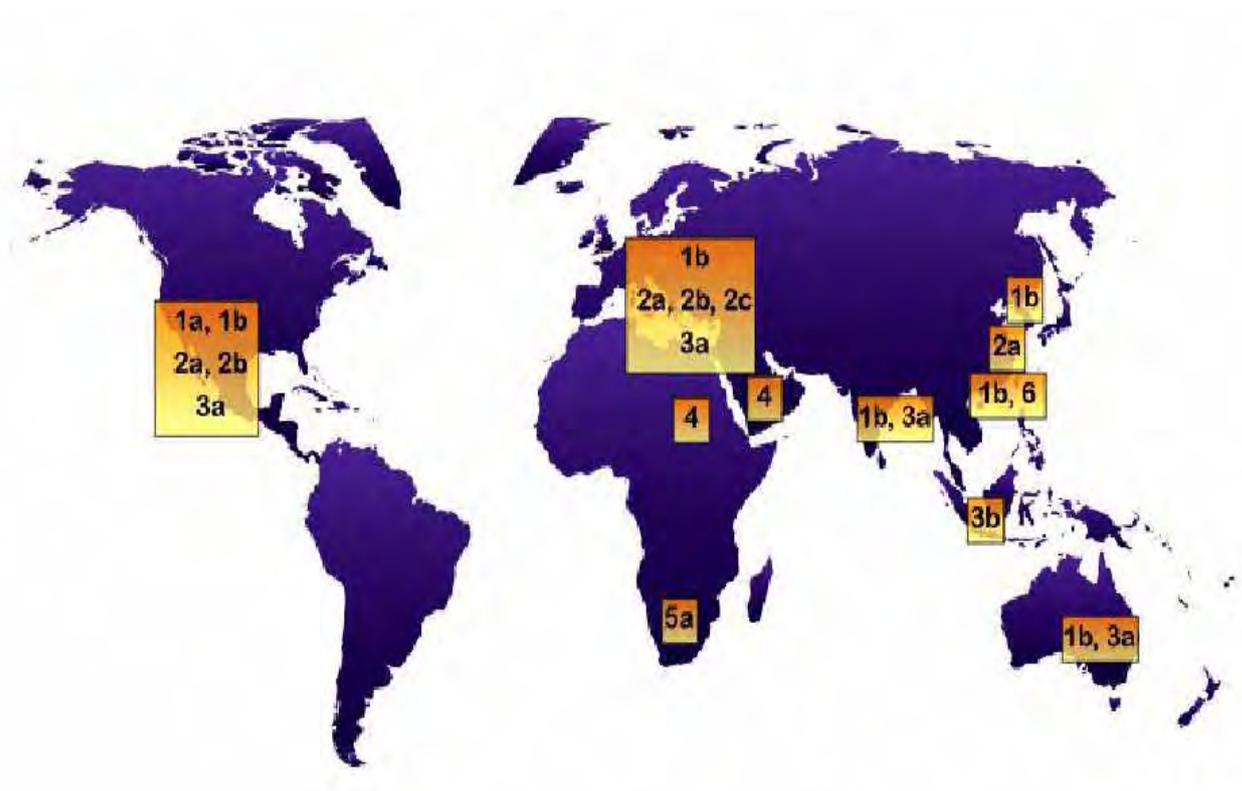


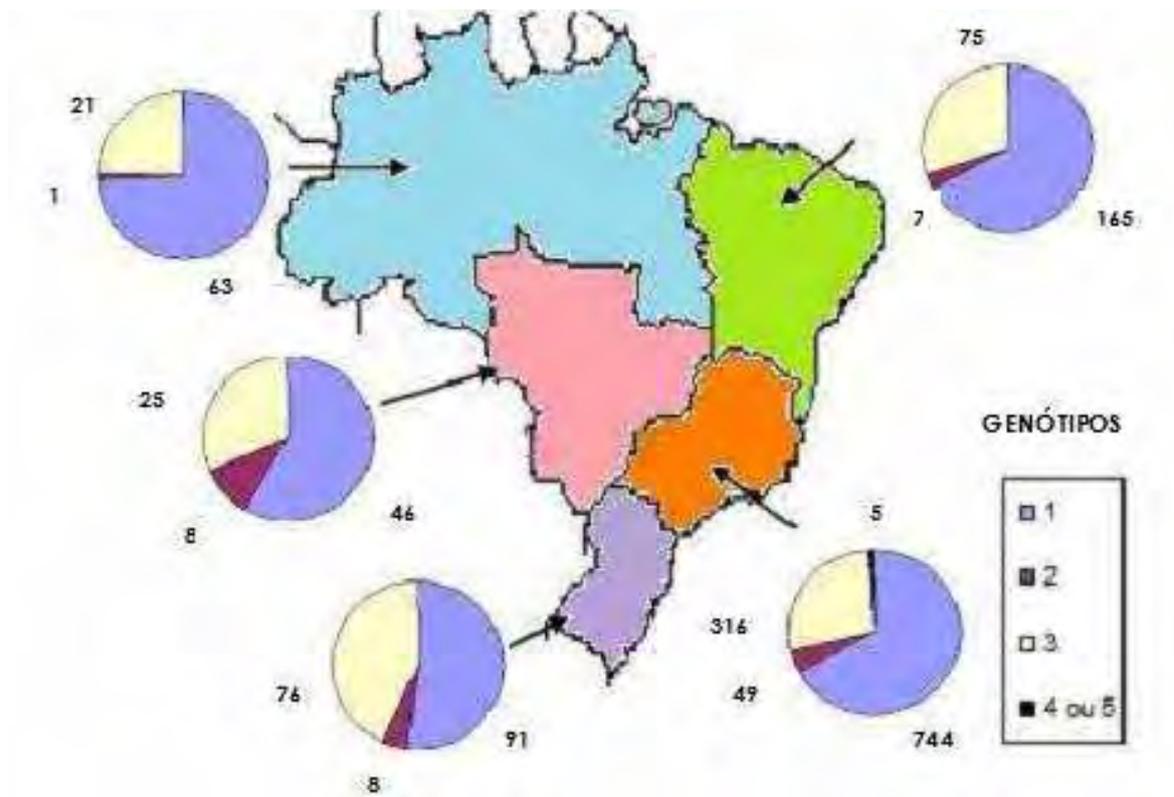
Figura 5. Árvore filogenética baseada na seqüência do genoma completo do VHC (Adaptado de Simmonds *et al.*, 2005).

Os genótipos 1, 2 e 3 encontram-se distribuídos mundialmente enquanto os genótipos 4, 5 e 6 são restritos a determinadas regiões (Simmonds *et al.* 2005). O genótipo 4 é mais prevalente no norte da África e no Oriente Médio, o 5 é mais comum no sul da África e o 6 na Ásia (Zein *et al.*, 2000) (figura 6).



**Figura 6. Distribuição mundial dos genótipos do VHC (Fonte: Fang *et al.* 1997).**

No Brasil, estudos têm mostrado que o genótipo 1 prevalece seguido, respectivamente, dos genótipos 3 e 2 (Martins *et al.* 1998, Amorin *et al.*, 2004, Campiotto *et al.* 2005) (figura 7).



**Figura 7. Distribuição dos genótipos do VHC no Brasil (Adaptado de Campiotto *et al.*, 2005).**

Alguns subtipos, tais como 1a, 1b e 3a, difundiram-se rapidamente nas últimas décadas como resultado de transfusões sanguíneas e do compartilhamento de seringas entre os usuários de drogas injetáveis. Tais subtipos atualmente são responsáveis pela maioria das infecções nos países do ocidente (Simmonds *et al.*, 2004).

Mudanças na epidemiologia e na distribuição dos genótipos do VHC têm sido reportadas na literatura científica (Haushofer *et al.*, 2001). Di Tommaso *et al.*, em 2003, avaliando a associação de fatores clínicos e epidemiológicos aos diferentes genótipos e subtipos virais, puderam constatar um histórico comum de transfusão sanguínea no grupo de pacientes infectados com o subtipo 1b e com o genótipo 2. Em contrapartida, o abuso de drogas foi frequentemente associado a pacientes infectados com o subtipo 1a e o com genótipo 3. Lopez-Labrador *et al.* (1997) encontraram maior prevalência dos subtipos 1a, 1c e do genótipo 3 em pacientes com história de abuso de drogas. Similarmente, Roffi *et al.* (1998) descreveram maior frequência dos genótipos 3 e 4 e do subtipo 1a em pacientes menores de 30 anos que fizeram uso abusivo de drogas. Com o declínio da transmissão por transfusão sanguínea devido ao aprimoramento dos testes de

triagem, Haushofer *et al.* (2001) propuseram mudanças no padrão epidemiológico evidenciando a infecção pelos genótipos 3 e 4 como um problema crescente.

Os genótipos de VHC têm sido relacionados com a progressão da doença hepática assim como com a resposta ao tratamento constituindo, portanto, uma informação clinicamente valiosa (Zhou *et al.*, 1996). Além disso, sugere-se que a adaptação do VHC ao seu hospedeiro envolva um aumento seletivo do número de variantes virais. Recentemente, a análise filogenética usando seqüências da região 5'UTR de isolados do genótipo 1 do VHC no Uruguai, Chile, Brasil e Costa Rica revelou uma *quasispecie* diferente das encontradas nos principais subtipos (1a e 1b) indicando o aumento na diversidade viral nestas regiões (Cristina, 2005). Tais comprovações apenas reforçam a importância de estudos epidemio-moleculares que abordem a diversidade genética viral.

## 1.6. CINÉTICA VIRAL

A dificuldade de detecção do RNA e dos antígenos do VHC nos tecidos infectados levou à impressão errônea de que o vírus se replicava pouco *in vivo*. Atualmente, já se sabe que pacientes infectados cronicamente apresentam cargas virais (níveis de RNA viral plasmáticos) entre  $10^3$  e  $10^7$  genomas por mL de plasma. Modelos matemáticos de cinética viral realizados durante o tratamento de portadores do VHC com Interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) indicaram que os vírions apresentam uma meia-vida estimada de aproximadamente três horas e que cerca de  $10^{12}$  novos vírus são produzidos por dia (Neumann *et al.*, 1998).

Além dos estudos com pacientes infectados, a descoberta de que clones moleculares de VHC construídos em laboratório eram infecciosos a chimpanzés fez destes animais os principais modelos de estudo da dinâmica viral (Kolkhalov *et al.*, 1997; Yanagi *et al.*, 1997). Estes clones, entretanto, falharam em tentativas de replicação *in vitro* e um sistema eficaz de cultura celular do VHC representa um grande desafio para os cientistas (Lindenbach *et al.*, 2005; Appel *et al.*, 2006).

Modelos eficientes de replicação viral apenas foram possíveis até o momento utilizando mecanismos de engenharia genética como demonstrado por Lohmann *et al.*, em 1999. Neste estudo, os autores reportaram a replicação de unidades sub-genômicas de VHC denominadas *replicons* em culturas celulares. Tais *replicons* consistem de RNAs de VHC do subtipo 1b geneticamente modificados contendo um gene de

resistência à neomicina e um *IRE5* acoplado diretamente às regiões codificadoras das proteínas não estruturais, responsáveis pela replicação viral. Após a transfecção do *replicon* em células de linhagens de hepatoma humano (*Huh-7*) e com a adição de neomicina, colônias resistentes contendo RNA de VHC em replicação foram geradas (Lohmann *et al.*, 1999; Lindenbach *et al.*, 2005). Apesar do avanço alcançado com a introdução deste novo sistema de cultura, mutações adaptativas surgem frequentemente nos *replicons* e são requeridas para replicação dos mesmos. Estas mutações não ocorrem nos tipos selvagens e podem levar a conclusões errôneas sobre a dinâmica viral ou sobre a atividade de anti-virais (Bartosh e Cosset, 2006).

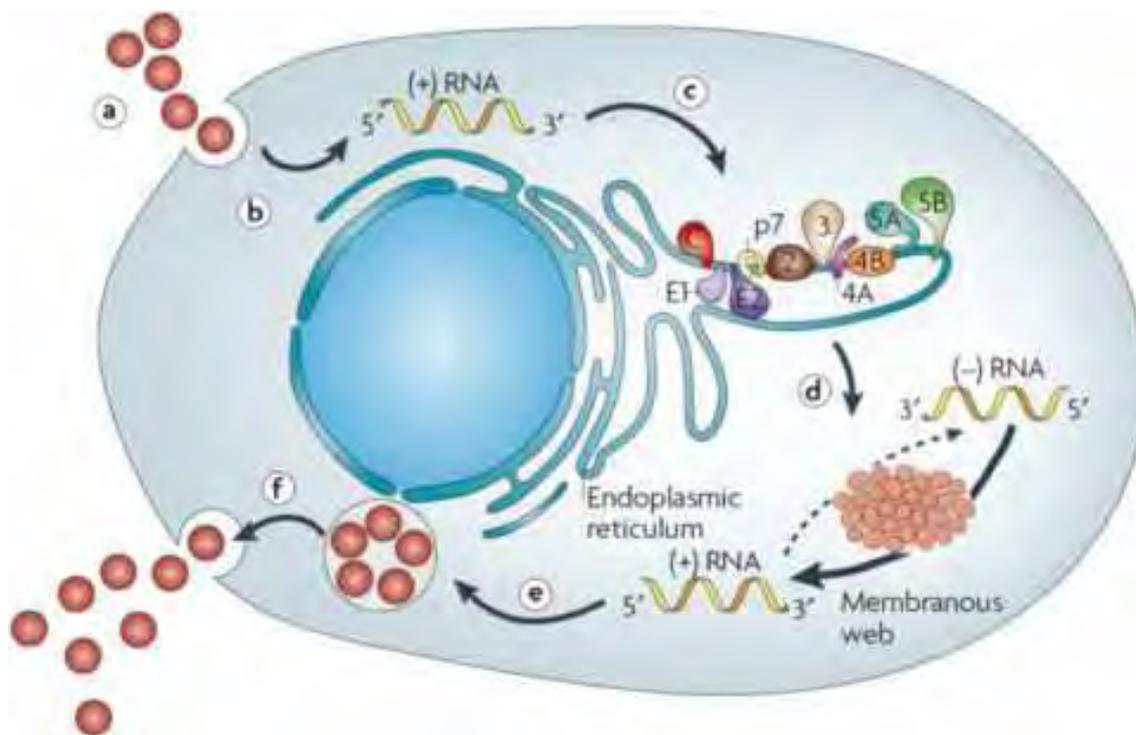
Kato *et al.*, em 2003, utilizando *replicons* sub-genômicos construídos a partir de um isolado viral de um paciente com hepatite fulminante no Japão (*JFH-1*) obtiveram sucesso em suas culturas celulares sem o aparecimento de mutações adaptativas requeridas para uma replicação eficiente nos *replicons* anteriormente relatados. Este mecanismo de replicação pode representar um potencial modelo de estudo da cinética viral, entretanto, estudos complementares ainda são necessários para uma maior compreensão deste sistema (Lindenbach *et al.*, 2005; Bartosh e Cosset, 2006).

### 1.7. MECANISMO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Em decorrência da falta de modelos eficientes de cultura do VHC, os mecanismos de interação do vírus com a célula hospedeira são pouco conhecidos (Penin *et al.*, 2004). Acredita-se que a internalização do VHC ocorra após a interação das glicoproteínas do envelope viral com receptores da célula hospedeira. A glicoproteína *E2* se liga com alta afinidade à tetraspanina CD81 expressa em uma variedade de tipos celulares, incluindo hepatócitos. De fato, há evidências da presença do VHC também em linfócitos, células do epitélio intestinal e sistema nervoso central. Embora não explique o hepatotropismo do VHC, o CD81 muito provavelmente está envolvido na mediação da entrada do vírus nas células. Após a fusão das membranas virais às celulares, o genoma do VHC seria liberado no citoplasma das células infectadas e atuaria como RNA mensageiro para tradução das proteínas virais. O RNA viral serviria também como molde para a replicação, além de mediar o empacotamento dos genomas nascentes para a produção de novos vírus (Lindenbach *et al.*, 2005).

Sugere-se que o vírus promova a ligação de suas proteínas não estruturais à membrana do retículo endoplasmático, formando um complexo de replicação. A RNA

polimerase dependente de RNA inicia, então, a replicação do RNA viral. A fita positiva do genoma é a fita molde para a produção de uma fita negativa intermediária utilizada para a produção de várias outras fitas. Os vírus são provavelmente montados dentro de vesículas do retículo endoplasmático e finalmente liberados por exocitose (Lindenbach *et al.*, 2005; Appel *et al.*, 2006; Moradpour *et al.*, 2007) (figura 8).



**Figura 8. Ciclo de vida do VHC.** a) ligação a receptores celulares e internalização do vírus b) liberação do RNA viral no citoplasma, c) tradução mediada pelo *IRES* e processamento da poliproteína precursora, d) replicação do RNA, e) montagem da partícula viral, f) maturação do vírion e liberação (Fonte: Moradpour *et al.*, 2007).

## 1.8. ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO

A infecção pelo vírus da hepatite C apresenta diferentes evoluções em cada paciente fazendo com que a necessidade de tratamento seja avaliada individualmente. Em geral, após uma fase aguda não perceptível, ocorre um período assintomático prolongado, sendo a infecção normalmente detectada em exames de rotina ou na triagem de doadores de sangue (Coelho, 2001).

A cirrose hepática ocorre em cerca de 20% dos casos, geralmente após 15 a 20 anos de infecção (Tong *et al.*, 1995; Seef, 1997; Corrao *et al.*, 1998). Nestes casos, a associação com outros vírus, o uso de álcool e a idade do indivíduo na época da

infecção são fatores importantes para a determinação da doença. O hepatocarcinoma surge em 1 a 4% dos casos de cirrose ao ano (Lauer e Walker, 2001).

O dano hepático que ocorre durante a infecção pelo VHC parece não ser provocado pelo efeito citotóxico do vírus, mas por distúrbios na apoptose das células infectadas. A via pró-apoptótica pode estar envolvida na lesão hepática enquanto que a inibição da apoptose pode ser responsável pela persistência viral (Kountouras *et al.*, 2003). Os mecanismos moleculares que ativam a apoptose nos hepatócitos ainda não são conhecidos, porém sugere-se que uma resposta celular envolvendo linfócitos T CD8+ citotóxicos esteja envolvida (Iken *et al.*, 2006). Os receptores de transplante hepático geralmente apresentam um período inicial favorável apesar dos altos índices de viremia próprios da imunossupressão e da infecção eficiente do enxerto. Estas observações reforçam a idéia de que o VHC não é citopático e que a doença é mediada imunologicamente (Lindenbach *et al.*, 2005).

Um longo período de hepatite crônica, com graus variados de fibrose, observados por biópsia hepática, antecede a evolução para a cirrose e constitui a principal fase de intervenção terapêutica (Poynard *et al.*, 1998). O tratamento visa à obtenção de uma resposta virológica sustentada (RVS) que corresponde à persistência de viremias indetectáveis seis meses após o tratamento (Zeuzem *et al.*, 2004). A terapia inicialmente utilizada para hepatite C crônica foi o Interferon alfa recombinante (IFN- $\alpha$ ) com eficácia limitada, entretanto, muitos conhecimentos que advieram deste período são utilizados até hoje (Davis e Lan, 1997). O reconhecimento de que a associação da Ribavirina (RBV) potencializava o efeito do IFN- $\alpha$  foi um importante passo para o tratamento da hepatite C crônica (Fried, 2002). Recentemente, desenvolveram-se formas modificadas de IFN- $\alpha$  (Interferon alfa peguilado) que associadas à RBV aumentaram significativamente a porcentagem de RVS (Zeuzem *et al.*, 2004).

A resposta ao tratamento é determinada por vários fatores dentre os quais se destacam as características imunológicas do hospedeiro e o genótipo viral. Sabe-se que a infecção pelo genótipo 1 do VHC determina menores índices de resposta virológica sustentada. A importância da determinação do genótipo para a conduta terapêutica foi enfatizada no Consenso Internacional sobre Hepatite C, realizado em 1999, no qual foi sugerido o estabelecimento da genotipagem do VHC e da biópsia hepática como parte da avaliação pré-tratamento. No mesmo Consenso, determinou-se que a combinação de Interferon alfa convencional e Ribavirina deveria ser a escolha para pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento. Estabeleceu-se ainda que a duração do

tratamento de infecções por genótipos não-1 do VHC deveria ser de seis meses enquanto que para pacientes infectados com o genótipo 1 este tempo poderia ser prolongado por até um ano (EASL, 1999).

No Brasil, os esquemas terapêuticos seguem a Portaria 34/SVS/MS em vigência no momento. Segundo esta portaria, o tratamento da hepatite C crônica está indicado para pacientes entre 12 e 70 anos de idade, portadores crônicos do VHC identificado por técnicas de biologia molecular, que tenham apresentado fibrose e atividade necro-inflamatória de moderadas a intensas evidenciadas por biópsia hepática e com contagem de plaquetas e neutrófilos acima de  $50.000/\text{mm}^3$  e  $1.500/\text{mm}^3$ , respectivamente. A publicação 34/SVS/MS preconiza ainda que pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento, portadores do genótipo 1 do VHC e com contagem de plaquetas acima de  $75.000/\text{mm}^3$  deverão receber a combinação interferon alfa peguilado e ribavirina por até 48 semanas segundo monitoramento da carga viral plasmática por metodologias moleculares quantitativas, enquanto que, aqueles infectados pelos genótipos não-1 do VHC deverão ser primeiramente tratados com Interferon alfa convencional associado à Ribavirina por 24 semanas (Brasil, 2007).

## 1.9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial específico da hepatite C é baseado em métodos imunológicos e em técnicas de biologia molecular. Os imunoenaios que pesquisam imunoglobulinas do tipo G contra o VHC são os mais frequentemente utilizados para detectar infecção presente ou passada pelo vírus. Os testes imunológicos normalmente empregados no diagnóstico da hepatite C são: o *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), de alta sensibilidade, usado na triagem da infecção e o *immunoblot*, de maior especificidade denominado suplementar (Brandão *et al.*, 2001).

Os imunoenaios do tipo *ELISA* são amplamente aplicados em todo o mundo devido à facilidade metodológica, ao custo reduzido e ao potencial de automação, entretanto, há risco significativo de ocorrência de resultados falso-negativos principalmente em decorrência dos períodos de janela imunológica (Pawlosky, 1999). Os primeiros ensaios do tipo *ELISA* desenvolvidos, chamados de *ELISA I* ou de primeira geração, empregavam apenas um epítipo do VHC para a pesquisa de anticorpos. Posteriormente foram desenvolvidos testes de segunda geração (*ELISA II*) que utilizavam uma combinação de dois epítipos virais (Lok e Guarantnan, 1997). Os

ensaios de segunda geração foram superiores aos anteriores principalmente devido à redução dos resultados falso-positivos o que representou um avanço principalmente com relação ao descarte desnecessário de bolsas em bancos de sangue. No entanto, a porcentagem destes resultados continuou relevante (Pawlosky, 1999).

Foi constatado que a utilização de partículas do *core* viral aumentava a eficiência dos ensaios imunoenzimáticos sendo, atualmente, empregadas em vários testes comerciais (Lopes *et al.*, 2000). Katayama *et al.*, em 1992, verificaram a maior sensibilidade de um teste do tipo *ELISA* que utilizava apenas um peptídeo sintético derivado da região estrutural do *core* viral (c22) com relação aos testes de primeira geração. Manzini *et al.* (1993), utilizando o mesmo peptídeo sintético, encontraram uma alta correlação de desempenho com imunoenaios de primeira e segunda gerações. Uma possível explicação para estes resultados é a de que os anticorpos dirigidos contra regiões estruturais apareçam mais precocemente e sejam mais persistentes que os anticorpos contra epítomos das regiões não estruturais do VHC, utilizados nos primeiros imunoenaios (Lopes *et al.*, 2000).

Nos testes *ELISA* de terceira geração (*ELISA III*) foi incluído o antígeno *NS5* do VHC. Houve um aumento acentuado da sensibilidade destes ensaios, porém este não foi atribuído à presença do *NS5*, mas sim à nova configuração dos antígenos já presentes no *ELISA II* (Brandão *et al.*, 2001). O *ELISA IV* contém frações antigênicas melhoradas do *core*, *NS3*, *NS4* e *NS5* do VHC (Gonçales e Junior, 2007).

Do *ELISA I* ao *ELISA IV* o aprimoramento metodológico e o aumento da sensibilidade dos ensaios foram notáveis. No entanto, em populações de baixo risco, tais como doadores de sangue, estes testes possuem baixo valor preditivo positivo gerando significativa porcentagem de resultados falso-positivos. Nestes casos são recomendados testes suplementares mais específicos (Gonçales e Junior, 2007).

Os testes suplementares mais utilizados são os baseados em *immunoblot*, dentre os quais o mais comercializado é o *RIBA* (*Chiron Corporation*). As modificações da configuração do *RIBA* foram surgindo concomitantemente as do *ELISA* (Brandão *et al.*, 2001). No *RIBA* incuba-se o soro do paciente com tiras de nitrocelulose nas quais estão imobilizados antígenos do VHC em bandas individuais. Quando não há reação com qualquer um desses antígenos o teste é considerado negativo. Nos casos em que há reação apenas com uma proteína viral, indeterminado. Já a reação com duas ou mais bandas determina a positividade do *RIBA* (Souto *et al.*, 2002; Brandão *et al.*, 2001).

Os testes baseados em *immunoblot* contêm os mesmos antígenos aplicados nos testes *ELISA* para o diagnóstico do VHC, porém os primeiros identificam anticorpos dirigidos contra antígenos individualmente, possuindo, desta forma uma especificidade maior (Brandão *et al.*, 2001). Em geral, as últimas gerações do *RIBA* têm sido utilizadas com êxito acentuado para diferenciar indivíduos com resultados falso-positivos pelo *ELISA* daqueles que necessitarão de investigações clínicas adicionais (Souto *et al.*, 2002). Damen *et al.* (1995), utilizando um *immunoblot* de terceira geração para doadores de sangue dos Estados Unidos, positivos para o *ELISA*, encontraram 40% de resultados falso-positivos. No Brasil, Souto *et al.* (2002), avaliando por *immunoblot* amostras de doadores de sangue com *ELISA* positivos quanto à presença de anticorpos anti-VHC, entre 1998 e 2000, encontraram 31,4% de resultados falso-positivos. Os trabalhos de Damen *et al.* (1995) e Souto *et al.* (2002) revelam a necessidade de incluir um teste suplementar nos estudos de soroprevalência principalmente em comunidades de baixo risco de infecção, como doadores de sangue.

Técnicas que empregam princípios da biologia molecular são consideradas como padrão ouro para a determinação da infecção pelo VHC. Os testes moleculares possibilitam a detecção qualitativa e quantitativa do RNA do vírus C além da determinação do genótipo e subtipos do mesmo. Os métodos baseados em biologia molecular são úteis para o diagnóstico na fase inicial da infecção, para pacientes imunossuprimidos e para o monitoramento da resposta terapêutica (Gretch *et al.*, 1997; Brandão *et al.*, 2001).

Dentre os métodos moleculares qualitativos, destaca-se a *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*, metodologia baseada na transcrição do RNA em DNA complementar (*cDNA*) seguida de amplificação de regiões alvo do genoma. Geralmente, os iniciadores (*primers*) utilizados nesta técnica flanqueiam a região 5'UTR do genoma viral, que é indicada por ser altamente conservada conforme estudo realizado por Okamoto *et al.*, em 1990. Outro método empregado na detecção qualitativa do RNA do VHC é a amplificação mediada por transcrição (*Transcription Mediated Amplification – TMA*) (Schiff *et al.*, 1999). Ambos os métodos constituem princípios de alguns testes disponíveis no mercado.

O nível de RNA do VHC no soro ou plasma do paciente (carga viral) reflete as taxas de replicação viral (Brandão *et al.*, 2001). O papel da carga viral na progressão da hepatite crônica ainda não está completamente esclarecido, entretanto, níveis mais elevados de RNA viral no plasma têm sido associados com um menor grau de resposta à

terapia com Interferon (Lau *et al.*, 1993). A avaliação quantitativa do RNA do VHC no soro ou plasma do paciente foi considerada parâmetro para conduta terapêutica (EASL, 1999). As técnicas de biologia molecular para a quantificação do RNA do vírus C mais utilizadas na rotina são baseadas em *RT-PCR* seguida de uma etapa de detecção por métodos colorimétricos e na tecnologia do DNA ramificado (*branched-DNA* ou *bdNA*) na qual ocorre amplificação de um sinal e não de uma seqüência alvo como na reação da polimerase em cadeia. O kit comercial *Amplicor HCV Monitor 2.0* (Roche Molecular Systems) é baseado em *RT-PCR* enquanto que o *Quantiplex HCV RNA 2.0* (Chiron Diagnostics), adota a tecnologia do *bdNA* (Brandão *et al.*, 2001).

Outras técnicas de quantificação do RNA do VHC estão sendo desenvolvidas sendo uma das mais promissoras a de *PCR* em tempo real. Esta metodologia tem se mostrado bastante sensível, permitindo a visualização em tempo real da cinética de amplificação e a diferenciação de um amplo espectro de cargas virais sem a necessidade de diluição das amostras (Takeuchi *et al.*, 1999). Já existem no mercado novos testes comerciais baseados na tecnologia em tempo real.

### 1.10. GENOTIPAGEM

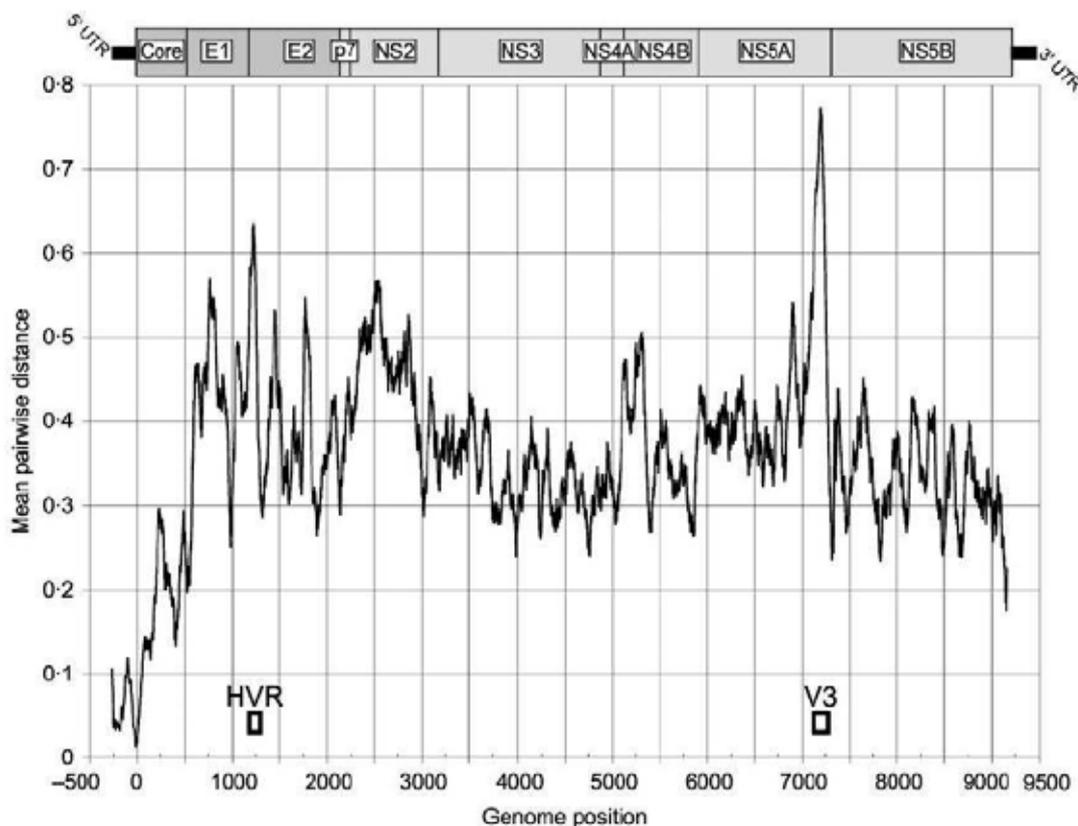
A identificação dos diferentes genótipos e subtipos do VHC tem sido útil para o entendimento da evolução da doença e da epidemiologia do vírus em relação a fatores de risco, além de possibilitar a determinação da fonte de surtos hospitalares tais como em unidades de hemodiálise e bancos de sangue (Sampietro *et al.*, 1995; Dienstag *et al.*, 1997).

O genótipo do VHC pode ser determinado diretamente por metodologias moleculares ou indiretamente por técnicas imunológicas em que o princípio básico da relação antígeno-anticorpo é utilizado para detectar imunoglobulinas contra epítomos virais genótipo-específicos (Schrotter *et al.*, 2000). Os testes deste tipo, que são comercializados unicamente para a pesquisa, omitem as pequenas variações das *quasispecies* circulantes e apresentam um desempenho limitado na avaliação de pacientes imunossuprimidos (Cavalheiro *et al.*, 2007). Os métodos moleculares de genotipagem requerem a amplificação inicial de uma região genômica viral por meio de *Polymerase Chain Reaction* (*PCR*). As técnicas baseadas em *PCR* incluem o sequenciamento dos fragmentos amplificados e análise direta da seqüência obtida, amplificação de regiões genômicas seguida de digestão com enzimas de restrição,

amplificação com iniciadores genótipos-específicos e hibridização do produto amplificado com sondas genótipo-específicas (Okamoto, 1992).

O padrão ouro na determinação dos genótipos e subtipos do VHC é a análise da seqüência genômica viral completa. No entanto, devido à maior praticidade e rapidez, outros procedimentos são normalmente adotados na rotina laboratorial. Tais procedimentos classificam o VHC por meio da análise de regiões tipo-específicas do genoma. A escolha da região a ser analisada, portanto, é crucial para uma genotipagem correta, pois a mesma deve conter domínios tipo-específicos e subtipo-específicos que reflitam a diversidade do genoma inteiro. Além de permitir a discriminação entre genótipos e subtipos, a seqüência deve ter conservação suficiente para o desenvolvimento de iniciadores e sondas sensíveis (Sandres-Sauné *et al.*, 2003).

A genotipagem do VHC pode examinar várias regiões do genoma tais como a 5'UTR, core, E e NS5B. Estudos filogenéticos das regiões core (Bukh *et al.*, 1994; Simmonds *et al.*, 1994), E1 (Bukh *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1994) e NS5 (Simmonds *et al.*, 1994) sugeriram que qualquer região do genoma poderia ser usada para a classificação genotípica do VHC (Chan *et al.*, 1992), apesar do nível de variabilidade diferir consideravelmente entre suas diferentes partes (figura 9). Estudos mais detalhados indicaram que a região NS5B seria a mais apropriada para a genotipagem (Stuyver *et al.*, 1994; Sandres-Sauné *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Representação da variabilidade genética do genoma do VHC relevando regiões conservadas como 5'UTR e core e a alta variabilidade de regiões como E1, E2 e NS5A (Fonte: Simmonds *et al.*, 2004).

A região mais usada pelos testes comerciais de genotipagem do VHC é a 5'UTR devido à facilidade de amplificação com iniciadores universais. A região 5'UTR é altamente conservada, porém apresenta variação suficiente para a identificação do genótipo viral (Stuyver *et al.*, 1994). No entanto, alguns autores (Van Doorn *et al.*, 1995; Ansaldi *et al.*, 2001; Chen e Weck, 2002; Sandres-Sauné *et al.*, 2003; Bouchardeau *et al.*, 2007) têm questionado a eficiência desta região quanto à genotipagem e, principalmente, quanto à subtipagem viral. Sandres-Sauné *et al.* (2003) sugeriram que a utilização de uma região adicional à 5'UTR, como a NS5B, tornaria a genotipagem do VHC mais confiável.

A genotipagem por hibridização reversa, distribuída sob o nome comercial de *Line Probe Assay (INNO-LiPA®)* (Siemens Medical Solutions Diagnostics), é largamente utilizada para a genotipagem do VHC no mundo todo. Este teste utiliza sondas específicas para diferentes partes do genoma viral imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose. Cada membrana contém uma sonda controle e sondas

específicas para a identificação dos genótipos e de alguns subtipos virais. O produto amplificado biotilado é colocado em contato com a membrana e esta é submetida a altas condições de estringência. Após a ligação do produto amplificado à membrana, a estreptavidina e um tampão alcalino são adicionados seguidos da adição de um cromógeno o que revela o resultado da reação por meio do aparecimento de bandas coloridas. A hibridização dos fragmentos amplificados com uma ou mais sondas das membranas permite a classificação dos 6 genótipos e seus subtipos mais comuns (Ansaldi *et al.*, 2001; Cavalheiro *et al.*, 2007) (figura 10).



**Figura 10. Representação do princípio de hibridização reversa utilizado para a genotipagem do VHC pelo kit comercial INNO-LiPA<sup>®</sup> (Fonte: <http://www.medscape.com>).**

Existem atualmente duas versões do *LiPA* (1.0 e 2.0). A primeira versão contém sondas para a região 5'UTR do genoma viral e a última, além destas, inclui sondas para a região genômica *core* do VHC permitindo uma maior precisão na determinação do genótipo 6 e uma melhor distinção entre os subtipos 1a e 1b. A região 5'UTR, por ser altamente conservada, não apresenta diversidade suficiente para distinção eficaz entre alguns subtipos (Cavalheiro *et al.*, 2007). A diferença entre os subtipos 1a e 1b, por exemplo, é de apenas um nucleotídeo na sequência desta região genômica (Bukh *et al.*, 1992; Bukh *et al.*, 1993). Vários estudos apontam a incapacidade de subtipagem do VHC por meio da análise da região 5'UTR particularmente quando se trata da distinção entre os subtipos 1a e 1b (Van Doorn *et al.*, 1995; Stuyver *et al.*, 1994; Chen e Weck, 2002; Nolte *et al.*, 2003; Espírito-Santo *et al.*, 2007). O kit *LiPA* 2.0 está em fase de

registro para distribuição no Brasil estando em vigor a genotipagem pela versão 1.0 (Cavalheiro *et al.*, 2007).

O seqüenciamento direto das regiões do genoma viral oferece informações mais completas sobre a variação das seqüências analisadas constituindo a ferramenta ideal para a determinação dos genótipos e subtipos do VHC além de permitir o estudo da variabilidade genética e a avaliação da dinâmica viral no contexto das *quasispecies* durante o tratamento (Chevaliez *et al.*, 2007).

O teste de genotipagem *TRUGENE<sup>®</sup> Siemens HCV 5'UTR Genotyping* é um teste comercial baseado em seqüenciamento direto da região 5'UTR do genoma do VHC. Este kit oferece um *software* dotado de uma biblioteca de seqüências da região genômica 5'UTR do vírus. Já os métodos *in house* de genotipagem por seqüenciamento utilizam os bancos de dados disponíveis para a avaliação dos genótipos e subtipos virais. O primeiro banco de seqüências de VHC circulantes foi criado no Japão por Mizokami *et al.* (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp/>), o segundo foi desenvolvido na União Européia por Eedeage *et al.* (<http://euhcv.do.fr/>) e o terceiro nos Estados Unidos por Kuiken *et al.* (<http://hcv.lanl.gov> ou <http://hcv-db.org>) (Kuiken *et al.*, 2006; Cavalheiro *et al.*, 2007). Dentro do site <http://www.bioafrica.net> também foi criado um banco de dados de seqüências do VHC (de Oliveira, 2006).

Recentemente, foram desenvolvidos testes de genotipagem de VHC baseados na tecnologia de *PCR* em tempo real utilizando sondas genótipo-específicas. Tais metodologias estão disponíveis para os centros de pesquisa e atualmente estão sendo avaliadas quanto ao desempenho na discriminação dos genótipos e subtipos virais (Lindh *et al.*, 2005).

Os métodos de genotipagem assim como a região do genoma viral a ser utilizada constituem temas de discussão na comunidade científica ressaltando a importância de trabalhos que avaliem comparativamente as metodologias em uso para a determinação dos genótipos e subtipos do vírus C.

## 2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo comparar as metodologias de hibridização reversa (kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0) e seqüenciamento direto das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *core* do genoma do VHC como ferramentas para a determinação dos genótipos e subtipos virais.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1. CASUÍSTICA

Neste trabalho, foram utilizadas 92 amostras de plasma de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP), com RNA do VHC detectado por *PCR* e genótipo determinado pelo kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0. Dentre as 92 amostras constituintes deste trabalho, 64 foram selecionadas aleatoriamente e 28 foram escolhidas segundo a genotipagem prévia realizada com o kit comercial. Estas 28 amostras e os respectivos genótipos determinados pelo *INNO-LiPA*<sup>®</sup> constam na tabela 1.

**Tabela 1. Número de amostras selecionadas segundo determinação genotípica prévia com o kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup>.**

<b>Genótipo</b>	<b>Nº de amostras</b>
1a/1b	10
inconclusivas	7
1	7
2	2
5	2
Total	28

Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Ofício nº166/08 – CEP) em 05 de maio de 2008.

#### 3.2. MÉTODOS

##### **3.2.1. Genotipagem pelo kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0 (*Siemens Medical Solutions Diagnostics*)**

A genotipagem pelo kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0 foi precedida das etapas de extração do RNA viral e *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* realizadas com o kit *Amplikor HCV Test (Siemens Medical Solutions Diagnostics)* de acordo com as especificações do fabricante. O produto resultante destas etapas iniciais

foi submetido à genotipagem pelo kit comercial. Para tanto, o produto amplificado foi colocado, juntamente com um tampão de hibridização, em contato com tiras de nitrocelulose contendo sondas específicas para os genótipos do VHC segundo as condições especificadas pelo fabricante.

### **3.2.2. Genotipagem baseada em seqüenciamento direto**

#### **3.2.2.1. Extração do RNA Viral**

A extração do RNA viral a partir do plasma foi realizada utilizando o *QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)* segundo as especificações do fabricante.

#### **3.2.2.2. Transcrição reversa**

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *High Capacity (Applied Biosystem)* em reação de 50µL contendo tampão de reação 2X, oligonucleotídeos randômicos 2X, 0,5mM de dNTPs, 250 unidades (U) da enzima *MultiScribe* e cerca de 0,5µg de RNA. Esta reação foi submetida à 25°C por 5 minutos e, em seguida, à 37°C por 120 minutos.

#### **3.2.2.3. Nested-PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Para todas as amostras foram realizadas amplificações por *Nested-PCR (Polymerase Chain Reaction)* das regiões *5'UTR* e *NS5B*. Nos casos em que ocorreram falhas de amplificação para a região *NS5B* foi feita a *PCR* de um fragmento que abrange o final da região *5'UTR* e cerca de 380 pares de base (pb) do *core* do genoma do VHC. As regiões genômicas *5'UTR*, *5'UTR-core* e *NS5B* foram amplificadas por *Nested-PCR* utilizando os *primers* especificados no quadro 1.

**Quadro 1. Lista de primers utilizados para a reação de amplificação das regiões 5'UTR, 5'UTR -core e NS5B do VHC.**

Primer	Seqüência (5' → 3')	Posição*	Região	Referência
PTC1	CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC	81-100	5'UTR	Garson <i>et al.</i> , 1990
NCR2	ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT	323-351	5'UTR	Garson <i>et al.</i> , 1990
PTC3	AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG	99-118	5'UTR	Garson <i>et al.</i> , 1990
NCR4	CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT	288-313	5'UTR	Garson <i>et al.</i> , 1990
242	GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA	8616-8645	NS5B	Enomoto <i>et al.</i> , 1990
243	TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A	8245-8275	NS5B	Enomoto <i>et al.</i> , 1990
PR3	TAT GAY ACC AGC TGY TTT GAC TC	8256-8278	NS5B	Sandres-Sauné <i>et al.</i> , 2003
PR4	GCN GAR TAY CTV GTC ATA GCC TC	8622-8644	NS5B	Sandres-Sauné <i>et al.</i> , 2003
PR5	GCT AGT CAT AGC CTC CGT	8619-8636	NS5B	Sandres-Sauné <i>et al.</i> , 2003
Q1	ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG	288-311	5'UTR-core	Verma e Chakravarti, 2008
AQ1	ATG TAC CCC ATG AKR TCG GC	732-751	5'UTR-core	Verma e Chakravarti, 2008
Q2	AGG TCT CGT AGA CCG TGC ATC ATG	321-339	5'UTR-core	Verma e Chakravarti, 2008
AQ2	CAY GTR AGG GTA TCG ATG AC	707-723	5'UTR-core	Verma e Chakravarti, 2008

Y= T ou C; K= T ou G; R= A ou G; V= A, G ou C; N= A, T, C ou G

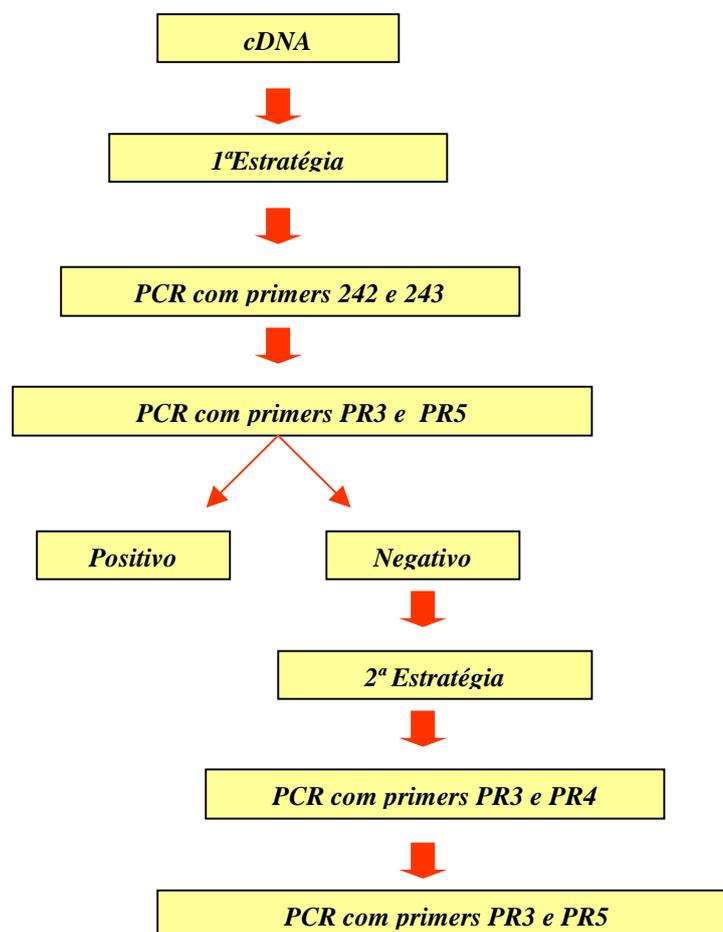
\* Posição de acordo com a seqüência HCV-1 (nº de acesso no GenBank: M62321)

A primeira reação de amplificação da região 5'UTR foi realizada em um volume de 50µL contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM), 0,4mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM dos primers PTC1 e NCR2, 1,5U de *Taq Recomb DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies)* e cerca de 250ng de DNA complementar (*cDNA*). A segunda reação de PCR continha tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM), 0,4mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM dos primers PTC3 e NCR4, 1,5U de *Taq Recomb DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies)* e 5µL do produto amplificado na etapa anterior. O volume final da reação também foi de 50µL. Ambas as reações foram submetidas à 94°C por 1 minuto, 25 ciclos de 94°C por 55 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Foram utilizadas duas estratégias de amplificação da região NS5B (figura 11). Na primeira estratégia, 0,4µM de cada um dos primers (242 e 243), tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM), 0,2mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de *Taq*

*Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies)* e aproximadamente 250ng de *cDNA* totalizaram um volume de 50 $\mu$ L. As condições de ciclagem foram: 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos seguidos de uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Na segunda estratégia de amplificação, 0,4 $\mu$ M de cada um dos *primers* (PR3 e PR4), tampão de *PCR* 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM), 0,2mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de *Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies)* e cerca de 250ng *cDNA* totalizaram um volume de 50 $\mu$ L. Esta reação foi submetida à ciclagem: 94°C por 1 minuto; 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos com -0,3°C/ciclo e 72°C por 40 segundos; 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos; 72°C por 5 minutos.

A segunda reação de *PCR* de ambas as estratégias foi realizada em um volume de 50 $\mu$ L contendo tampão de *PCR* 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM) 0,4 $\mu$ M de cada um dos *primers* (PR3 e PR5), 0,2mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5U de *Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies)* e 5 $\mu$ L do produto amplificado. A ciclagem utilizada foi: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos.



**Figura 11. Fluxograma de amplificação da região NS5B do genoma do VHC.**

A primeira reação de amplificação da região 5'UTR-core foi conduzida em um volume de 20µL contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM), 0,5mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM dos primers Q1 e AQ1, 0,75U de *Taq Recomb DNA Polymerase* (Invitrogen, Life Technologies) e aproximadamente 250ng de cDNA. A segunda reação de PCR foi realizada em um volume de 40µL contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM), 0,25mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM dos primers Q2 e AQ2, 1,5U de *Taq Recomb DNA Polymerase* (Invitrogen, Life Technologies) e 5,0µL do produto amplificado na etapa anterior. Ambas as reações foram submetidas à 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

#### **3.2.2.4. Eletroforese em gel de agarose a 2%**

Os resultados das reações de *Nested-PCR* foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% com 0,25ng/μL de brometo de etídio, a 100V por 30 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A revelação foi feita por exposição do gel à luz ultra-violeta (UV) sendo consideradas positivas para *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* respectivamente as amostras que exibiram bandas de aproximadamente 214, 390 e 402 pares de base (pb) com base no marcador de peso molecular *DNA Ladder 100pb* da *LGC Biotecnologia (LGC)*.

#### **3.2.2.5. Purificação do produto amplificado**

O produto amplificado nas reações especificadas anteriormente foi purificado utilizando o kit *Charge Switch – PCR Clean Up (Invitrogen, Life Technologies)* segundo especificações do fabricante.

#### **3.2.2.6. Quantificação do produto amplificado purificado**

O produto amplificado purificado foi quantificado em gel de agarose a 2% utilizando-se o *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Life Technologies)*.

#### **3.2.2.7. Reação de Marcação Fluorescente**

A reação de marcação fluorescente foi realizada em placa utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems)* totalizando um volume de 20μL contendo 0,5μM de um *primers (forward ou reverse)* de cada região genômica amplificada, 4μL do *Ready Reaction Premix (ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing v3.1)* e cerca de 20ng de produto amplificado. Para cada região genômica viral amplificada foram efetuadas duas reações uma contendo o *primer forward* e outra contendo o *primer reverse*. A ciclagem utilizada foi: 96°C por 5 minutos; 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

### 3.2.2.8. *Precipitação*

Finalizada a reação de marcação fluorescente, procedeu-se a etapa de precipitação realizada para purificação do produto retirando os reagentes não incorporados. Ao produto da reação, foram adicionados 80µL de isopropanol 75% (*Merck S.A.*) e aguardou-se 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, esta mistura foi centrifugada à 1700g por 45 minutos à 25°C. Concluída esta fase, o isopropanol foi removido e foram adicionados 130µL de etanol 70%. Centrifugou-se a mistura à 1700g por 15 minutos à 25°C. Ao final, o etanol foi totalmente removido. Uma incubação final de 2 minutos à 94°C foi efetuada para evaporação do etanol residual.

### 3.2.2.9. *Desnaturação do DNA e eletroforese em seqüenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems)*

Após a etapa de precipitação, o DNA foi desnaturado adicionando-se 2µL de uma mistura contendo 5 partes de formamida desionizada *Hi-Fi ABI (Applied Biosystem)* para 1 do tampão de carregamento *blue dextran (Applied Biosystem)* e submetendo-o à 94°C por 3 minutos.

A eletroforese foi conduzida no aparelho *ABI Prism 377 (Applied Biosystems)* utilizando gel de poliacrilamida desnaturante 6% preparado com o *Long Ranger Singel Packs (Lonza RockLand, Inc., USA)* segundo especificações do fabricante. A duração da eletroforese foi de 210 minutos para a região *5'UTR* e de 7 horas para as regiões *NS5B e 5'UTR-core*. Os parâmetros utilizados na corrida eletroforética e na análise dos dados resultantes obedeceram às orientações do fabricante.

### 3.2.2.10. *Análise dos dados*

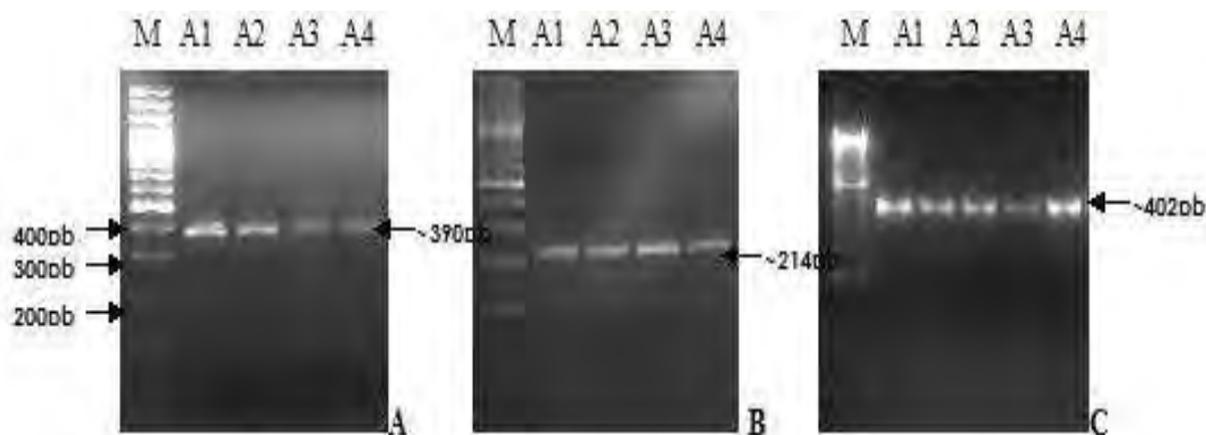
A qualidade dos cromatogramas foi avaliada com o *software Phred (Ewing et al., 1998; Ewing et al., 1998a)*. Para a validação dos cromatogramas foi utilizado o escore de 20. As seqüências de boa qualidade obtidas com os *primers forward e reverse* foram posteriormente analisadas por meio do *software BioEdit (Hall et al., 1999)* com a finalidade de construir manualmente uma seqüência consenso. As seqüências consenso

resultantes foram então genotipadas pelo *HCV-Blast* disponível no banco de dados *The Los Alamos HCV Sequence* (<http://hcv.lanl.gov>) (Kuiken *et al.*, 2005). Em alguns casos, foi realizado o alinhamento múltiplo manual com seqüências referência de VHC disponíveis no banco de dados *The Los Alamos HCV Sequence* utilizando os softwares *ClustalW* (Higgins *et al.*, 1996) e *MEGA 4.1*. (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. RESULTADOS DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Os resultados das reações de amplificação das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* do genoma viral foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio. Foram consideradas positivas para *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core*, respectivamente, as amostras que exibiram bandas de aproximadamente 214, 390 e 402 pares de base (pb) com base no marcador de peso molecular *DNA Ladder 100pb LGC Biotecnologia (LGC)* como mostra a figura a seguir.



**Figura 12.** Análise da eletroforese em gel de agarose 2% das regiões *NS5B* (A), *5'UTR* (B) e *5'UTR-core* (C). M= Marcador de peso molecular *DNA Ladder 100pb LGC Biotecnologia (LGC)*; A1-A4= amostras 1 a 4.

Todas as amostras puderam ser amplificadas para a região *5'UTR*. Quanto à região *NS5B* houve sucesso na amplificação de 62 das 92 amostras constituintes deste estudo. Para as 30 amostras que não puderam ser amplificadas para *NS5B* foi realizada a amplificação de um fragmento que abrange o final da região *5'UTR* e cerca de 380pb do *core* do genoma do VHC. A região *5'UTR-core* mostrou-se eficiente na amplificação de 28 (93%) das amostras que falharam para *NS5B* (tabela 2).

**Tabela 2. Resultados das reações de amplificação das regiões genômicas 5'UTR e NS5B do VHC para as 92 amostras do estudo e da região 5'UTR-core para as 30 amostras que mostraram insucesso de amplificação para região NS5B.**

<b>Resultado da amplificação</b>	<b>5'UTR</b>	<b>NS5B</b>	<b>5'UTR-core</b>
Positivo	92	62	28
Negativo	-	30	2
Total	92	92	30

As regiões genômicas consideradas ideais para a genotipagem do VHC, por apresentarem maior diversidade genética, são *E1*, *NS4* e *NS5*, entretanto, nem sempre a amplificação destas regiões é possível devido à perda de conservação dos sítios de ligação dos *primers* (Verma e Chakravarti, 2008) A região *core* é relativamente bem conservada com similaridade de nucleotídeos de 81 a 88% entre os genótipos. No entanto, esta região contém informação suficiente para a genotipagem sendo também eficiente na identificação de vários subtipos (Simmonds *et al.*, 1994). Os *primers* degenerados para a região 5'UTR-core, descritos por Verma e Chakravarti (2008) e utilizados neste estudo, foram desenhados com o intuito de selecionar uma região genômica mais informativa que a 5'UTR e ao mesmo tempo desenvolver uma técnica sensível e otimizada para a rotina diagnóstica na virologia.

#### **4.2. GENOTIPAGEM**

Das 92 amostras componentes deste trabalho, sete foram genotipadas como 1, dezoito como 1a, trinta como 1b, dez como 1a/1b, duas como 2, dezesseis como 3a, duas como 5 e sete foram inconclusivas pela a metodologia de hibridização reversa realizada com o kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0. A genotipagem por seqüenciamento da região 5'UTR resultou em: vinte e oito amostras genotipadas como 1a, quarenta como 1b, duas como 1a/1b, duas como 2a/2c, uma como 2b e dezenove como 3a. Das 62 amostras que puderam ser genotipadas pelo seqüenciamento da região *NS5B*, dezesseis tiveram seus genótipos determinados como 1a, trinta e um como 1b, uma como 2b, duas como 2c e

doze como 3a. Dentre as 28 amostras que foram amplificadas para a região 5'UTR-core, quinze foram genotipadas como 1a, seis do genótipo 1b, seis do genótipo 3a e uma amostra não pôde ser determinada conclusivamente mostrando domínios característicos dos genótipos 5 e 1b (tabela 3).

**Tabela 3. Genótipos e subtipos determinados pelas metodologias de hibridização reversa (INNO-LiPA®) e seqüenciamento direto das regiões 5'UTR, NS5B e 5'UTR-core.**

Genótipo	INNO-LiPA®	Seqüenciamento Direto		
		5'UTR	NS5B	5'UTR-core
1	7	-	-	-
1a	18	28	16	15
1b	30	40	31	6
1a/1b	10	2	-	-
2	2	-	-	-
2a/2c	-	2	-	-
2b	-	1	1	-
2c	-	-	2	-
3a	16	19	12	6
5	2	-	-	-
5/1b	-	-	-	1
inconclusivo	7	-	-	-
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>92</b>	<b>62</b>	<b>28</b>

A concordância na determinação dos genótipos entre o INNO-LiPA® v. 1.0 e o seqüenciamento direto foi de 97,65% para a região 5'UTR, 90,47% para 5'UTR-core e 100% para NS5B. Já com relação à determinação dos subtipos virais 78,66% dos resultados da genotipagem por seqüenciamento direto da região 5'UTR foram concordantes com o LiPA®, 55% dos resultados da genotipagem por seqüenciamento da região 5'UTR-core concordaram com a subtipagem do kit comercial e 81,03% das amostras subtipadas por seqüenciamento da região NS5B tiveram resultados concordantes com a hibridização reversa.

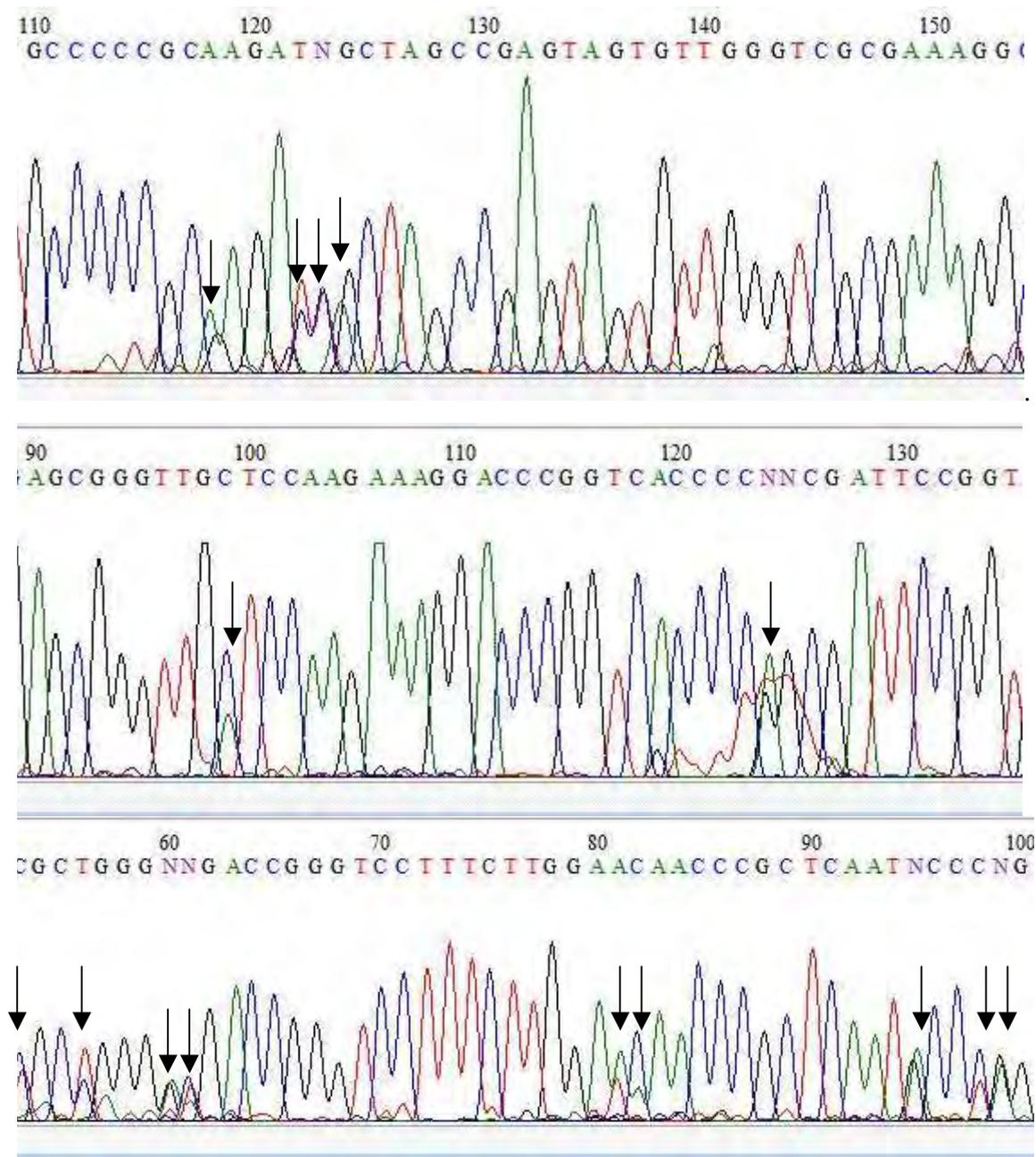
**4.2.1. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras consideradas inconclusivas pela genotipagem com o kit INNO-LiPA® v.1.0**

Sete amostras, que tiveram resultados inconclusivos pela metodologia de hibridização reversa (*INNO-LiPA v.1.0*), foram genotipadas por seqüenciamento direto das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* do genoma viral. Os resultados inconclusivos pelo *INNO-LiPA* puderam ser solucionados em 100% dos casos. Uma amostra foi determinada como 1b, uma como 1a/1b, três amostras como 3a, uma como 1a e uma como 2b por seqüenciamento direto da região *5'UTR*. Cinco destas amostras também puderam ser genotipadas pelo seqüenciamento de uma segunda região do genoma viral (*NS5B* ou *5'UTR-core*) confirmando os resultados obtidos com o seqüenciamento da região *5'UTR* com relação à determinação genotípica (quadro 2). Com relação à subtipagem, entretanto, uma amostra subtipada como 1a/1b pela região *5'UTR* foi determinada como 1b pelo seqüenciamento da região *5'UTR-core*, discrepância que será abordada mais adiante neste trabalho.

**Quadro 2. Genótipos determinados pela metodologia de seqüenciamento direto das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* para amostras com resultados inconclusivos pela genotipagem por hibridização reversa (*INNO-LiPA® v.1.0*).**

Amostras	<i>INNO-LiPA®</i>	<i>5'UTR</i>	<i>NS5B ou 5'UTR-core</i>
062	-	1a/1b	1b
078	-	2b	2b
091	-	3a	3a
105	-	1b	1b
196	-	3a	3a
278	-	3a	-
305	-	1a	-

Stuyver *et al.*, (1994) propuseram que a eficiência da hibridização reversa seria limitada nos casos de amostras com grande número de variantes virais pois haveria necessidade de condições muito elevadas de estringência (Ansaldi *et al.*, 2001). No presente estudo três das amostras listadas acima exibiram sobreposição de picos em algumas posições da seqüência de nucleotídeos da região *5'UTR* o que provavelmente significa a presença de variantes virais (figura 13).



**Figura 13.** Cromatogramas de seqüências da região genômica 5'UTR do VHC obtidos de amostras com resultados inconclusivos pela genotipagem com o kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup>. As seqüências exibem sobreposição de picos em algumas posições (indicadas pela setas).

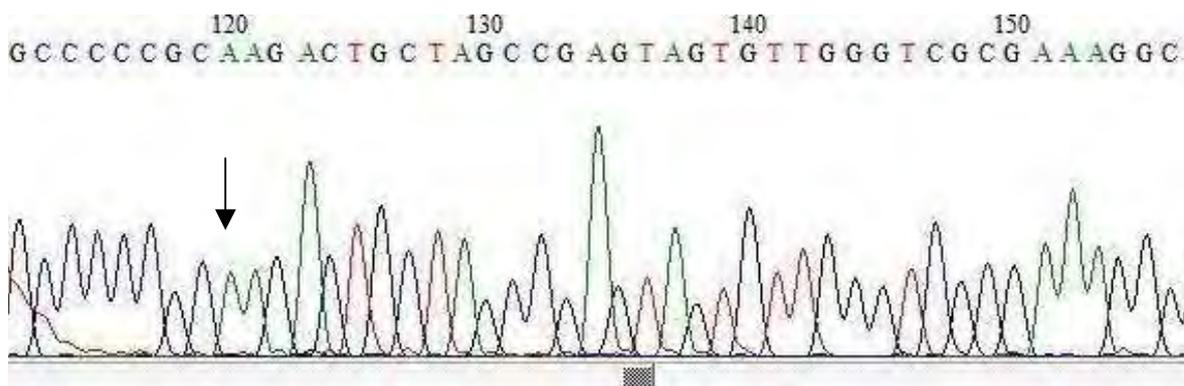
Os resultados considerados inconclusivos para o *INNO-LiPA*<sup>®</sup> são aqueles que apresentaram padrão inconclusivo de bandas ou que não exibiram bandas na membrana de nitrocelulose após a reação de hibridização reversa. No último caso, o seqüenciamento direto pode ter sido mais sensível que a hibridização reversa. Os métodos de genotipagem baseados em hibridização com sondas genótipo-específicas

assim como aqueles baseados em restrição com enzimas específicas podem falhar quando há uma concentração menor do fragmento alvo (Giannini *et al.*, 1999). Futuramente, este fato poderia ser avaliado realizando uma comparação entre a sensibilidade dos métodos de seqüenciamento direto e hibridização reversa por meio de experimentos que utilizem amostras com diferentes cargas virais (baixas, médias e altas) determinadas por métodos moleculares quantitativos.

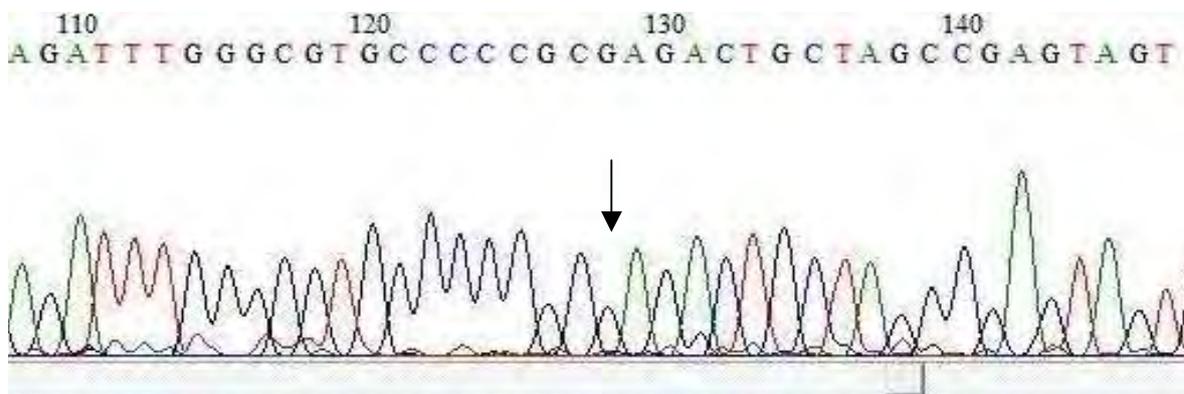
A portaria 34/SVS/MS (Brasil, 2007), em vigência no Brasil, omite a decisão terapêutica que deve ser conduzida nos casos de genotipagem inconclusiva.

#### ***4.2.2. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras classificadas como 1a/1b pela genotipagem com o kit INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0***

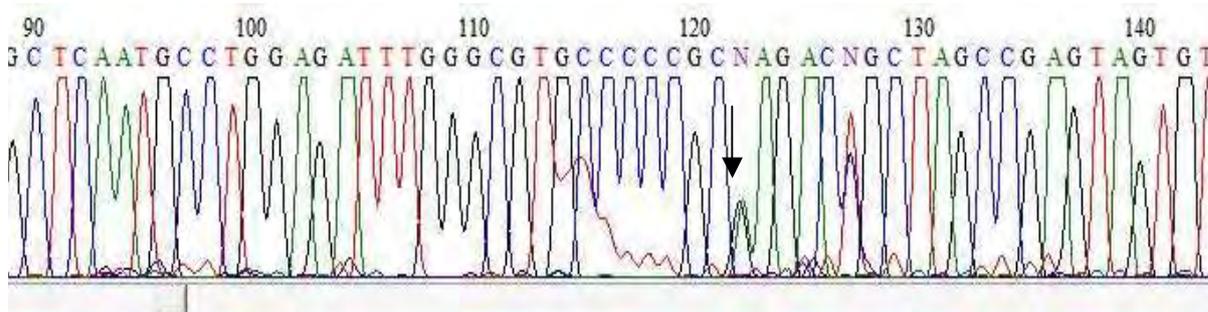
Para avaliar possibilidade de mistura dos subtipos 1a e 1b determinada pelo *INNO-LiPA<sup>®</sup>* em dez amostras verificou-se a eficiência da posição 243 de 5'UTR, única posição que difere entre estes subtipos nesta região. A determinação de uma amostra como 1a baseia-se na presença de uma adenina (A) na posição 243 enquanto que a presença de uma guanina (G) determinaria o subtipo 1b (Stuyver *et al.*, 1993). Foram utilizadas, em paralelo, as genotipagens por uma segunda região, mais informativa que a 5'UTR. Por meio da análise da posição 243 de 5'UTR, seis amostras foram classificadas como 1a, ou seja apresentaram uma adenina nesta posição (figura 14), três como 1b, exibindo, portanto, uma guanina (figura 15) e uma apresentou sobreposição dos picos de adenina e guanina, o que caracterizaria uma mistura 1a/1b, como mostra a figura 16.



**Figura 14.** Cromatograma da seqüência da região genômica 5'UTR do VHC de uma amostra classificada como 1a/1b pela genotipagem com o *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0. A seqüência exibe um pico de adenina (A – cor verde), na posição 243 (indicada pela seta) da região 5'UTR.



**Figura 15.** Cromatograma da seqüência da região genômica 5'UTR do VHC de uma amostra classificada como 1a/1b pela genotipagem com o *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0. A seqüência exibe um pico de guanina (G – cor preta) na posição 243 (indicada pela seta) da região 5'UTR.



**Figura 16.** Cromatograma de seqüência exibindo sobreposição de picos de adenina e guanina na posição 243 da região genômica 5'UTR do VHC de uma amostra previamente classificada como 1a/1b pela genotipagem pelo kit comercial *INNO-LiPA* v.1.0.

As amostras classificadas como 1a/1b pelo *INNO-LiPA*<sup>®</sup> não puderam ser amplificadas para a região *NS5B*. Para estas amostras utilizou-se a genotipagem por seqüenciamento da região *5'UTR-core*. A região *core* do genoma do VHC diverge em 17 nucleotídeos entre os subtipos 1a e 1b sendo, portanto, bem mais informativa que a região *5'UTR* (Le Pogam *et al.*, 1998). Neste trabalho, a região *5'UTR-core* foi eficaz na discriminação dos subtipos 1a e 1b corroborando os resultados obtidos por Verma e Chakravarti (2008) que puderam diferenciar os subtipos 1a e 1b além de identificar o subtipo 1c, o que não é possível utilizando somente a região *5'UTR*.

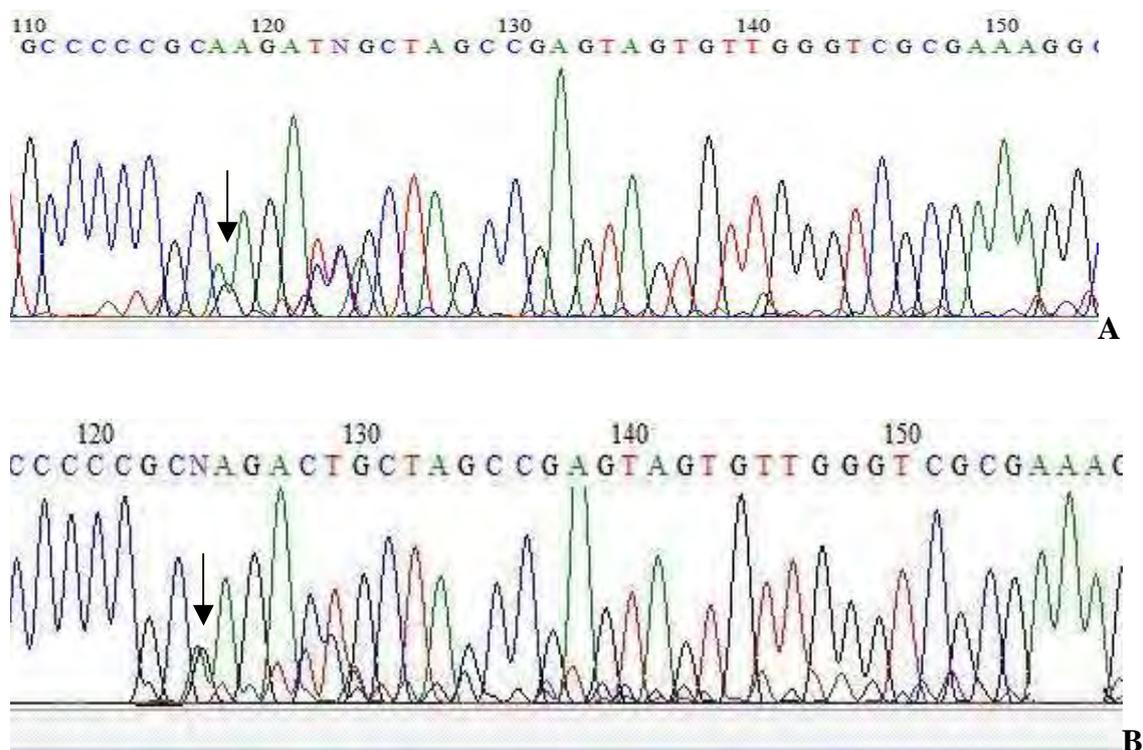
A subtipagem pela região *5'UTR-core* confirmou os resultados da análise da posição 243 de *5'UTR* para sete amostras divergindo em relação a duas amostras subtipadas como 1b por *5'UTR* que foram subtipadas como 1a por *5'UTR-core* e uma amostra subtipada como 1a/1b, caracterizada como 1a por *5'UTR-core* (quadro 3). Existe a possibilidade de que a metodologia de seqüenciamento direto não tenha detectado as misturas de subtipos. No entanto, também é possível que variantes virais estejam presentes nestas amostras influenciando os resultados da hibridização reversa.

**Quadro 3. Genótipos determinados pela metodologia de seqüenciamento direto das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* para amostras classificadas como 1a/1b pela genotipagem por hibridização reversa (*INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0).**

Amostra	<i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup>	<i>5'UTR</i>	<i>5'UTR-core</i>
06	1a/1b	1b	1a
029	1a/1b	1a	1a
048	1a/1b	1a	1a
097	1a/1b	1a	1a
163	1a/1b	1b	1a
263	1a/1b	1a	1a
281	1a/1b	1b	1b
284	1a/1b	1a	1a
285	1a/1b	1a/1b	1a
398	1a/1b	1a	1a

#### 4.2.3. Discrepâncias entre os resultados quanto à determinação dos subtipos 1a e 1b

Além da amostra 285 (referida no quadro 3), a amostra 062, já mencionada anteriormente, com resultado inconclusivo pelo *LiPA*<sup>®</sup> (quadro 2) e uma terceira amostra (390) genotipada apenas como 1 pelo kit comercial exibiram sobreposições dos picos de adenina e guanina na posição 243 da região 5'UTR (figura 17) sendo, portanto, classificadas como 1a/1b. A análise da região 5'UTR-core para tais amostras resultou nos subtipos 1b (amostra 062) e 1a (amostra 390) (quadro 4).



**Figura 17. Cromatogramas exibindo sobreposições de picos de adenina e guanina na posição 243 da região 5'UTR do genoma do VHC. A= Cromatograma da seqüência de uma amostra com resultado inconclusivo pela genotipagem por meio do kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0. B= Cromatograma da seqüência de uma amostra previamente classificada como 1 pela genotipagem por meio do kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0.**

Bukh *et al.*, (1992) e Bukh *et al.*, (1993) reportaram a existência de isolados 1b que continham uma adenina na posição 243 de 5'UTR. Além das discrepâncias já relatadas até o momento neste trabalho, cinco amostras genotipadas como 1b utilizando seqüenciamento da região *NS5B* apresentaram uma adenina na posição 243 de 5'UTR e seis amostras subtipadas como 1a por meio das regiões *NS5B* ou 5'UTR-core apresentaram uma guanina na posição 243 de 5'UTR (quadro 4). Tais discrepâncias mostram que a posição 243 de 5'UTR não foi eficaz como critério para a discriminação entre os subtipos 1a e 1b corroborando trabalhos publicados na literatura científica (Bukh *et al.*, 1992; Bukh *et al.*, 1993; Chen e Weck, 2002). Da mesma forma, sendo o *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0 uma metodologia baseada na região 5'UTR, ocorreram algumas subtipagens errôneas: três amostras classificadas como 1a por *NS5B* foram subtipadas como 1b pelo *LiPA* e sete amostras subtipadas como 1b por *NS5B* foram classificadas como 1a pelo *LiPA* (quadro 4).

**Quadro 4. Subtipos discrepantes entre as metodologias de seqüenciamento direto e hibridização reversa (*INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0) e/ou com resultados discrepantes entre o seqüenciamento das regiões 5'UTR e *NS5B* ou 5'UTR-core.**

Amostra	<i>INNO-LiPA</i> <sup>®</sup>	5'UTR	<i>NS5B/ 5'UTR-core</i>
003	1a	1b	1a
010	1b	1a	1a
014	1a	1b	1a
033	1a	1b	1b
038	1a	1a	1b
046	1a	1b	1a
062	inconclusivo	1a/1b	1b
120	1a	1a	1b
203	1b	1b	1a
206	1a	1a	1b
209	1a	1a	1b
217	1a	1b	1b
231	1a	1b	1a
352	1a	1a	1b
390	1	1a/1b	1a
01A	1b	1b	1a

Segundo a portaria 34/SVS/MS (Brasil, 2007), não existem conseqüências com relação à conduta terapêutica desta subtipagem cruzada uma vez que ambos os subtipos são tratados da mesma forma, entretanto, vários trabalhos de teor epidemiológico têm utilizado a região 5'UTR para a subtipagem do VHC o que pode refletir em dados irreais de prevalência destes subtipos.

#### **4.2.4. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras classificadas como 2 e 3 pela genotipagem com o kit INNO-LiPA® v.1.0**

Dezesseis amostras foram genotipadas como 3a, pelo INNO-LiPA® v.1.0. A genotipagem por seqüenciamento direto das regiões genômicas virais utilizadas neste estudo foi concordante para 100% destas amostras. Duas amostras foram classificadas como 2 por meio da genotipagem com o kit comercial. Para tais amostras, a genotipagem realizada por seqüenciamento direto da região 5'UTR não foi totalmente conclusiva entre os subtipos 2a e 2c já que as seqüências da região 5'UTR são idênticas para ambos os subtipos (Le Pogam *et al.*,1998). A genotipagem realizada por seqüenciamento direto da região NS5B pôde subtipar conclusivamente as amostras como 2c (quadro 5).

#### **Quadro 5. Genótipos determinados pela metodologia de seqüenciamento direto das regiões 5'UTR e NS5B para amostras classificadas como 2 pela genotipagem por hibridização reversa (INNO-LiPA® v.1.0).**

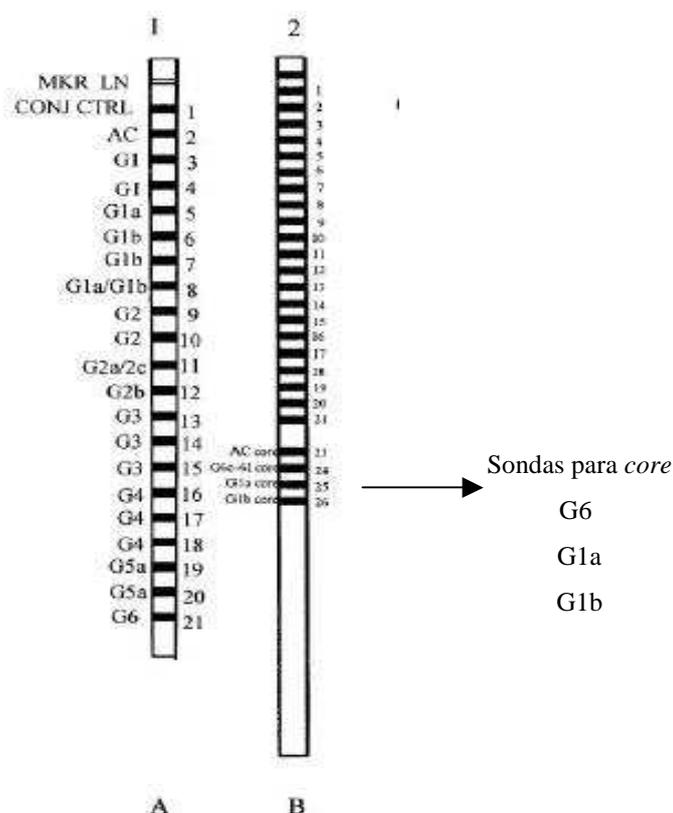
<b>Amostras</b>	<b>INNO-LiPA®</b>	<b>5'UTR</b>	<b>NS5B</b>
127	2	2a/2c	2c
140	2	2a/2c	2c

#### **4.2.5. Resultados da genotipagem por seqüenciamento direto das amostras classificadas como 5 pela genotipagem com o kit INNO-LiPA® v.1.0**

Dois dos pacientes componentes deste estudo revelaram estar infectados pelo genótipo 5 do VHC segundo a genotipagem pelo kit comercial INNO-LiPA®. O genótipo 5 é raramente encontrado fora da África do Sul, mas já foi descrito nos Estados Unidos, Canadá, Bélgica, Holanda, Arábia Saudita e recentemente no Brasil (Levi *et al.*,

2002). Levi *et al.*, em 2002, relataram a ocorrência deste genótipo em 3 pacientes brasileiros não relacionados epidemiologicamente com a África do Sul mantendo obscura a provável fonte de infecção.

Dentre as amostras dos dois pacientes relatados no presente trabalho, uma foi genotipada como 1b por sequenciamento direto das regiões 5'UTR e 5'UTR-core. Todos os testes foram realizados novamente e os resultados discrepantes foram confirmados. Tais resultados são importantes não apenas pela questão epidemiológica, mas principalmente pela definição da conduta terapêutica já que o paciente deveria receber o Interferon alfa peguilado por estar infectado pelo genótipo 1 e provavelmente recebeu Interferon alfa convencional baseado na determinação realizada pelo *INNO-LiPA*<sup>®</sup>. É importante salientar ainda que as três sondas adicionais para a região *core* do genoma viral incluídas na versão 2.0 do kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> permitem uma maior precisão na determinação do genótipo 6 e melhor distinção entre os subtipos 1a e 1b e, portanto, não solucionariam o problema aqui destacado (figura 18).

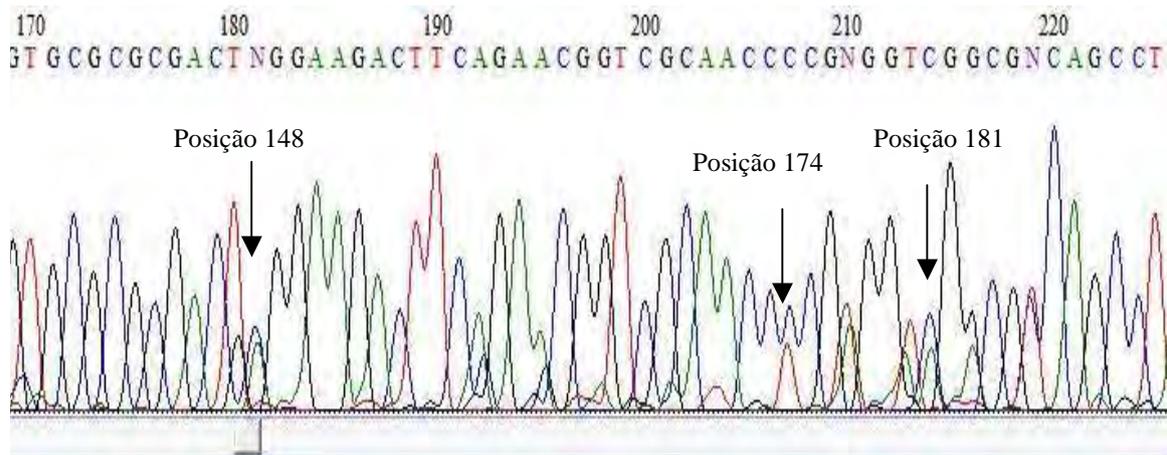


**Figura 18. Representação das membranas de nitrocelulose constituintes das versões 1.0 (A) e 2.0 (B) do kit comercial de genotipagem *INNO-LiPA*<sup>®</sup>. Em A destacam-se sondas genótipo-específicas para a região 5'UTR enquanto em B estão incluídas sondas (G6, G1a e G1b) para a região *core* do genoma do VHC (Adaptado de Bouchardeou *et al.*, 2007).**

A amostra do segundo paciente (371) também foi genotipada como 1b por seqüenciamento da região 5'UTR. Já a seqüência de nucleotídeos da região *core* para esta amostra mostrou domínios característicos dos genótipos 5a e 1b (figura 19) apresentando, inclusive, algumas sobreposições de picos característicos de ambos os genótipos (figura 20). Todos os procedimentos foram repetidos obtendo-se os mesmos resultados.







**Figura 20. Cromatograma da seqüência da região *core* do genoma do VHC exibindo algumas das sobreposições de picos característicos dos genótipos 5 e 1b encontradas neste trabalho (posições destacadas pelas setas). Nas posições 148 e 181 da região *core*, nas quais uma adenina (A – cor verde) seria característica do subtipo 1b enquanto uma citosina (C – cor azul) seria característica do genótipo 5a, há sobreposições dos picos de A e C e na posição 174 da região *core*, na qual uma timina (T – cor vermelha) seria característica do subtipo 1b enquanto que uma C seria característica do genótipo 5a, verifica-se uma sobreposição dos picos de C e T.**

Existe a possibilidade de infecção por ambos os genótipos (5a e 1b) para o paciente descrito. Acredita-se que a detecção de infecções por mais de um genótipo de VHC dependa da relativa concentração dos diferentes tipos virais no plasma do paciente. Um genótipo pode ser mais abundante e poderia ser o único amplificado ao limite de detecção das metodologias de genotipagem baseadas em *PCR*. Como resultado, a maioria dos estudos poderia estar subestimando a real prevalência das infecções misturadas com mais de um genótipo ou subtipo viral (Viazov *et al.*, 2000). Em trabalhos futuros envolvendo clonagem pretende-se verificar a presença de mais de um genótipo viral na referida amostra.

## 5. CONCLUSÕES

- A inclusão de uma região genômica viral com maior diversidade genética, adicional à 5'UTR, garantiu uma maior precisão na determinação dos genótipos e subtipos virais;
- A região 5'UTR-core, utilizada no casos de falha de amplificação da região NS5B, mostrou eficiência na determinação dos genótipos e subtipos virais;
- O seqüenciamento direto solucionou 100% dos casos de resultados inconclusivos pela hibridização reversa realizada com o kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0;
- O kit comercial *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0 produziu resultados errôneos com relação à subtipagem do VHC;
- A genotipagem por seqüenciamento direto revelou também pelo menos uma troca de genótipo (1→5) pelo kit comercial, influenciando na conduta terapêutica e questionando a eficiência do método comercial também quanto à determinação dos tipos virais;
- Considerando as vantagens acima referidas, conclui-se que a eficiência da metodologia de seqüenciamento direto foi superior à de hibridização reversa utilizando o kit *INNO-LiPA*<sup>®</sup> v.1.0;

## 6. REFERÊNCIAS

Alter HJ, Houghton M. Hepatitis C virus and elimination post-transfusion hepatitis. *Nat Med.* 2000;6 (10): 1082-1086.

Amorin RMS, Oliveira CP, Wyant PS, Cerqueira, DM, Câmara, GNL, Flores LS *et al.* Hepatitis C vírus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8): 895-897.

Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi G. Evaluation of a new hepatitis C vírus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol.* 2001; 63:17-21.

Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschager R. From structure to function: New insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Bio Chem.* 2006; 281(98): 33-36.

Bartosh B, Cosset, FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology.* 2006; 348(1):1-12.

Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Saccoccio G, Tiribelli C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Italy: the slowly unraveling mystery. *Microbes Infect.* 2000; 2: 1757-1763.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich SA. A new antigen in leukemia sera. *Jama.* 1965; 191: 541-546.

Blumberg BS, Stunick AI, London WT. Australia antigen and hepatitis. *Jama.* 1969; 207: 1895-1896.

Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, *et al.* Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-Lipa HCV assay. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(4): 1140-1145.

Brandão ABM, Fuchs SC, Silva MAA, Emer LF. Diagnóstico da hepatite C na prática. *Pan Am J Public Health*. 2001; 9(3): 161-168.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. Dispõe sobre protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a hepatite viral C. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília. 9 out. 2007; Seção I, n 195, p.60-63.

Bukh J., Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 4942-4946.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 8234-8238.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 8239-8243.

Campiotto S, Pinho LR, Carrilho FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS *et al*. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38(1): 41-49.

Cavalheiro NP. Hepatite C: transmissão entre casais [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo-USP; 2004.

Cavalheiro NP. Hepatitis C: genotyping. *Braz J Infect Dis* 2007; 11(1): 25-27.

Chan S-W, Mcomish F, Holmes E C, Dow B, Peutherer JF, Follett E *et al*. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* .1992; 73: 1131-1141.

Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(9): 3127-3134.

Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Gastroenterol.* 2007; 1317:2461-2466.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood borne non -A non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244:359-352.

Coelho HSM. Tratamento da hepatite C crônica. *In: José Galvão Alves editor. Gastroenterologia. Sociedade de Gastroenterologia do Rio de Janeiro. Hepatites. Rio de Janeiro; 2001. p.195-204.*

Corrao G, Aricoo S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and consumption on the risk of symptomatic liver-cirrhosis. *Hepatology.* 1998; 27: 914.

Cristina J. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J Clin Virol.* 2005; 34 (2): 1-7.

Damen M, Zaaijer HL, Cuypers HT, Vrieling HL, Van der Poel CL, Reesink HW *et al.* Reliability of the third generation immunoblot assay for hepatitis C virus. *Transfusion.* 1995; 35: 745-749.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet.* 1970; 1: 695-698.

Davis GL, Lan J. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology.* 1997; 26(1): 112-127.

De Oliveira, T. Out of África: the Bioafrica website. *Biotechniques.* 2006; 41:129.

Dienstag JL. The natural history of chronic hepatitis C and what we should do about it. *Gastroenterology*. 1997;112(2):651-655.

Di Tommaso L, Macchia S, Morandi L, Leoncini S, Pession A, Dal Monte PR *et al*. Correlation between histologic staging, hepatitis C virus genotypes and clinical features in HCV chronic hepatitis: evidence of new pattern. *Int J Surg Pathol*. 2003; 11(3): 197-204.

Dummuolin FL, Von Dem Bussche A, Li J, Khanzina L, Wands JR, Sauerbruch T. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*. 2003; 305: 260-266.

Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Seyec Le, Gilot D, Cannie I *et al*. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor for CIDE- $\beta$ -induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2003; 278: 18256-18264.

European Association for the Study of the Liver. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 1999;30(5):956-961.

Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 170: 1021-1025.

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

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res*. 1998; 8(3): 175-185.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998a; 8(3): 186-194.

Fang JWS, Cho W V, Lau JYN. Virology of Hepatitis C Virus. Clin Liver Dis. 1997; 1:493-514.

Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. Rev Bras Epidemiol. 2004;7(4): 473-487.

Fraser CS, Doudna J. Structural and mecanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. Nat Rev Microbiol. 2007; 5: 29-38.

Freitas J. Hepatites víricas. In: José Cotter editor. Núcleo de Gastroenterologia dos Hospitais Distritais. Portugal; 2003. p. 15-41.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL *et al.* Peguinterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C vírus infection. N Engl Med. 2002; 347: 975-982.

Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A *et al.* Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. Lancet. 1990; 335: 1419-1422.

Giannini C, Giannelli F, Monti M, Careccia G, Marrocchi ME, Laffi G *et al.* Prevalence of mixed infection by different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. J Lab Clin Med. 1999; 134: 68-73.

Gonçales NSL, Junior FLG. Laboratory testing for Hepatitis C. BJID. 2007; 11(1): (22-24).

Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. Hepatology. 1997; 26(3): 43S-47S.

Hall TA. BioEdit: a user-friendily biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser.1999; 41: 95-98.

Hausholer AC, Koptý C, Hauer R, Brunner H, Halbmayer WM. HCV genotypes and age distribution in Vienna and surroundings areas. J Clin Virol. 2001; 20: 41-47.

Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using Clustal for multiple sequence alignments. *Meth. Enzymol.* 1996; 266: 283-402.

Hollinger FB. Hepatitis B virus. *In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chamock RM, Melnick JL, Monath TP et al. editores. Fields Virology. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia; 1996. p. 2739-2807.*

Iken K, Huang L, Bekele H, Schmidt EV, Koziel MJ. Apoptosis of activated CD4+ e CD8+ is enhanced by co-culture with hepatocytes expressing hepatitis C virus (HCV) structural proteins through FasL induction. *Virology.* 2006; 346: 363-372.

Kamoshita N, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Nomoto A. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA:implication for involvement of highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology.* 1997; 233: 9-18.

Katayama T, Mazda T, Kikuchi S, Harada S, Matsura Y, Chiba J *et al.* Improved serodiagnosis of non-A non-B hepatitis by an assay detecting antibody to hepatitis C virus core antigen. *Hepatology.* 1992; 15: 391-394.

Kato N, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige M, Mizokami M *et al.* Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology.* 2003; 125: 1808-1817.

Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of Hepatitis c by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science.* 1997; 277: 570-574.

Kountouras K, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in Hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2003; 10 (5): 335-342.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 2008; 9(4): 299-306.

Kuiken C, Yusim K, Boykin, Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics*. 2005; 21(3): 379-384.

Kuiken C, Mizokami M, Deleage G, Yusim K, Penin F, Shin-I T *et al.* Hepatitis C databases, principles and utility to researchers. *Hepatology*. 2006; 43(5): 1157-1165.

Lau JYN, Mizokami M, Ohno T, Diamond D, Kniffen J, Davis GL. Discrepancy between biochemical and virological response to interferon-alfa in chronic hepatitis C. *Lancet*. 1993; 13:1208-1209.

Lauer GM, Waker BD. Hepatitis C virus infection. *NEJM*. 2001; 345(1): 41-53.

Levi J, Takaoka D, Garrini R, Fachini R, Focaccia R, De Bartholi *et al.* Three cases of infection with hepatitis C virus genotypes 5 among Brazilian hepatitis C patients. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2645-2647.

Le Pogam S, Dubois F, Christen R, Raby C, Cavicchini A, Goudeau A. Comparison of DNA enzyme immunoassay and line probe assays (Inno-LiPA I and II) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol*. 1998;36: 1461-1463.

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function . *Nature*. 436 (7053): 933-938. 2005.

Lindh M, Haunnoun C. Genotyping of hepatitis C virus by Taqman real-time PCR. *J Clin Virol*. 2005; 34: 108-114.

Liu Q, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biophys Res Commun*. 1999; 254: 572-577.

Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999; 285: 110-113.

Lok ASF, Guaranatnam NT. Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology*. 1997;26(1):48-56.

Lopes EPA, Granato CH, Lanzoni V, Granero L, Paranhos-Baccala G, Tomiyama H *et al*. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Hepatitis C virus antibody detection using recombinant protein derived from the core region of hepatitis C virus genome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(5): 717-720.

Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Forns X, Castellás A, Saiz J, Costa J *et al*. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: Relationship between HCV genotypes 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 1997; 27: 959-965.

Manzini P, Calvo PL, Bruneto MR, Baldi M, Abate ML, Oliveri F *et al*. Clinical significance of the antibody to putative core protein of hepatitis C virus in patients with chronic liver disease. *Liver*. 1993; 13: 222-226.

Martins RMB, Vanderborght BO, Yoshida CFT. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 299-300.

McHutchison JG. Understanding Hepatitis C. *Am J Manag Care*. 2004; 10(2): S21-S29.

Mello IMVGC. Evidências moleculares da transmissão horizontal do vírus da hepatite C (VHC) entre cônjuges. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo-USP.; 2006.

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C *et al*. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest*. 1998; 98:706-714.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5: 453-463.

Neumann AU, Lan NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ *et al.* Hepatitis C viral dynamics in vitro and antiviral efficacy of interferon alpha therapy. *Science*. 1998; 282:103-107.

Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, Caliendo AM, Sturchio C, Grunwald A *et al.* Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1558-1564.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H *et al.* The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jap J exp Med*. 1990; 60: 167-177.

Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S. Typing hepatitis C virus C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol*. 1992; 73: 673-679.

Pawlotsky JM. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol*. 1999; 31(1):71-79.

Penin, F. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis*. 2003; 7: 1-21.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004; 39(1): 5-19.

Poynard T, Opolon P. Hepatitis C: Virus of natural history and optimistic views of interferon treatment? *Hepatology*. 1998; 27: 1993-1999.

Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci*. 1968; 60: 814-821.

Purcell H, Walsh JH, Holland PV, Morrow AG, Wood S, Chanock RM. Seroepidemiological studies of transfusion-associated hepatitis. *J Inf Dis*. 1971; 123(4): 406-413.

Resegue R, Bricks LF, Rodrigues D. Hepatite pelo vírus A: prevenção e estratégias de imunização. *Pediatria*. 1999; 21(4): 308-321.

Roffi L, Ricci A, Ogliari C, Scalori A, Minola E, Colloredo G *et al.* HCV genotypes in Northern Italy: a survey of 1368 histologically proven chronic hepatitis C patients. *J Hepatol.* 1998; 29: 701-706.

Rosemberg W. Sex and drugs and HCV? *GUT.* 1999;45:7-8.

Rosen HR, Gretch DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol Med Today.* 1999; 5:393-399.

Sampietro M, Badalamenti S, Salvatori S, Corbetta N, Graziani G, Como G *et al.* High prevalence of a rare hepatitis C virus treated in the same hemodialysis unit: evidence for nosocomial transmission of HCV. *Kidney Int.* 1995; 47: 911-917.

Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of NS5b region. *J Virol Methods.* 2003; 109: 187-193.

Schiff ER, Medina M, Kahn RS. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 1999; 19(1): 3-15.

Schrotter M, Feucht H, Schafer P, Zollner B, Laufs R. Serological determination of hepatitis C virus subtypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a e 4a by recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol.* 2000; 37: 2576-2580.

Seef LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology.* 1997; 26: 215.

Simmonds P, Holmes E, Cha T-A, Chan S-W, McOmish F, Irvine B *et al.* Classification of hepatitis c virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol.* 1993; 74: 2391-2399.

Simmonds P, Smith D, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea M *et al.* Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol.* 1994; 75: 1053-1061.

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

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Del'age G, Enomoto N, Feinstone S *et al.* Consensus Proposals for a Unied System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology.* 2005; 42(4): 962-973.

Smith D, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M *et al.* Variation of the hepatitis C virus 5'non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *J Gen Virol.* 1995; 76: 1749-1761.

Souto FJD, Ribeiro LC, Perazolo GF, Fortes HM, Saldanha AA. Imunoblot como teste suplementar para a detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C em doadores de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(1): 69-71.

Spada, M, Mele A, Ciccozzi M, Tosti ME, Bianco E, Szklo A *et al.* Changing epidemiology of parenterally transmitted viral hepatitis: Results from the hepatitis surveillance system in Italy. *Digest Liver Dis.* 2001; 33: 778-784.

Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34(1): 69-82.

Stuyver L, Rossau A, Wyseur M, Duhamel B, Vanderborcht H, Van Heuverswyn *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol.* 1993; 74:1093–1102.

Stuyver L, Van Arnhem W, Wyseur A, Hernandez F, Delaporte E, Maertens G. Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:10134-10138.

Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K *et al.* Real Time detection for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology.* 1999; 116(3): 636-642.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionay Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(8): 1596-1599.

Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion associated hepatitis C. *N Engl J Med.* 1995; 332:1463-1466.

Van Doorn LJ, Kleter IGEM, Stuyver ZL, Maertens, G, Brouwer, JT Schalm SW *et al.* Sequence analysis of hepatitis C virus genotypes 1 to 5 reveals multiple novel subtypes in the Benelux countries. *J Gen Virol.* 1995; 76: 1871-1876.

Verma V, Chakravarti A. Comparison of 5'noncoding-core with noncoding regions of HCV by RT-PCR: Importance and clinical implications. *Curr Microbiol.* 2008; 57: 206-211.

Viazov S, Widell A, Nordenfelt. Mixed infection with two types of hepatitis C virus probably a rare event. *Infection.* 2000; 28(1): 21-25.

Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfect into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 8738-8743.

Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 13(2)223-235.2000.

Zein NN. Vertical transmission of hepatitis C: to screen or not to screen? *J Pediatr.* 1997; 130: 859-861.

Zeuzem S, Diago M, Gane E, Reddy KR, Pockros P, Prati D *et al.* Peginterferon alfa-2a (40 Kilodaltons) and ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology.* 2004;127:1724–1732.

Zhou S, Terrault NA, Ferrell L, Hahn JA, Lau JY, Simmonds P *et al*. Severity of liver disease in liver transplantation recipients with hepatitis C virus infection: relationship to genotype and level of viremia. *Hepatology*. 1996; 24(5): 1041-1046.