

CESAR AUGUSTO BARROS DUARTE

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C ATRAVÉS DE
RT-PCR EM TEMPO-REAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Andrea e aos meus filhos Daniel e Sofia pela compreensão e apoio a mim oferecidos.

Aos meus pais por toda sua dedicação e abnegação.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger, pela oportunidade, confiança e apoio.

À Dra Celina de Oliveira Poersch pelo interesse na leitura dessa dissertação e pela contribuição dada à melhoria da mesma.

À Dra Daniela Parada Pavoni por compartilhar protocolos, materiais, conhecimento, experiência, dicas e conselhos, todos fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

À Dra Sueli Nakatani pelo fornecimento das amostras, por compartilhar experiência, conhecimentos e por seu interesse na realização deste trabalho.

A todos os diretores do Instituto de Biologia Molecular (IBMP), por me disponibilizar um ambiente tão estimulante e agradável e por me deixar completamente confortável dentro dele.

Ao Dr Rodrigo Brindeiro e a todos os colegas do Laboratório de Virologia Molecular Animal (UFRJ), pela acolhida e ensinamentos a mim dispensados.

A todos os colegas do IBMP, pela colaboração e amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Hepatite não-A, não-B.....	1
1.2. O Vírus da Hepatite C.....	2
1.2.1. Ciclo celular e cinética viral.....	4
1.3 Manifestações clínicas.....	5
1.4 Epidemiologia.....	6
1.5. Diagnóstico Laboratorial.....	8
1.5.1. Ensaios Sorológicos.....	8
1.5.2. Detecção do RNA do HCV.....	10
1.5.2.1 Detecção qualitativa do RNA.....	10
1.5.2.2. Detecção quantitativa do RNA.....	11
1.5.2.3. PCR em Tempo-Real.....	12
2. JUSTIFICATIVAS.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAIS e MÉTODOS.....	17
4.1. Amostra populacional estudada.....	17

4.2. PCR em tempo real com sondas TaqMan®	18
4.3 Desenho dos oligonucleotídeos.....	21
4.4 Reação de transcrição reversa e de PCR.....	23
4.5 Reação de PCR em tempo real.....	23
4.6. Obtenção do RNA.....	24
4.7. Construção da curva padrão externa.....	24
5.RESULTADOS.....	26
6.DISSCUSSÃO.....	33
7.CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Genoma do vírus da hepatite C.....	3
FIGURA 2- Prevalência dos diferentes genótipos no Brasil.....	7
FIGURA 3- Prevalência mundial da co-infecção com o HIV.....	7
FIGURA 4- Representação esquemática das etapas de uma PCR em tempo real.....	20
FIGURA 5- Variação da fluorescência durante PCR.....	21
FIGURA 6- Amostra do alinhamento realizado.....	22
FIGURA 7- Regressão linear da curva padrão: correlacionando número de cópias na reação x Ct.....	26
FIGURA 8- Correlação entre número de cópias (LOG ₁₀) Amplicor HCV Monitor [®] /PCR tempo real.....	30
FIGURA 9- Concordância entre os testes através da metodologia descrita por Bland-Altman	31
FIGURA 10- Resultado de diferentes curvas padrão.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Dados epidemiológicos Mundiais (OMS).....	6
TABELA 2- Conjunto de oligonucleotídeos para teste.....	22
TABELA 3- Avaliação da reprodutibilidade da curva padrão.....	26
TABELA 4 Resultado das reações em Ct e número de equivalentes de cópias por reação baseado na curva padrão externa.....	28
TABELA 5- Número de equivalentes de cópias (log)/ml, Amplicor HCV Monitor® x PCR em tempo real.....	29
TABELA 6- Sensibilidade analítica.....	32
TABELA 7- Avaliação da precisão do teste (coeficiente de variação-CV).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

Ct: *threshold cycle*

CV: coeficiente de variação

Delta Rn: variação de fluorescência normalizada

DNA: *deoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

cDNA: DNA complementar

dNTPs: desoxirribonucleosídeos trifosfatados

DO: densidade óptica

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imuno-enzimático)

FAM: 6-carboxifluoresceína

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (transferência de energia por ressonância de fluorescência)

HIV: *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HCV: *hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

μl: microlitro

μM: micromolar

M: molar

ml: mililitro

mM: milimolar

MML: Moloney murine leukemia

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pb: pares de base

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

RT-PCR: *reverse transcription - polymerase chain reaction*

TAMRA: 6-tetrametilcarboxirrodamina

T_m: *melting temperature*

TMA: *transcription mediated amplification* (amplificação mediada por transcrição)

RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) acomete cerca de 170 milhões de pessoas em todo mundo, causando cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. É a principal causa de indicação de transplante hepático entre adultos. Em complementação aos testes diagnósticos sorológicos existentes, tem-se utilizado testes moleculares para a detecção sérica do RNA do HCV bem como para sua quantificação. No presente trabalho aplicou-se a metodologia de RT-PCR em tempo real para a detecção e quantificação sérica do RNA do HCV. Utilizou-se a plataforma ABI 7000 SDS[®] e sondas TaqMan[®] como base tecnológica para o desenvolvimento deste teste. Foram realizadas 84 reações de extração de RNA viral, seguidas de reação de transcrição reversa e subsequente reação de PCR em tempo real. A sensibilidade analítica do teste foi estimada em 50 UI/ml; a média do coeficiente de variação (CV) intra-ensaio e inter-ensaio foi de 0,42% e 1,8 % respectivamente e a faixa de quantificação abrangeu cerca de 6 log₁₀. A metodologia empregada foi capaz de detectar os três genótipos predominantes no Brasil. Em uma comparação com o teste diagnóstico Amplicor HCV Monitor[®], baseado em RT-PCR competitiva e rotineiramente utilizado em laboratórios de diagnóstico, os testes demonstraram um ótimo coeficiente de correlação ($r=0,91$, $p<0,001$). No entanto, a concordância, avaliada através da metodologia desenvolvida por Bland-Altman, foi considerada insuficiente para que os testes pudessem, eventualmente, ser utilizados de modo intercambiável. As características apresentadas pelo teste desenvolvido neste trabalho o credenciam como método diagnóstico qualitativo e quantitativo para a hepatite C. Contudo, o

presente teste necessita ainda de dois desenvolvimentos complementares para ser considerado para uso clínico: construção de um calibrador interno para controle de todas as fases da metodologia empregada e calibração frente um painel validado quantitativo que expresse os resultados em Unidades Internacionais (UI/ml).

ABSTRACT

Hepatitis C virus is estimated to infect roughly 170 million people worldwide, and is known to cause liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It is currently the most frequent indication for liver transplantation among adults. In addition to the current serologic assays utilized, molecular biology assays have been developed for RNA HCV detection and quantification. In the present study, real-time RT-PCR was utilized for RNA HCV serum detection and quantification. It was based on ABI 7000 SDS[®] and TaqMan[®] probes technology. Eighty four viral RNA extraction reactions, followed by reverse transcription real-time PCR reactions, were conducted. An estimated analytical sensitivity of 50 UI/ml, an average intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) of 0,42% and 1,80%, respectively, and a 6-log dynamic range were found. The method was capable of detecting all three major HCV genotypes found in Brazil. Comparison of the results with those obtained by Amplicor HCV monitor[®], a competitive RT-PCR based assay, routinely used in diagnostic laboratories, revealed significant coefficient of correlation ($r=0,91$, $p<0,001$). Nevertheless, agreement, evaluated through Bland-Altman methodology, was considered poor, meaning that both assays should not be used interchangeably. The performance characteristics showed by the present developed assay, confers it as potential qualitative and quantitative method for hepatitis C diagnostics. Notwithstanding, it's thought that two further complements are in need to the present work before being considered for clinical use: development of an internal calibrator

for all stages control of the method; and calibration against a validated quantitative panel expressing results in International Units (IU/ml).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hepatite não-A, não-B

Na década de 70 foi detectada a ocorrência de hepatite (inflamação hepática) pós-transfusional em cerca de 10% dos pacientes após receberem algum hemocomponente. Sendo que nestes pacientes não se detectava marcadores virais para as já conhecidas hepatites A e B, sugeriu-se a existência de um terceiro vírus para explicar estes casos, mas este parecia escapar aos métodos investigacionais empregados até então (FEINSTONE *et al.* 1975).

Somente em 1989, Choo *et al.* obtiveram um clone de cDNA a partir de um paciente com hepatite não-A e não-B. Este patógeno passou a ser conhecido como vírus da hepatite C (HCV). A partir desta descoberta, não levou muito tempo para que fossem desenvolvidos os primeiros testes capazes de detectar anticorpos contra o HCV (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Com o subsequente implante destes testes em bancos de sangue, os casos da até então denominada hepatite não-A, não-B diminuíram acentuadamente (DONAHUE *et al.*, 1992).

1.2. O Vírus da Hepatite C

Apesar de enorme esforço desde sua descoberta, o cultivo do vírus só tornou-se possível recentemente, e apenas para um genoma único (JFH1), obtido de um paciente com hepatite aguda fulminante no Japão (KATO *et al.*, 2001). A maior parte do conhecimento sobre o HCV é proveniente de sistemas replicativos *in vitro* (*replicons*), capazes de proporcionar a replicação genômica e sub-genômica e expressão protéica (LOHMANN *et al.*, 1999; RICE *et al.*, 2002; BARTENSCHLAGE *et al.*, 2003).

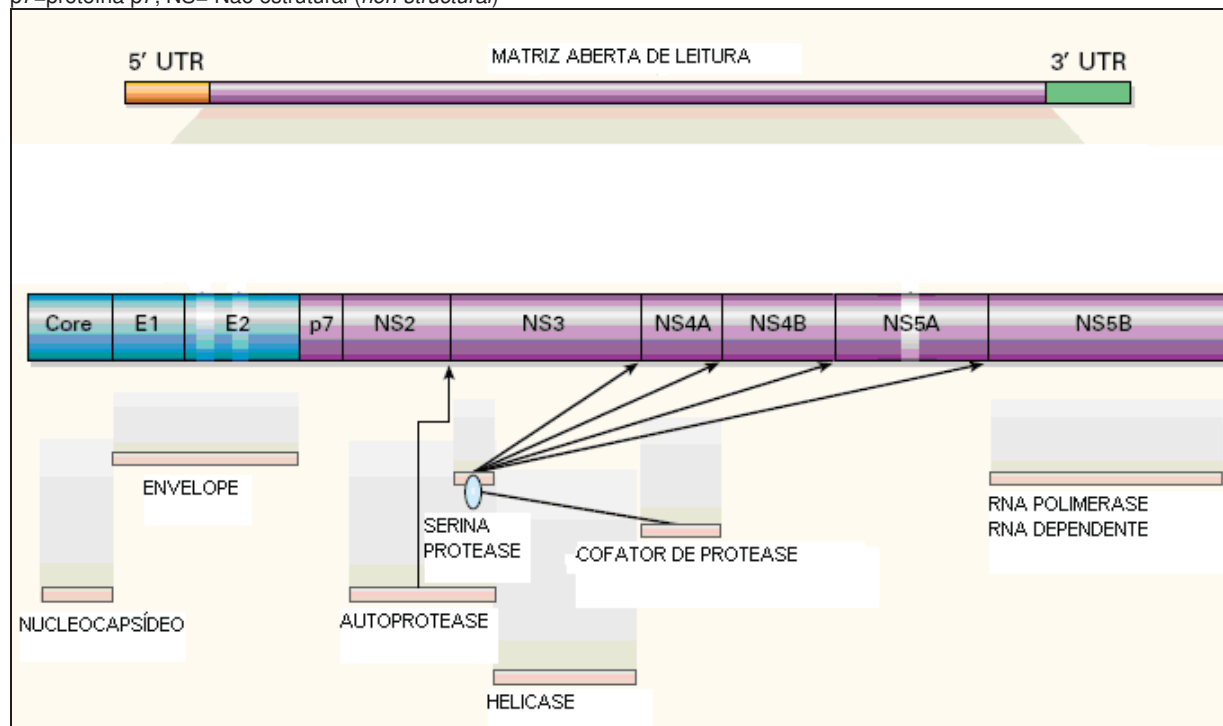
O HCV pertence à Família Flaviviridae, apresentando uma única fita de RNA com polaridade positiva. Seu genoma possui cerca de 9600 nucleotídeos com duas regiões não-codificadoras em suas extremidades, sendo sua porção codificante geradora, em matriz aberta de leitura, de uma poliproteína de 3010 a 3033 aminoácidos (dependendo do genótipo), que sob ação autoproteolítica e proteolítica da célula hospedeira (hepatócito), origina proteínas estruturais (C, E₁, E₂) e não-estruturais (NS-2, p7, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5A, NS-5B) (LOHMANN *et al.*, 1996; PENIN *et al.* 2004) (FIGURA 1).

A análise filogenética de cepas do HCV, seja de toda a seqüência ou parcial, isoladas em várias regiões do mundo, levou a identificação de genótipos do HCV, incluindo seis tipos principais, enumerados de 1 a 6, e um grande número de subgrupos dentro destes grupos, chamados “subclados” ou “subtipos” e identificados por letras minúsculas (1a, 1b, etc.). Os tipos diferem de 31% a 34% em suas seqüências de nucleotídeos e aproximadamente 30% em suas seqüências de aminoácidos, enquanto os subtipos diferem em 20% a 23% de suas seqüências de

nucleotídeos, com importante diferença conforme a região genômica (SIMMONDS, 1995; ROBERTSON *et al.*, 1998).

FIGURA 1. GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C

5'UTR (*untranslated region*)- região não-codificadora, região mais conservada do genoma; E= envelope; p7=proteína p7; NS= Não estrutural (*non-structural*)



Fonte: Lauer G. M., Walker B. D, 2001. (modificado).

1.2.1. Ciclo celular e cinética viral

Após a infecção o HCV se difunde rapidamente nos hepatócitos. Ainda que não determinado ao certo o mecanismo da entrada do HCV nos mesmos, parece que a interação entre E₂ e a alça extracelular de CD81, uma tetraspanina, tem papel importante. Há evidências também da presença do vírus em linfócitos, células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (FLINT *et al.*, 2001).

Após a liberação do RNA viral no interior da célula, este se destinará a três funções: a) tradução nas proteínas estruturais e não-estruturais b) replicação sob a ação de uma RNA polimerase - RNA dependente (NS-5B) e c) empacotamento na partícula final do vírus (RICE *et al.*, 2005).

Muito do que se sabe sobre a cinética viral do HCV veio de estudos com a infecção experimental de chimpanzés e de pacientes com hepatite C que receberam transplante hepático. A aplicação de modelos matemáticos nestas situações e em relação à variação da viremia em pacientes que receberam interferon- α forneceu informações importantes: a) pacientes com infecção crônica tipicamente têm carga viral de 10^3 a 10^7 genomas por mililitro de plasma, b) cerca de 10^{12} vírus são produzidos por dia, com uma meia-vida estimada em 3 horas e c) a carga viral, uma vez atingindo determinado patamar, tende a permanecer constante por anos, o que denota uma produção e destruição do vírus equilibradas (NEUMANN *et al.*, 1998).

1.3 Manifestações clínicas

O HCV causa hepatite aguda e crônica, sendo os sintomas mais comuns na infecção aguda a náusea, mal-estar e icterícia. No entanto, na grande maioria das vezes, a infecção aguda é assintomática. Em cerca de 70% dos casos a infecção se torna crônica e resulta em cirrose hepática após 20 a 30 anos em 20% dos casos. A infecção pelo HCV também causa, ainda por mecanismos indeterminados, carcinoma hepatocelular em 4% dos pacientes com cirrose, anualmente (IKEDA, *et al.*, 1998). Em países desenvolvidos, a cirrose hepática causada pelo vírus da hepatite C é responsável pela maior parte dos transplantes hepáticos em adultos.

A transmissão do HCV ocorre pelo contato com sangue contaminado, sendo considerados em risco os seguintes grupos: pacientes que receberam transfusão sangüínea antes da década de 90, usuários de drogas injetáveis, indivíduos promíscuos sexualmente e aqueles que se utilizam de práticas de tatuagem e colocação de *piercing* com material contaminado. A transmissão do HCV por relação sexual é infreqüente assim como a transmissão vertical a recém-natos (ALTER *et al.*, 1992; OHTO *et al.*, 1994).

Além das doenças hepáticas, ocorrem, ainda, manifestações extra-hepáticas, sendo as principais de ordem auto-imune e linfoproliferativa, cuja explicação pode estar relacionada com a possibilidade de replicação do HCV em linfócitos (Zignego *et al.*, 1999).

O tratamento da hepatite C tem na combinação do Interferon- α e ribavirina sua melhor chance de cura (20-50%). O tratamento tem um alto custo, necessita de monitoramento laboratorial e efeitos colaterais são freqüentes.

1.4 Epidemiologia

Estima-se que 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV em todo mundo com cerca de 3 a 4 milhões de novas infecções a cada ano, sendo que, destas, 70% desenvolverão hepatite crônica (OMS, 1999).

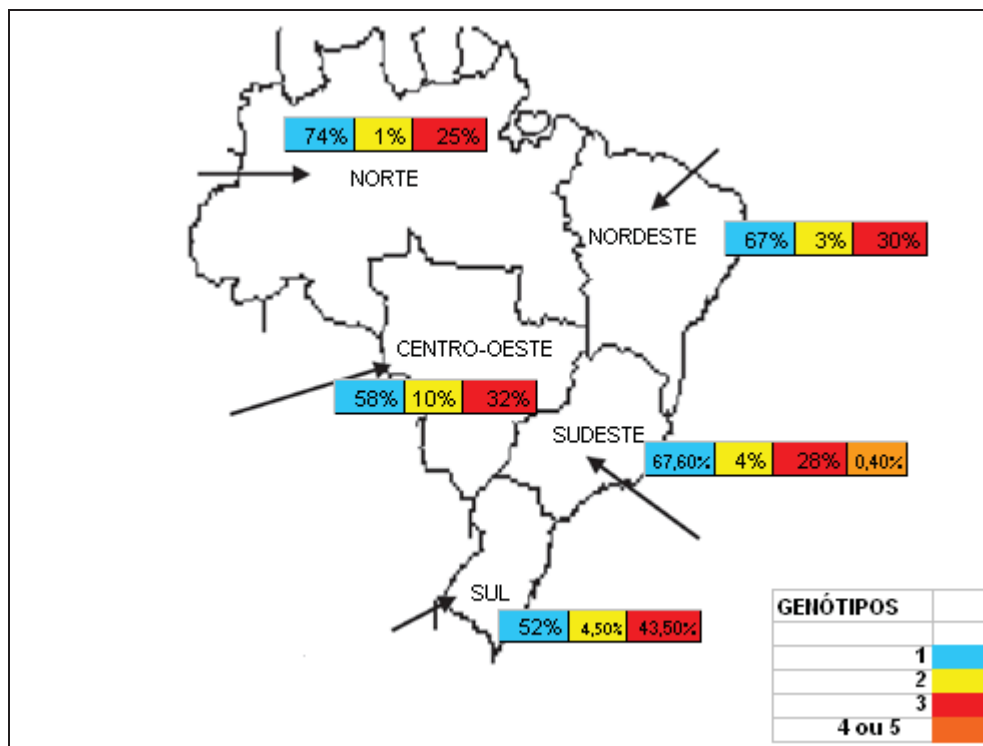
A hepatite C está presente em todos os continentes em prevalências e genótipos variáveis (TABELA 1).

TABELA 1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS MUNDIAIS

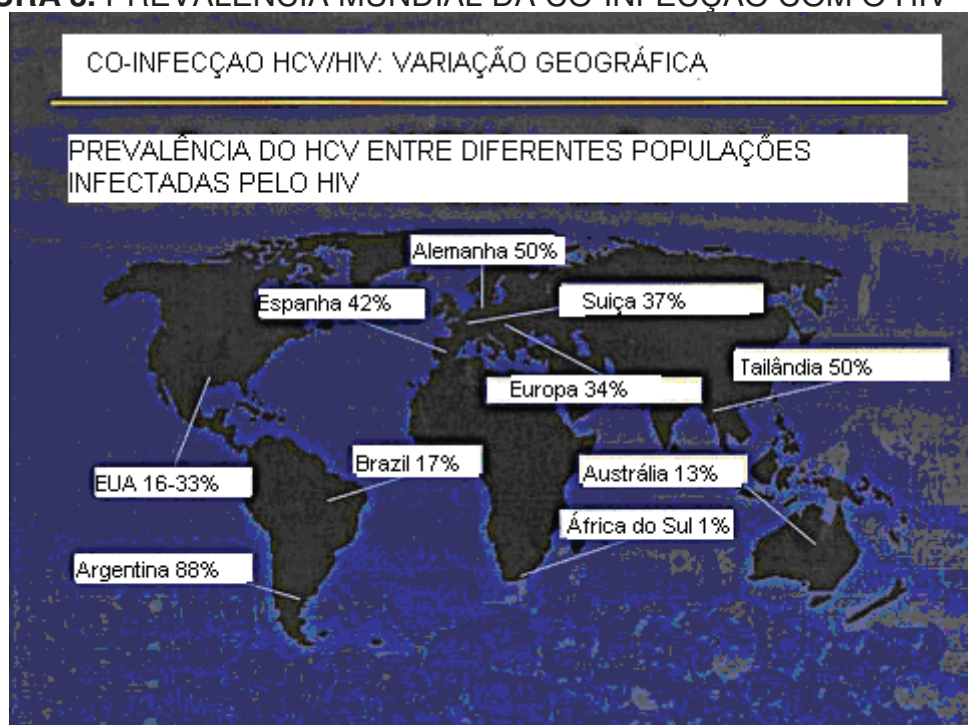
Região	População Total (Milhões)	Genótipos (1-6)	Prevalência (%)	População Infectada (Milhões)
África	602	1,4,5	5,3	31,9
Américas	785	1,2,3	1,7	13,1
Mediterrâneo	466	1,2,3	4,6	21,3
Europa	858	1,2,3,5	1,03	8,9
Sudeste Asiático	1 500	3,6	2,15	32,3
Pacífico Oeste	1 600	1,2,3	3,9	62,2
Total	5 811		3,1	169,7

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 1999. (modificado).

No Brasil estima-se que a prevalência varie de 0,8% a 3,4% nas diferentes regiões do país (CARRILHO & CORRÊA, 1998), encontrando-se os genótipos 1, 2 e 3 e raramente os genótipos 4 e 5 (FIGURA 2). Além de sua importância isoladamente, a co-infecção com o HIV é freqüente e causadora de uma progressão mais acelerada para cirrose (SULKOWSKI *et al.*, 2000) (FIGURA 3).

FIGURA 2. PREVALÊNCIA DOS DIFERENTES GENÓTIPOS NO BRASIL

Fonte: Campiotto *et al.*, 2005. (modificado).

FIGURA 3. PREVALÊNCIA MUNDIAL DA CO-INFEÇÃO COM O HIV

Fonte: Sulkowski *et al.*, 2000. (modificado).

1.5. Diagnóstico Laboratorial

A identificação do HCV, por métodos moleculares, permitiu o desenvolvimento de métodos de diagnóstico imunoenzimáticos (CHOO *et al.*, 1989). Estes métodos possibilitaram a implementação de rotinas sorológicas em bancos de sangue na década de 90, quando se iniciou a detecção de indivíduos soropositivos que, conseqüentemente, foram rejeitados como doadores. Isto causou a mudança das características epidemiológicas da infecção pelo HCV, passando de sua associação à hepatite pós-transfusional para, principalmente, ao uso de drogas ilegais injetáveis e outras formas menos comuns onde exista exposição de membranas e mucosas ao vírus.

Podemos classificar os métodos correntes de diagnóstico do HCV em ensaios sorológicos e de detecção do RNA do HCV.

1.5.1. Ensaios Sorológicos

Iniciados com a clonagem do genoma do HCV e expressão do antígeno recombinante c100-3 (derivado da região NS4 do vírus) em levedura, os ensaios sorológicos têm evoluído muito e tornaram-se disponíveis para o diagnóstico rotineiro da infecção pelo HCV.

Os ensaios sorológicos de 1^a geração utilizam um único epítopo (derivado de NS4). São reativos em 80 a 90% dos pacientes testados com hepatite crônica pós-transfusional, porém não são capazes de detectar casos de infecção recente pelo HCV. Além disso, seu uso como método de rastreamento em populações de baixo

risco resulta em alta taxa de resultados falso-positivos, o que levou à introdução de ensaios *immunoblot* recombinantes, os quais se mostraram mais específicos, podendo ser usados como testes confirmatórios em pacientes exibindo positividade no ensaio sorológico. Uma limitação desse teste é o fato do mesmo poder ser afetado por níveis séricos elevados de globulinas, particularmente em pacientes com hepatite crônica ativa auto-imune (KOBAYASHI *et al.*, 1999).

A introdução de ensaios sorológicos de 2^a e 3^a geração deveu-se à expressão de novos antígenos recombinantes provenientes de regiões altamente conservadas do genoma do HCV. Sua maior sensibilidade e especificidade levaram à substituição dos testes de 1^a geração. Além do antígeno c100-3, os ensaios de 2^a geração agregaram o antígeno c22-3 da região “C” (capsídeo) e o antígeno c33c derivado da região não estrutural NS3. Embora esses testes sejam métodos muito sensíveis para rastreamento de soropositivos para HCV e tenham quase que eliminado a ocorrência de hepatite pós-transfusional, seu resultado pode mostrar-se falso-negativo, da mesma forma que os testes de 1^a geração, por exemplo, em um grupo de indivíduos que tenham contraído a infecção pelo HCV recentemente, pois a soro-conversão pode levar até 12 semanas após a exposição inicial ao vírus. Além disso, pacientes imunossuprimidos ou imunocomprometidos podem não ser capazes de montar uma resposta imunológica sorologicamente detectável. Outra limitação desse teste é um número significativo de resultados dados como indeterminados, em algumas séries chegando a 13% (ZEIN *et al.*, 1997), sendo aventada como uma possível causa o fato do teste apresentar resultados diferentes frente aos diferentes genótipos encontrados, o que poderia ser uma grande barreira na utilização dos mesmos em regiões distantes da onde os testes foram desenvolvidos.

Nos testes de 3^a geração, cinco antígenos recombinantes estão presentes e, como resultado, obteve-se ainda maior especificidade e sensibilidade. Apesar deste avanço, resultados indeterminados não foram eliminados, o que leva à necessidade da detecção direta do RNA do HCV (COLIN *et al.*, 2001).

1.5.2. Detecção do RNA do HCV

Devido às limitações dos testes sorológicos, a detecção direta do RNA viral tornou-se uma ferramenta essencial no diagnóstico da infecção pelo HCV. Suas vantagens incluem a possibilidade do diagnóstico precoce na infecção viral aguda, diagnóstico da infecção em pacientes incapazes de montar uma resposta sorológica (pacientes imunocomprometidos, imunossuprimidos e pacientes cronicamente enfermos, tais como renais crônicos) e confirmação da infecção ativa em situações específicas (resultados indeterminados e recém-natos de mães infectadas pelo HCV) (GERMER *et al.*, 2001). Os testes de detecção do RNA do HCV são classificados em qualitativos e quantitativos.

1.5.2.1 Detecção qualitativa do RNA

Os testes qualitativos comumente utilizados para detecção do RNA do HCV são: a) RT-PCR (*reverse transcription - polymerase chain reaction*) e TMA (*Transcription Mediated Amplification*).

A utilização da técnica de RT-PCR para a detecção da presença de RNA do HCV em soro de pacientes suspeitos iniciou-se na década de 90. Esta metodologia

apresenta boa sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção da infecção antes dos ensaios sorológicos, diferenciação dos casos de infecção ativa dos de resolução da infecção e diagnóstico em pacientes incapazes de formação de uma resposta imune efetiva (GARSON *et al.* 1990; ZAAIJER *et al.* 1993).

O teste de TMA para o RNA do HCV, baseado, também, na amplificação de alvo molecular, tem se mostrado mais sensível que o teste de RT-PCR (ZARRACI *et al.*, 2000), apresentando grande aplicação como teste de confirmação de resposta sustentada ao tratamento.

1.5.2.2. Detecção quantitativa do RNA

Os testes quantitativos têm capacidade de determinar a quantidade de RNA do HCV presente no soro de pacientes infectados (carga viral), o que tem importância prognóstico-terapêutica. Pacientes portadores de hepatite pelo genótipo 1 que não apresentam queda na carga viral de pelo menos 2 log, após 12 semanas de tratamento com Interferon- α /ribavirina, dificilmente obterão resposta com tratamento mais prolongado.

Como requisito destes testes, espera-se que sejam acurados principalmente em relação às cargas virais encontradas em pacientes antes do tratamento (10^3 a 10^7 genomas por mililitro de soro) e que tenham capacidade de detectar a queda desta carga em resposta ao tratamento. Já a constatação da eliminação do RNA viral dá-se pela utilização dos testes qualitativos, os quais são mais sensíveis.

A quantificação do RNA do HCV é feita, atualmente, por duas metodologias principais: RT-PCR competitiva e amplificação de sinal (*branched DNA*). Ambos os

testes têm limites inferiores de detecção semelhante, ainda que o *branched DNA* exiba uma faixa de resolução mais ampla no que concerne aos limites superiores de detecção, evitando a necessidade, na maioria das vezes, de re-testes com diluição de amostras de maior carga viral.

1.5.2.3. PCR em Tempo-Real

Apesar da metodologia de RT-PCR competitiva para quantificação do HCV sérico ser empregada há longa data (ZEUZEM *et al.*, 1994), rotineiramente, em muitos laboratórios de diagnóstico, com bons resultados, sua baixa sensibilidade analítica e limitada faixa de resolução de 3 log impõe algumas limitações. Isto tem impulsionado a busca de metodologias alternativas que possam suprir estas deficiências.

A metodologia de PCR tradicional necessita de uma fase de detecção após o término da reação de amplificação do ácido nucléico alvo, seja através de eletroforese e subsequente obtenção de imagem ou através de modificação de iniciadores que permitam adaptação da detecção por métodos colorimétricos. A detecção ao final da reação de PCR limita a capacidade de diferenciar a quantidade inicial de alvos moleculares presente em cada reação, sendo freqüente a não resolução de uma diferença de 10 vezes.

Alguns desenvolvimentos realizados na década de noventa, utilizados conjuntamente, trouxeram possibilidades consideráveis ao método tradicional de PCR: 1) emprego da atividade 5'-3' exonuclease da enzima *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase para gerar um sinal específico detectável concomitante à reação de

PCR (HOLLAND *et al.*, 1991), 2) sistema de detecção de sinal fluorescente simultâneo a realização da reação de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1992), 3) uso de sonda ligada covalentemente a fluóforo na reação de PCR (LEE *et al.*, 1993).

Estes desenvolvimentos possibilitaram a criação da metodologia de PCR em tempo real, capaz de permitir a detecção do produto de PCR à medida que vai sendo formado, e não somente ao final da reação de PCR. Dessa forma, acrescentou-se ao extremamente sensível método de PCR, maior praticidade, menor tempo para obtenção do resultado e diminuição da possibilidade de contaminação cruzada (LIVAK *et al.*, 1995; HEID *et al.*, 1996; GIBSON *et al.* 1996).

Não levou muito tempo para que fossem desenvolvidos os primeiros testes utilizando a PCR em tempo real para a detecção do RNA do HCV. Uma vez que este método permanece sensível e a visualização da cinética da PCR permite a resolução de uma ampla faixa de cargas virais sem a necessidade de diluição das amostras, ele vem se mostrando como a alternativa buscada para a detecção e quantificação do RNA do HCV (TAKEUCHI *et al.* 1999; KLEIBER *et al.*, 2000; KOMURIAN-PRADEL *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICATIVAS

Devido à prevalência da soropositividade para o HCV no Brasil ser de 0,8% a 3% e considerando-se a morbidade e mortalidade em um percentual significativo destes indivíduos, a infecção pelo HCV tem caráter de problema de saúde pública.

Como não existe vacina para evitar a ocorrência de novos casos e o tratamento além de muito caro é inefetivo em mais da metade dos casos, faz-se necessário à conscientização dos indivíduos pertencentes a grupos de risco para esta doença, bem como evitar a transmissão por transfusão sangüínea e práticas que envolvam contato com sangue contaminado.

Ainda que os ensaios sorológicos empregados tenham virtualmente eliminado o contágio de HCV através do recebimento de sangue, existe um risco residual principalmente devido à janela imunológica que se encontram alguns doadores de sangue. A possibilidade de detecção do RNA do vírus antes que a resposta sorológica seja passível de detecção permite uma redução adicional à probabilidade de transmissão do HCV por transfusão sangüínea.

A quantificação do RNA do HCV tem fundamental importância prognóstico-terapêutica, determinando muitas vezes a interrupção do tratamento em pacientes que sabidamente não se beneficiarão dos mesmos.

A utilização da PCR em Tempo-Real na avaliação de amostras séricas de pacientes infectados pelo HCV, reúne características qualitativas e quantitativas em um único teste, representando um avanço em relação à prática corrente, onde metodologias diferentes são usadas separadamente para detecção e quantificação.

A disponibilidade em nosso meio de tecnologia para realização de testes de RT-PCR em Tempo-Real (ABI PRISM 7000 SDS[®]), a necessidade do desenvolvimento de alternativas aos atuais, altamente custosos, *kits* laboratoriais e a relevância da infecção pelo HCV em nosso país motivou o desenvolvimento desse trabalho.

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

-Desenvolver um teste para diagnóstico qualitativo e quantitativo da infecção pelo HCV, utilizando metodologia de PCR em Tempo-Real.

-Desenho dos iniciadores e sonda baseando-se em consenso de seqüências realizadas a partir de amostras do HCV encontradas no Brasil.

-Avaliar este teste quanto à sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade em relação ao método baseado em PCR competitiva, já comercializado e utilizado rotineiramente.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1. Amostra populacional estudada

Foram testadas no presente trabalho amostras de sangue colhido em EDTA, fracionadas em plasma e mandadas sob refrigeração para o Laboratório Central (LACEN) do Estado do Paraná. Estas amostras foram testadas pelo Amplicor Monitor HCV 2.0[®] (Roche) antes do envio. Este *kit* diagnóstico é baseado em RT-PCR competitiva permitindo a quantificação do HCV plasmático na faixa de 600 UI/ml (540 cópias/ml) a 850.000 UI/ml (765.000 cópias/ml). Foram enviadas 42 amostras de plasmas previamente quantificadas (genótipo 1), 4 amostras apenas genotipadas (genótipos 2 & 3) e uma amostra classificada como abaixo do limite de detecção do teste (<600 UI/ml). Para avaliar o desempenho do nosso teste frente a uma faixa mais ampla de diferentes cargas virais, foram geradas diversas diluições em plasma negativo para HCV (controle negativo Roche Ampliscreen[®]) a partir das amostras fornecidas.

Para determinação da especificidade foram testadas 3 amostras de plasma sabidamente negativas para RNA HCV (Roche Ampliscreen[®]) e uma amostra negativa segundo avaliação do AMPLICOR HCV MONITOR 2.0[®].

As amostras previamente quantificadas pelo Amplicor Monitor HCV 2.0[®] e as diluições produzidas a partir destas amostras foram testadas paralelamente a uma curva padrão, à medida que eram disponibilizadas pelo LACEN. Foram realizadas 84 reações de extração de RNA, reação de cDNA (transcrição reversa), e reação de

PCR em tempo real: 42 amostras previamente testadas pelo Amplicor Monitor HCV 2.0[®], 34 alíquotas de diluições das amostras originais em 1:2, 1:10, 1:100, duas amostras do genótipo 2 e duas amostras do genótipo 3, além de 3 amostras de plasma controle negativo (Roche Ampliscreen[®]) e uma amostra negativa segundo avaliação pelo Amplicor Monitor HCV 2.0[®].

O Amplicor Monitor HCV 2.0[®] quantifica amostras em UI (unidades internacionais) por ml, sendo que uma 1 UI corresponde a 0,9 cópias de RNA HCV para este *kit*. A padronização dos resultados de testes quantitativos para HCV em “UI/ml” se origina de uma iniciativa da Organização Mundial de Saúde de homogeneizar os resultados de testes previamente desenvolvidos através do fornecimento aos laboratórios interessados de um painel quantitativo com resultados expressos em unidades internacionais (SALDANHA *et al.* 1997).

4.2. PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS TaqMan[®]

O desenvolvimento da PCR em Tempo Real resultou da complementação da técnica de PCR criada por MULLIS (1986) com tecnologia de fluoróforos, óptica e informática.

Em uma PCR tradicional, o produto da reação, ou seja, o alvo molecular amplificado exponencialmente, é detectado após o término da reação, por eletroforese em gel, coloração deste produto com um ligante de DNA e obtenção de imagem.

A tecnologia de PCR em Tempo Real prevê a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado, ao contrário do método original.

Na PCR em Tempo-Real, acrescenta-se, além dos iniciadores utilizados na PCR tradicional, um terceiro oligonucleotídeo (sonda TaqMan[®]), com sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula *quencher*, capaz de, por um fenômeno físico denominado FRET- *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo após este ser estimulado por luz de comprimento de onda específico. Nesse trabalho foram usados 6-carboxifluoresceína (FAM) e 6-tetrametilcarboxirrodamina (TAMRA) como fluoróforo e *quencher*, respectivamente.

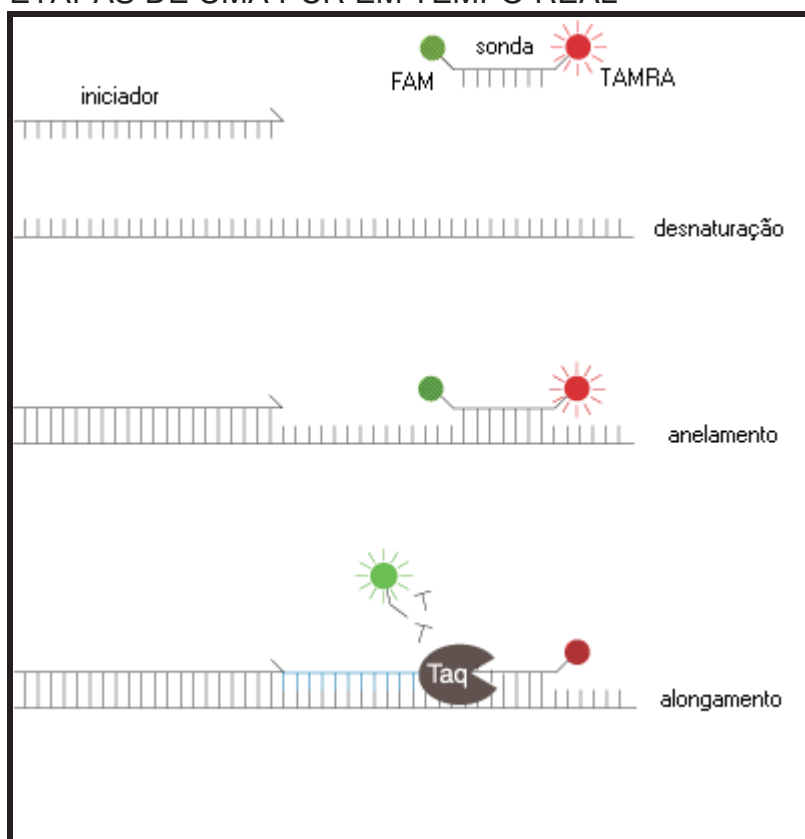
Devido à propriedade 5'-3' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase na reação de PCR, ocorre, durante a fase de extensão dos iniciadores, a separação de FAM e TAMRA da mesma molécula, o que abole o FRET, neste caso a fluorescência de FAM é captada pelo sistema óptico do aparelho de PCR em Tempo Real (FIGURA 4).

À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, aumenta o número de fluoróforos FAM livres do fenômeno FRET e conseqüentemente a fluorescência gerada. Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge determinado limiar significativamente acima da fluorescência basal da reação e localizado na fase exponencial da mesma, o *software* do sistema correlaciona o ciclo que isto ocorre (Ct) com as informações decorrentes da curva padrão paralela à reação, o que possibilita a quantificação das amostras.

Como demonstra a figura 5, ao final da reação, nos últimos ciclos da PCR (eixo x), o Delta Rn, variação na fluorescência (eixo y), que corresponde à quantidade de produto de PCR gerado, tende a convergência (eixo x). Fica clara a percepção que nessas 6 diluições em \log_{10} as amostras cruzam o limiar (linha verde) em ciclos

diferentes e de maneira linear, permitindo considerável resolução. Na PCR cuja etapa de detecção se dá ao fim da reação, esta capacidade de resolução sofre séria limitação.

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE UMA PCR EM TEMPO REAL

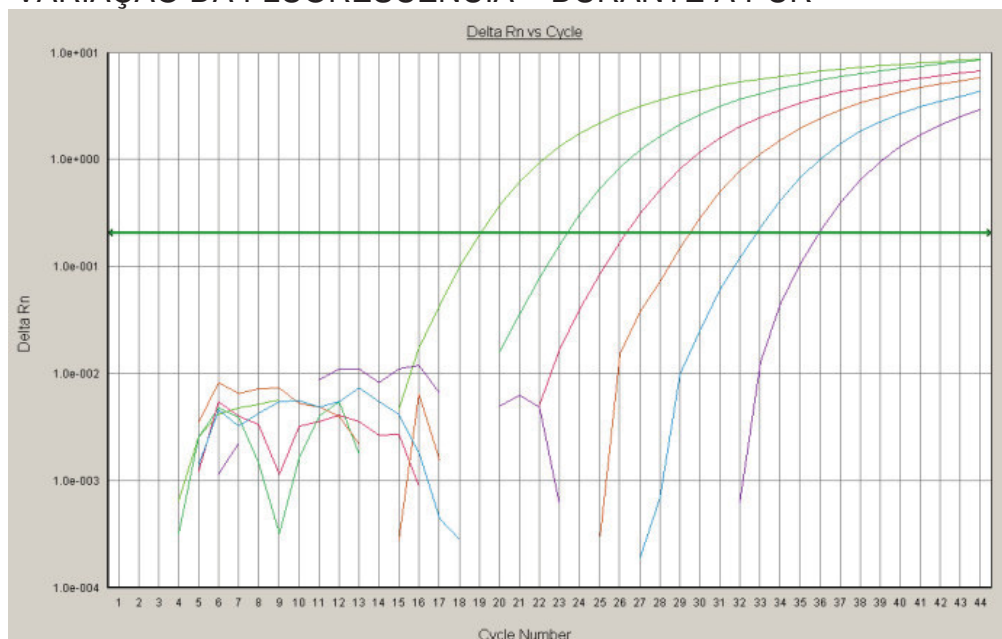


FAM=6-carboxifluoresceína; TAMRA= 6-tetrametilcarboxirrodamina

É a propriedade de permitir uma avaliação da reação de PCR em sua fase exponencial que qualifica a PCR em Tempo-Real como metodologia quantitativa. Além disso, não existe comprometimento da sensibilidade original associada à técnica de PCR, o que também a credencia como metodologia qualitativa.

Em suma, este sistema informa se está ocorrendo a amplificação da molécula alvo (separação de *fluoróforo-quencher*) e quantifica esta amplificação, uma vez que o *software* do sistema correlaciona a intensidade do sinal com a quantidade de amplificado formado.

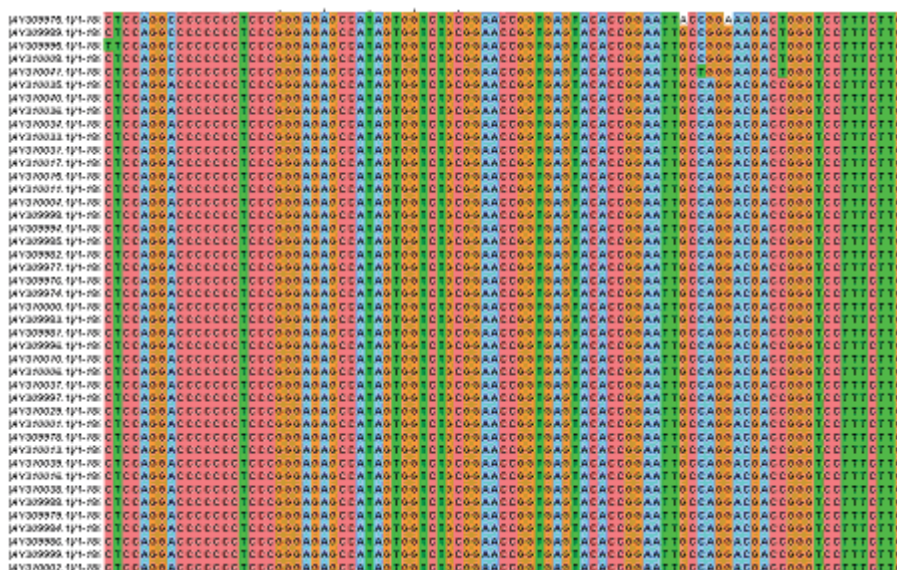
FIGURA 5. CURVA PADRÃO,.06 CONCENTRAÇÕES DIFERENTES VARIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DURANTE A PCR



4.3. Desenho dos oligonucleotídeos

Uma vez que um dos objetivos desse estudo foi de otimizar o desempenho do teste para as variante do HCV encontradas no Brasil, o desenho dos oligonucleotídeos baseou-se em seqüências depositadas no *GenBank* a partir de amostras obtidas nas 5 regiões do Brasil.

Através do *software* CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997), 500 seqüências da região 5'UTR do genoma do HCV foram alinhadas para que fosse definido o segmento mais conservado para desenho de nossos oligonucleotídeos (FIGURA 6).

FIGURA 6. AMOSTRA DO ALINHAMENTO REALIZADO.

Utilizou-se o *software* Primer Express® (Applied Biosystems) para gerar um conjunto de iniciadores e sondas para teste, para posterior seleção do conjunto que apresentasse melhor resultado (TABELA 2).

TABELA 2. CONJUNTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA TESTE.

DENOMINAÇÃO	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO NO GENOMA *	PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO (pares de base)
HCV1F HCV1R HCV1P	CGGGAGAGCCATAGTGGT CGGACCCAACACTACTC FAM-TGCGGAACCGGTGAGTACACC-TAMRA	130-147 256-273 149-169	144
HCV2F HCV2R HCV2P	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCG CTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCAC FAM-TGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACA-TAMRA	62-90 283-311 144-167	250
HCV3F HCV3R HCV3P	CGTGCCCCCGCAAGA AGCACCCATCAGGCAGTACCA FAM-GGCCTTTTCGCAACCCAACGCT-TAMRA	232-246 284-305 260-280	74
HCV4F HCV4R HCV4P	TAGCCATGGCGTTAGTATGAGT GGTTCCGCAGACCACTATG FAM-TCGTACAGCCTCCAGGCCCC-TAMRA	80-101 139-157 103-122	78
HCV5F HCV5R HCV5P	GGCCTTGTGGTACTGCCTGATA GCGACGGTTAGTGTTCCTTTTG FAM-CGTGCACCATGAGCACAAATCC-TAMRA	277-298 374-395 103-122	119

*Seqüência de referência (GenBank, [AF009606](#))

4.4. Obtenção do RNA

A obtenção do RNA foi realizada através do *kit* NucliSens® miniMAG (Biomerieux). Trata-se de uma metodologia de extração de ácido nucléico baseada na propriedade de ligação de ácidos nucléicos à sílica. Em particular neste método, utiliza-se uma sílica paramagnética, que por atração a uma barra magnética facilita as sucessivas lavagens e eluição final do ácido nucléico (RNA ou DNA).

O plasma gentilmente cedido pelo Laboratório Central (LACEN) do Paraná foi transportado em gelo seco e mantido em -70°C até o dia da extração, o que variou de 1 a 30 dias. Uma alíquota de 1 ml de plasma foi definida como quantidade para extração e a eluição realizada em 40 µl.

4.5 Reação de transcrição reversa

A partir de 20 µl, dos 40 µl de RNA obtido através da extração da amostra, procedeu-se a reação de transcrição reversa do RNA, utilizando o *kit TaqMan Reverse Transcription Reagente* ABI®. Este *kit* utiliza iniciadores randômicos e a enzima MML (*moloney murine leukemia*) para formação de cDNA que será utilizado para a subsequente reação de PCR.

As condições de termociclagem para formação do cDNA foram: 10 minutos a 25°C para anelamento dos iniciadores randômicos; 30 minutos a 42°C para extensão dos iniciadores e 5 minutos a 95°C para inativação da enzima. O volume final da reação foi de 50 µl.

4.6 Reação de PCR em tempo real

Dos 50 µl da reação de cDNA, foram utilizados 20 µl para a reação de PCR em Tempo Real. Esta reação foi feita utilizando-se o *kit* TaqMan PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems) em um volume correspondente a 50% do volume final da reação, os iniciadores anterógrado 5'- CGGGAGAGCCATAGTGGT-3' e reverso 5'- CGCGACCCAACACTACTC-3' em uma concentração final de 400 nM cada e 200 nM da sonda 5'-FAM- TGCGGAACCGGTGAGTACACC-TAMRA-3'

Utilizando a plataforma tecnológica ABI PRISM 7000 SDS, as condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo a duração da reação de cerca de 2 horas.

4.7. Construção da curva padrão externa

A quantificação da PCR em Tempo Real é feita com base em uma curva padrão externa que consiste em alíquotas de concentrações conhecidas do alvo molecular objeto do estudo. A amplificação e detecção da curva padrão são realizadas paralelamente a amplificação das amostras que se quer quantificar.

A construção desta curva foi feita a partir da inserção da região 5'UTR do HCV no plasmídeo pGEM[®]-T Easy Vector. O plasmídeo com o inserto foi obtido em quantidade suficiente através de mini-preparação de plasmídeo, linearizado com a enzima *Pst*I e quantificado utilizando espectrofotometria.

Sabendo-se o número de pares de bases do plasmídeo e a quantidade do mesmo, pode-se estimar o número de cópias de plasmídeos por microlitro de solução.

Foram obtidas seis diluições: 250000 cópias/ μ l (5000000 cópias/reação), 25000 cópias/ μ l (500000 cópias/reação), 2500 cópias/ μ l (50000 cópia/reação), 250 cópias/ μ l (5000 cópias/reação), 25 cópias/ μ l (500 cópias/reação), 2,5 cópias/ μ l (50 cópias/reação). Alíquotas de cada diluição foram armazenadas à -70°C .

5. RESULTADOS

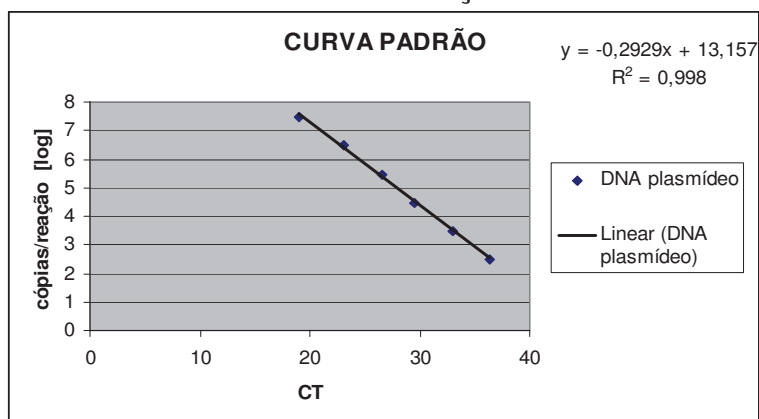
Foram realizadas ao todo seis corridas para avaliação da curva padrão externa, utilizando seis diluições em cada curva, num total de 36 reações. Foi possível observar o Ct que cada uma das concentrações gerou a reprodutibilidade através do coeficiente de variação (CV) e a especificidade do teste pela não obtenção de sinal em nenhuma dos controles negativos adicionadas em cada corrida, nos quais não havia moléculas alvo. A média do coeficiente de variação foi de 2,1% (FIGURA 7; TABELA 3).

TABELA 3. AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DA CURVA PADRÃO

CURVAS PADRÃO CÓPIAS/REAÇÃO	Ct (curva1)	Ct (curva2)	Ct (curva 3)	Ct (curva 4)	Ct (curva 5)	Ct (curva 6)	média	DP	CV
5000000	19,61	19,05	18,12	18,98	19,05	19,09	18,98	0,481318	2,50%
500000	24,05	23,34	22,15	22,65	23,47	22,89	23,09	0,670177	2,90%
50000	27,03	26,28	25,88	27,05	26,27	26,96	26,57	0,498775	1,90%
5000	30,57	29,44	28,65	30,1	29,51	29,16	29,57	0,680571	2,30%
500	33,61	32,77	32,19	33,45	32,5	33,33	32,97	0,572495	1,70%
50	36,6	35,94	35,8	36,88	36,73	35,86	36,30	0,48672	1,30%

Ct= *threshold cycle*, DP=Desvio Padrão e CV= Coeficiente de Variação

FIGURA 7. REGRESSÃO LINEAR DA CURVA PADRÃO: CORRELACIONANDO NÚMERO DE CÓPIAS NA REAÇÃO X Ct



Foram realizadas 84 reações de extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real com o objetivo de detectar e quantificar o RNA do HCV (76 amostras e diluições do genótipo "1" previamente quantificado pelo AMPLICOR HCV MONITOR 2.0[®], quatro amostras apenas genotipadas previamente (genótipos "2" e "3"), três controles negativos Roche Ampliscreen[®] e uma amostra negativa pelo AMPLICOR HCV MONITOR[®]). Através do Ct obtido para cada reação, o número de cópias foi calculado pelo *software* da plataforma SDS ABI 7000[®] interpolando o Ct de cada reação, na relação linear observada entre os Ct da curva padrão externa e respectivos números de plasmídeos (TABELA 4), (FIGURA 7).

TABELA 4. RESULTADO DAS REAÇÕES EM Ct E NÚMERO DE EQUIVALENTES DE CÓPIAS POR REAÇÃO BASEADO NA CURVA PADRÃO EXTERNA

AMOSTRAS	Ct	Nº Eq.cópias por reação	AMOSTRAS	Ct	Nº Eq.cópias por reação	AMOSTRAS	Ct	Nº Eq.cópias por reação
1	27,65	29951	27	23,13	413119	53	36,45	96
2	25,68	116042	28	23,96	237611	54	26,57	278190
3	34,16	340	29	24,88	133397	55	26,4	310678
4	27,48	33783	30	26	64725	56	26,57	278070
5	36,9	51	31	26,65	56273	57	26,69	35894
6	39,82	6	32	27,05	33987	58	26,57	38798
7	29,6	7826	33	20,61	2260000	59	27,27	176367
8	33,64	486	34	23,66	285151	60	27,24	180016
9	36,67	60	35	24,07	216219	61	27,17	187954
10	21,16	1600000	36	24,23	193543	62	28,27	92353
11	22,22	768712	37	24,45	167447	63	28,21	96184
12	30,49	2443	38	28,09	14065	64	28,18	98019
13	20,03	3520000	39	36,53	45	65	23,06	419494
14	21,95	923217	40	39,7	5	66	21,66	1078415
15	28,45	6572	41	40,95	2	67	34,02	193,65
16	25,01	64745	42	25,8	66675	68	34,04	191,48
17	22,97	250519	43	25,69	165096	69	30,65	2198,05
18	27,81	10082	44	25,64	170810	70	33,28	331,04
19	25,83	37621	45	25,72	160852	71	34,89	103,72
20	25,34	52021	46	31,1	3615	72	35,81	53,18
21	24,07	121177	47	32,48	1417	73	34,58	129,31
22	23,06	236589	48	32	1963	74	33,97	200,83
23	21,6	622600	49	32,71	1216	75	33,53	274,98
24	33,51	229	50	32,94	1040	76	33,41	300,05
25	30,09	2217	51	35,29	210			
26	29,7	2876	52	ausente				

Com exceção de uma alíquota diluída para o equivalente a 39 UI/ml e dos controles negativos, foram obtidos valores de Ct e, conseqüentemente, número de cópias para todas as reações. Dado que a eficiência da extração é cerca de 83% (informação do fabricante), que é utilizado 50% do extraído para a reação de cDNA e 40% deste é usado para reação de PCR em tempo real; a partir do número de equivalentes de cópias encontrado por reação pode-se estimar o número de cópias que estariam presentes em cada mililitro de plasma ao início da extração (ver apêndice). A série de assunções descritas acima foi feita para possibilitar a

comparação do ensaio desenvolvido neste trabalho com os resultados encontrados pelo Amplicor HCV Monitor[®] expressos em equivalentes de cópias por ml de plasma (ver APÊNDICE). Desta maneira correlacionou-se os valores obtidos pelos 2 testes (TABELA 5).

TABELA 5. NÚMERO DE EQUIVALENTES DE CÓPIAS (LOG)/ml, AMPLICOR HCV MONITOR[®] X PCR EM TEMPO REAL

AMOSTRAS	AMPLICOR HCV [®] Eq. Número de cópias (log)/ml	TEMPO REAL Eq. Número de cópias (log)/ml	AMOSTRAS	AMPLICOR HCV [®] Eq. Número de cópias (log)/ml	TEMPO REAL Eq. Número de cópias (log)/ml	AMOSTRAS	AMPLICOR HCV [®] Eq. Número de cópias (log)/ml	TEMPO REAL Eq. Número de cópias (log)/ml
1	5,07	5,26	27	5,28	6,40	54	4,96	5,73
2	5,46	5,84	28	4,98	6,16	55	4,96	5,79
3	3,47	3,31	29	4,67	5,91	56	4,96	5,56
4	5,24	5,31	30	4,37	5,59	57	4,66	5,33
5	2,43	2,49	31	4,07	5,53	58	4,66	5,31
6	1,47	1,56	32	3,77	5,31	59	4,36	5,25
7	4,50	4,67	33	5,88	7,13	60	4,36	5,17
8	3,50	3,47	34	5,88	6,23	61	4,36	4,11
9	2,50	2,56	35	5,86	6,11	62	4,06	5,03
10	5,88	6,98	36	5,79	6,07	63	4,06	4,94
11	5,88	6,67	37	5,79	6,00	64	4,06	4,98
12	4,59	4,17	38	5,73	4,93	65	5,88	6,40
13	5,88	7,33	39	3,45	2,43	66	5,88	6,81
14	5,88	6,75	40	2,45	1,48	67	1,65	3,07
15	3,57	4,60	41	1,45	1,08	68	1,65	3,06
16	4,57	5,59	42	5,56	5,60	69	1,65	4,12
17	5,57	6,18	43	5,08	6,03	70	1,65	3,30
18	3,71	4,78	44	5,08	6,04	71	1,65	2,80
19	4,41	5,36	45	5,08	5,94	72	1,65	2,51
20	4,41	5,50	46	4,18	4,82	73	1,65	2,89
21	4,71	5,86	47	4,18	4,34	74	1,65	3,08
22	5,01	6,15	48	3,78	3,93	75	1,65	3,22
23	5,41	6,57	49	3,78	4,07	76	1,65	3,26
24	1,95	3,14	50	3,78	3,86			
25	2,96	4,13	51	2,38	3,10			
26	3,43	4,24	53	2,38	2,76			

Os resultados obtidos em relação aos Ct variaram entre 20,03 a 40,25 sendo que os extremos encontrados em relação à curva padrão externa foram de 18,12 e 36,73. O número de equivalentes de cópias encontradas variou de 1,08 log₁₀ a 7,33 log₁₀ por mililitro de plasma, abrangendo uma faixa de quantificação de cerca de 6 log.

O coeficiente de correlação dos testes foi de 0,91 ($p < 0,001$); os valores encontrados nos testes foram representados em um plano cartesiano, o que possibilitou uma avaliação inicial visual da concordância dos testes, onde se observa a distribuição dos resultados em relação a uma linha de igualdade, que representaria a concordância total dos testes (FIGURA 8). Uma avaliação mais informativa da concordância dos testes foi obtida através da aplicação da metodologia descrita por BLAND-ALTMAN (FIGURA 9).

FIGURA 8. CORRELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE EQUIVALENTES DE CÓPIAS (LOG_{10})/ml, AMPLICOR x PCR TEMPO-REAL

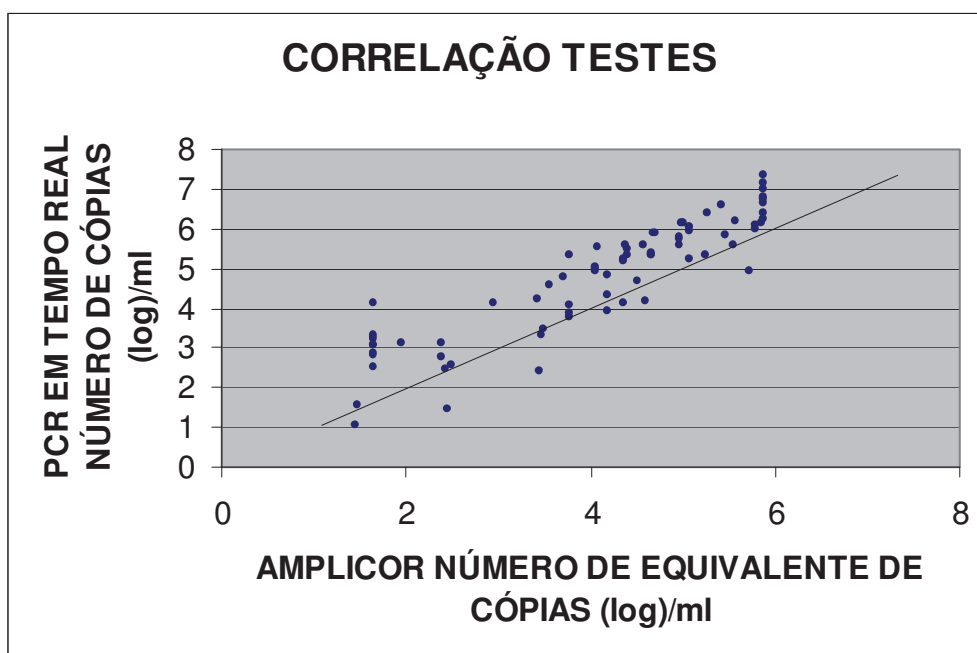
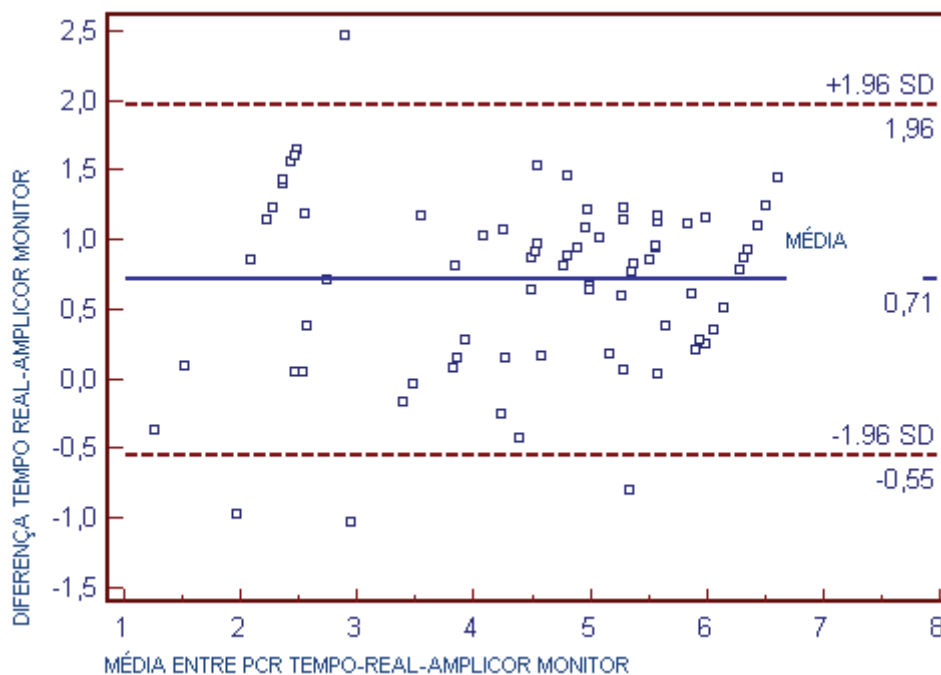


FIGURA 9 CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES ATRAVÉS DA METOLOGIA DE BLAND-ALTMAN



Esta avaliação revela uma média da diferença entre os testes de 0,70 log (0,56 log a 0,85 log, intervalo de confiança de 95%), com desvio padrão de 0,64, evidenciando uma consistente obtenção de valores maiores pelo teste baseado em tempo real. Os limites de concordância encontrados foram: superior de 1,96 log (1,7 log a 2,2 log, com intervalo de confiança de 95%) e inferior de -0,55 log (-0,79 log a -0,29 log, com intervalo de confiança de 95%).

Na avaliação da sensibilidade do teste avaliou-se 10 alíquotas geradas a partir da diluição de uma amostra quantificada pelo Amplicor HCV Monitor® para que as mesmas tivessem cargas virais equivalentes a 50 UI/ml, Foram obtidos Cts em todas as amostras (TABELA 6).

Em relação à precisão do teste baseado em PCR em tempo-real pôde-se avaliá-lo frente a cinco valores de quantificação diferentes segundo o teste Amplicor HCV MONITOR®, sendo cada alíquota testada em triplicata em dois dias

consecutivos em um total de 30 reações (TABELA 7). O coeficiente de variação apresentou tendência a maiores valores nas alíquotas de menor número de cópias e na avaliação inter-ensaios. As médias dos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 0,42% e 1,8% respectivamente.

Na avaliação das duas amostras genótipo 2 e das duas amostras genótipo 3, todas foram detectadas e quantificadas, no entanto não havia dado prévio sobre sua quantificação para correlação.

Em uma avaliação limitada da especificidade do teste foram testadas 3 amostras de plasma controle negativo Ampliscreen Roche® e uma amostra negativa segundo avaliação do Amplicor HCV Monitor®, todas foram negativas.

TABELA 6. SENSIBILIDADE ANALÍTICA

AMPLICOR HCV MONITOR	Ct	AMPLICOR HCV MONITOR	Ct
50 UI	34,02	50 UI	35,81
50 UI	34,04	50 UI	34,58
50 UI	30,65	50 UI	33,97
50 UI	33,28	50 UI	33,53
50 UI	34,89	50 UI	33,41

TABELA 7. AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DO TESTE (COEFICIENTE DE VARIAÇÃO-CV)

AMPLICOR (UI/ml)	CV (Ct) intra-ensaio (%)	CV (Ct) inter-ensaio (%)
6676 UI/ml	1,2	2,8
12746 UI/ml	0,2	0,8
25493 UI/ml	0,2	2,4
101975 UI/ml	0,4	2,4
134318 UI/ml	0,1	0,6

6. DISCUSSÃO

Devido à significativa prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C em nosso país, a morbidade e mortalidade a ele associadas, a ausência de vacinas e resultados limitados do tratamento, faz-se necessário evitar o surgimento de novos casos da doença. Devido ao fato do contágio do HCV se dar pelo contato com sangue contaminado, os grupos em risco são, principalmente, formados por pacientes que receberam transfusão de sangue (principalmente antes da década de 90) e usuários de drogas injetáveis que compartilham seringas e agulhas contaminadas.

Aliado à conscientização da população sobre as formas de contágio e como evitá-lo, o desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico tem importância fundamental no controle epidemiológico desta doença.

Ainda que os testes sorológicos tenham sido os responsáveis pela queda dramática dos casos de transmissão transfusional na década de 90, ainda persiste um risco residual a ser eliminado. Os testes moleculares são candidatos a este propósito por anteciparem o diagnóstico. Além disso, são empregados largamente na atualidade como ferramentas de auxílio no planejamento terapêutico.

A tecnologia de PCR em Tempo Real tem o potencial de aplicação como um teste sensível o suficiente para o diagnóstico e confirmação da eliminação do vírus nos casos de tratamento bem sucedido e também como teste quantitativo capaz de monitorar a queda na carga viral de pacientes em tratamento. Entre as vantagens desta metodologia destacam-se a avaliação da dinâmica da reação de PCR enquanto

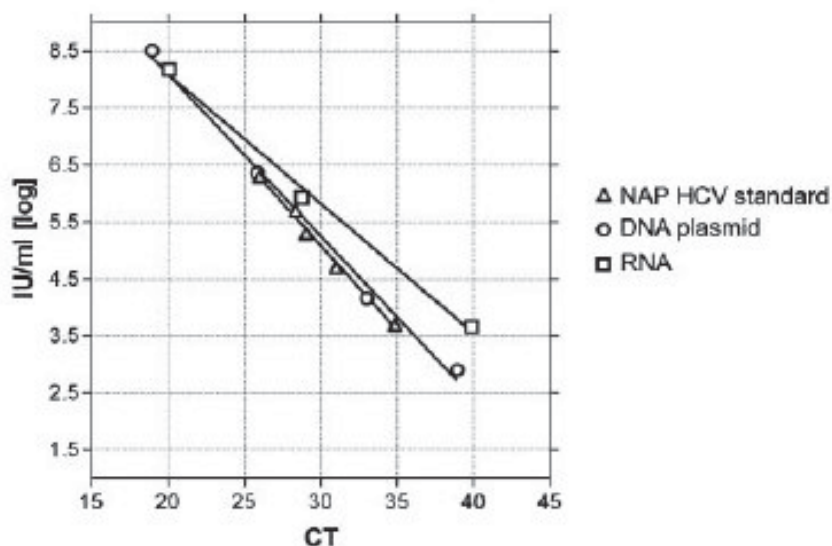
esta ocorre, permitindo a resolução de diferentes quantidades de ácido nucléico, tempo reduzido de processamento das amostras e menor taxa de contaminação cruzada, uma vez que ao final da reação de PCR não há necessidade de procedimentos adicionais para detecção e quantificação.

Optou-se por extrair RNA a partir de 1ml de plasma com o intuito de aumentar a sensibilidade do teste, diminuindo as limitações estocásticas de detecção nas amostras com menor número de partículas virais. A padronização de um teste para detecção do RNA do HCV que utilize 1ml de plasma para extração pode ter desdobramentos favoráveis quando se considera sua aplicabilidade junto à estratégia de detecção de ácido nucléico empregada na triagem de bancos de sangue, que prevê a formação de *mini-pools* plasmáticos. A formação destes *mini-pools* tem como objetivo a otimização custo-benefício do procedimento.

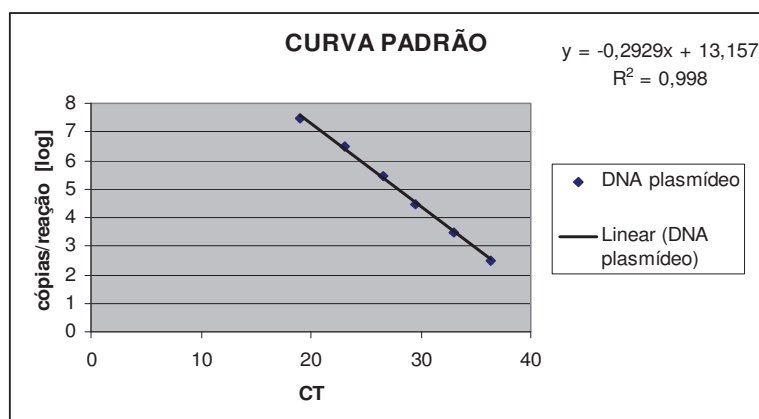
A utilização de uma curva padrão externa composta de seis diluições logarítmicas de plasmídeo apresentou boa reprodutibilidade e linearidade, o que possibilitou a obtenção de resultados quantitativos para uma ampla faixa de valores. Em que pese às limitações desta curva: ausência de controle para a extração de RNA e reação de transcrição reversa, uma recente avaliação utilizando uma metodologia semelhante observou maior similaridade entre o *slope* gerado por uma curva padrão baseada em plasmídeos e painel comercial para HCV (Acrometrix[®]), do que esta e uma terceira curva baseada em RNA (COOK *et al.*, 2004) (FIGURA 10). Os autores do trabalho referido utilizaram uma curva padrão baseada em plasmídeos com excelente resultado. Não obstante, entende-se que a dificuldade de cultivo do HCV e o alto custo de painéis internacionais para utilização como curva padrão externa aponta para a necessidade do desenvolvimento de um calibrador a ser

utilizado com função de curva padrão externa e como controle interno de cada reação, possibilitando o controle de todas as fases implícitas nesta metodologia.

FIGURA 10. RESULTADO DE DIFERENTES CURVAS PADRÃO



a) Regressão linear de 03 curvas padrão, COOK *et al.*, 2004



b) Regressão linear da reação da curva padrão desta tese (DNA plasmídeo).

Em relação à sensibilidade analítica deste teste, foram avaliadas 10 replicas, desde sua extração, transcrição reversa e reação de PCR em tempo real,

quantificadas pelo Amplicor HCV Monitor 2.0[®] como 50 UI/ml. Todas foram detectadas (TABELA 6). Os testes correntemente comercializados para fim qualitativo variam em sua sensibilidade analítica, por exemplo, o Amplicor HCV[®] tem como limite de detecção 50 UI/ml, já um outro teste comercializado baseado em amplificação mediada por transcrição (TMA) tem sensibilidade analítica de 10 UI/ml (VERSANT HCV RNA[®]). Em um estudo comparativo entre os dois testes, a concordância na determinação de pacientes com resposta sustentada ao tratamento (RNA do HCV não detectável 24 e 48 semanas após o término do tratamento) foi plena, o que estabelece 50 UI/ml como o mínimo de sensibilidade analítica necessária em um teste qualitativo para HCV (DESOMBERE *et al.*, 2005). Os resultados obtidos no presente trabalho o caracterizam com propriedades qualitativas, uma vez que demonstrou desempenho semelhante aos testes comercializados atualmente com esta finalidade.

Uma vez que os atuais protocolos de manejo terapêutico baseiam suas decisões de continuidade ou não de tratamento a partir da queda de no mínimo 2 \log_{10} na carga viral após 12 semanas de tratamento, um teste quantitativo deve ter precisão suficiente para servir de referência segura a esta decisão. A média do coeficiente de variação inter-ensaio (Ct) obtido com a curva padrão externa baseada em plasmídeos foi muito semelhante à obtida frente às cinco diferentes concentrações das amostras (2,1%; 1,8%, respectivamente, TABELAS 3 e 7), o que indica boa reprodutibilidade da metodologia utilizada.

Ainda em relação à média dos coeficientes de variação (0,42% intra-ensaio e 1,8% inter-ensaio), pode-se observar que foram muito semelhantes aos obtidos em trabalhos anteriores (COOK *et al.*, 2004; CASTELAIN *et al.*, 2004; BARBEAU *et al.*,

2004). O teste desenvolvido tem uma reprodutibilidade considerada adequada para sua finalidade, restando a necessidade de uma reavaliação quanto esta reprodutibilidade quando expressar resultados em UI/ml após sua calibração contra um painel concordante com a padronização internacional.

A faixa de determinação das diferentes cargas virais foi considerada ampla, cerca de 6 log, duas vezes maior que a do Amplicor HCV Monitor 2.0[®]. Isto tem significativa relevância em relação a testes quantitativos para HCV, pois a variação da concentração sérica do HCV abrange uma ampla faixa. A tradução prática deste fato é que a utilização da metodologia em tempo real evitaria a necessidade de testes adicionais com diluição das amostras quantificadas como acima de 850.000 UI/ml ao Amplicor HCV Monitor 2.0[®], o que diminuiria os custos associados ao teste. Uma amostra quantificada apenas como maior que 850.000 UI/ml poderia ser maior 1 log, 2 log, etc, o que em tese poderia comprometer a tomada de decisão clínico-terapêutica. A ampla faixa de quantificação possibilitada pelo teste desenvolvido neste trabalho deve se manter semelhante quando futuramente calibrado contra painéis internacionais confiáveis, o que evitaria a necessidade de diluições e retestes das mesmas amostras, caracterizando-o como um teste econômico e de maior rapidez na obtenção dos resultados.

Na comparação dos dois testes encontrou-se um ótimo coeficiente de correlação, $r = 0,91$ ($p < 0,001$), o que era esperado em relação a dois testes medindo uma mesma grandeza nas mesmas amostras biológicas. No entanto, a avaliação através da metodologia de Bland-Altman e considerando a aplicação clínica do teste, mostra que a concordância entre os dois testes não é boa. Esta avaliação demonstra que os resultados encontrados pela metodologia em tempo real poderiam ser até 2,2

log acima e 0,8 log abaixo do que os determinados pelo Amplicor HCV Monitor 2.0[®], o que prejudicaria a decisão terapêutica baseada na queda da carga viral de no mínimo 2 log. Este resultado não invalida a metodologia empregada no teste desenvolvido neste trabalho. Resultados semelhantes foram descritos na literatura onde avaliações recentes de estudos comparando vários métodos de quantificação do RNA do HCV demonstraram que a concordância apresentada entre os testes quantitativos comercializados atualmente não permite que os mesmos sejam utilizados de maneira intercambiável, apesar de terem resultados expressos segundo a padronização internacional (IU/ml), sugerindo-se que cada centro definisse a metodologia que vai utilizar rotineiramente e, a partir de então, avaliasse as variações na carga viral dos pacientes em tratamento somente com a metodologia definida (SARRAZIN *et al.*, 2006; CALIENDO *et al.* 2006).

Isto posto, acredita-se que a concordância entre o presente teste e o Amplicor Monitor HCV 2.0[®] poderia, potencialmente, ter sido diferente da encontrada. As amostras utilizadas em nosso estudo foram quantificadas em dias diferentes tanto no que se refere ao Amplicor Monitor HCV 2.0[®] como no teste com PCR em tempo real; as amostras foram descongeladas, testadas pelo Amplicor HCV 2.0[®], novamente congeladas e posteriormente disponibilizadas para o teste em PCR em tempo real; e os testes realizados pela metodologia em tempo real foram realizados com diferentes lotes de iniciadores/sondas e reagentes. Eventualmente os testes poderiam ter uma concordância outra se o processamento das amostras se desse simultaneamente e se apenas um único lote de todos os reagentes envolvidos para cada teste fosse utilizado.

Apesar de uma avaliação limitada no que tange o número de amostras avaliadas com o intuito de avaliar a especificidade do teste (quatro amostras), estas resultaram em negativas como esperado.

Dois fatores são críticos na especificidade de testes moleculares baseados em PCR em tempo real: o desenho dos iniciadores e sondas e os parâmetros de temperatura estabelecidos para a termociclagem. Em relação ao desenho de iniciadores e sondas utilizou-se o *software* **BLAST**[®] para uma avaliação *in silico* da especificidade dos oligos, onde se verificou que os mesmos associaram-se apenas a seqüências depositadas de HCV. Em relação às condições de termociclagem, as mesmas permitem adaptações que possam eliminar eventuais resultados falso-positivos, sem detrimento da sensibilidade do teste. Baseando-se nestas premissas, pode-se prever uma especificidade satisfatória em uma planejada expansão da avaliação da especificidade do teste frente a amostras contendo outros patógenos.

Devido à estratégia terapêutica corrente de quantificar apenas os pacientes portadores do HCV de genótipo 1, as amostras quantificadas recebidas eram todas deste genótipo. Amostras que tiveram seus genótipos determinados previamente através do teste InnoLiPA[®], duas do genótipo 2 e duas do genótipo 3, foram testadas e quantificadas no presente trabalho, porém, por não terem sido quantificadas previamente, não se pode estabelecer correlação. O fato da metodologia testada ser capaz de detectar os genótipos 1, 2 e 3 é muito significativo no contexto da avaliação epidemiológica realizada por CAMPIOTTO *et al.* (2006), onde estes genótipos juntos são responsáveis por 99,7% das infecções em todo país.

Baseando-se nestes resultados e considerando-se que a escolha dos iniciadores/sondas utilizados neste teste provém do alinhamento de seqüências

brasileiras representativas dos genótipos predominantes no país, acredita-se que esta metodologia seria adequada para utilização em todo território nacional, ainda que a confirmação dessa previsão dependesse de um estudo que contivesse amostras das 5 regiões do Brasil. As amostras avaliadas no presente estudo limitam-se, em sua grande maioria, a casos de hepatite C do estado do Paraná.

A avaliação inicial da sensibilidade, especificidade, faixa de quantificação, precisão e viés genotípico da presente metodologia para diagnóstico qualitativo e quantitativo da infecção pelo vírus da hepatite C mostrou-se altamente promissora. Alguns desenvolvimentos complementares parecem necessários.

Sendo que a fase de extração de RNA é crítica no que tange a acurácia do teste, assim como outras variáveis podem influir de maneira não homogênea em cada reação, a utilização de um calibrador interno com propriedades biológicas semelhantes ao HCV seria muito importante para que se fizessem correções a partir das alterações de quantificação desse calibrador. Este calibrador deveria ser utilizado também na construção da curva padrão externa. Outro aspecto passível de modificação é a mudança do atual desenho do teste; ao invés da realização de uma primeira reação de transcrição reversa antes da reação de PCR propriamente dita, faria-se uma única reação utilizando uma enzima capaz de realizar a transcrição reversa e a reação de PCR. Além de enzima com as propriedades descritas acima também é necessário adequações de outros reagentes e parâmetros de termociclagem. Esta modificação teria o potencial de tornar o teste mais rápido e menos sujeito a contaminação cruzada, aumentando o número de amostras processadas em um único dia. Esta abordagem já vem sendo utilizada com ótimos resultados.

Finalmente após estes desenvolvimentos o teste deve ser calibrado contra um painel validado pela Organização Mundial de Saúde que visa à homogeneização dos resultados sendo obrigatoriamente expressos em unidades internacionais por ml (UI/ml).

7. CONCLUSÕES

Em virtude das limitações dos ensaios sorológicos para a hepatite C, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de diagnóstico laboratorial capazes de antecipar o diagnóstico da infecção, diferenciar os pacientes com infecção ativa daqueles com cicatriz sorológica e que também possam auxiliar no planejamento terapêutico através quantificação da carga viral.

A metodologia de RT-PCR em tempo real desenvolvida na metade da década de 90 possui características que vêm levando à sua utilização como método de diagnóstico sérico qualitativo e quantitativo do RNA do HCV.

O objetivo do presente trabalho foi o de desenvolver um teste baseado nesta metodologia tendo como plataforma tecnológica o ABI 7000 SDS® e as sondas TaqMan®.

Uma premissa básica deste trabalho é que fosse otimizado para as variantes do HCV encontradas em território nacional, utilizando para tanto seqüenciamentos do genoma viral realizados no Brasil para desenho dos iniciadores e sondas.

Considerando-se a sensibilidade analítica, precisão, especificidade e ampla faixa de resolução quantitativa oferecida pelo ensaio desenvolvido neste projeto, conclui-se que o mesmo atingiu seu objetivo.

Não obstante, alguns desenvolvimentos posteriores são necessários para que se possa avaliar sua utilização em estudos clínicos mais extensos.

REFERÊNCIAS

- Alter, M.J.; Margolis HS, Krawczynski K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **N Engl J Med** 1992; 327:1899-905.
- Anonymous. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. **J Viral Hepat.** 1999 Jan ; 6(1):35-47
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet.** 1986 Feb 8;1(8476):307-10
- Barbeau JM, Goforth J, Caliendo AM, Nolte FS. Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. **J Clin Microbiol.** 2004 Aug;42(8):3739-46.
- Bartenschlager, R., A. Kaul, and S. Sparacio. 2003. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. **Antiviral Res.** 60:91-102
- Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. **J. Virol.** 76, 13001–13014.
- Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, Ferreira-Gonzalez A, Tsongalis GJ, Pyles R, Bremer JW, Lurain NS. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. **J Clin Microbiol.** 2006 May;44(5):1726-32.
- Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jan;38(1):41-9. Epub 2005 Jan 18. Erratum in: *Braz J Med Biol Res.* 2006 Mar;39(3):419.
- Carrilho FJ & Corrêa MCJM (1998). Magnitude of hepatitis B and C in Latin America. In: Schinazi RF, Sommadossi JP & Thomas HC (Editors), *Therapies for Viral Hepatitis*. International Medical Press, Atlanta, GA, USA.
- Castelain S, Descamps V, Thibault V, Francois C, Bonte D, Morel V, Izopet J, Capron D, Zawadzki P, Duverlie G. TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. **J Clin Virol.** 2004 Nov;31(3):227-34

Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C; Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. **J Viral Hepat**. 2001 Mar;8(2):87-95.

Cook L, Ng KW, Bagabag A, Corey L, Jerome KR. Use of the MagNA pure LC automated nucleic acid extraction system followed by real-time reverse transcription-PCR for ultrasensitive quantitation of hepatitis C virus RNA. **J Clin Microbiol**. 2004 Sep;42(9):4130-6.

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. **Science** 244, 359–362.

Desombere I, Van Vlierberghe H, Couvent S, Clinckspoor F, Leroux-Roels G. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. **J Clin Microbiol**. 2005 Jun;43(6):2590-7.

Donahue JG, Munoz A, Ness PM, et al. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. **N Engl J Med** 1992;327:369-73.

Feinstone, S. M., Kapikiana, A. Z., Purcell, R. H. & Holland, P. V. (1975). Transfusion associated hepatitis not due to hepatitis A or B. **N Engl J Med** 292, 767–770

Flint, M., Quinn, E. R., Levy S. In search of hepatitis C virus receptor(s). **Clin Liver Dis** 2001;5: 873-93.

Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet**. 1990 Oct 6;336(8719):878-9.

Germer JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. **Mayo Clin Proc**. 2001 Sep; 76(9):911-20.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res**. 1996 Oct;6(10):995-1001.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. **Genome Res**. 1996 Oct; 6(10):986-94

Ikeda K, Saitoh S, Koida I, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients

with viral and alcoholic cirrhosis. **Hepatology** 1993;18:47-53. 20.

Kato, T. *et al.* Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. **J. Med. Virol.** 64, 334–339 (2001).

Kleiber J, Walter T, Haberhausen G, Tsang S, Babel R, Rosenstraus M. Performance characteristics of a quantitative, homogeneous TaqMan RT-PCR test for HCV RNA. **J Mol Diagn** 2000;2:158–66.

Kobayashi M, Chayama K, Arase Y, Tsubota A, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, Matsuda M, Koike H, Hashimoto M, Kumada H. Related Articles, Links Enzyme-linked immunosorbent assay to detect hepatitis C virus serological groups 1 to 6. **J Gastroenterol.** 1999 Aug;34(4):505-9.

Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Sodoyer M, Chevallier P, Mandrand B, Lotteau V, *et al.* Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. **J Virol Methods** 2001;95:111–9.

Lauer G. M., Walker B. D. Medical Progress: Hepatitis C Virus Infection **N Engl J Med** 2001; 345:41-52, Jul 5, 2001.

Lohmann, V., Koch, J. O. & Bartenschlager, R. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. **J. Hepatol.** 24, 11–19 (1996).

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

Neumann, A. U. *et al.* Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science** 282, 103–107 (1998).

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, *et al.* Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. **N Engl J Med** 1994;330:744-50.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. & Pawlotsky, J. M. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology** 39, 5–19 (2004).

Rice, C. M. e Lindenbach, B.D. 2005.Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature.** 436, 933-938.

Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy.

Arch Virol. 1998;143(12):2493-503

Sarrazin C, Teuber G, Kokka R, Rabenau H, Zeuzem S. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. **Hepatology.** 2000 Oct; 32 (4 Pt 1):818-23

Simmonds P. Variability of the hepatitis C virus genome.

Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1998;(62):38-63.

Sulkowski, M. S., Mast, E. E., Seeff, L. B. & Thomas, D. L. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** 30 (Suppl. 1), S77–S84 (2000).

Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S, Kohara M. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. **Gastroenterology.** 1999 Mar; 116(3):636-42.

Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet.** 1993 Mar 20;341(8847):722-4.

Zein NN, Germer JJ, Wendt NK, Schimek CM, Thorvilson JN, Mitchell PS, Persing DH. Indeterminate results of the second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of high-level c22-3 reactivity and influence of HCV genotypes. **J Clin Microbiol.** 1997 Jan;35(1):311-2.

Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. **J Hepatol** 1999;31:369-76.

APÊNDICE

Cálculo do número de equivalentes genômicos esperado em 1000 µl de plasma:

$$N = n / k' \cdot k'' \cdot k'''$$

N= Cálculo do número de equivalentes genômicos esperado em 1000 µl de plasma

n= número de equivalente de genomas na reação de PCR (50 µl)

K'= 0,83; fração esperada de recuperação do RNA extraído, assumindo consistência nos resultados de extração (1000 µl)

K''= 0,5; fração do RNA extraído utilizado na reação de formação do cDNA (transcrição reversa)

K'''=0,4; fração do cDNA usada na reação de PCR em tempo real