

Hugo Cheinquer

**DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA PELO VÍRUS C:
RELAÇÃO ENTRE QUANTIFICAÇÃO VIRAL, ASPECTOS
DEMOGRÁFICOS, LABORATORIAIS E
HISTOPATOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica
Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção
do título de Doutor em Medicina

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla

Porto Alegre

1996

“Para bem conhecer as coisas, é preciso conhecê-lhes as minúcias e como estas são quase infinitas, nossos conhecimentos são sempre superficiais e imperfeitos.”

La Rochefoucauld

À Sílvia, pelo seu amor.

Aos meus pais, Maurício e Dacia, por serem, acima de tudo, meus amigos.

À memória de meus avós, com os quais aprendi o valor de ter raízes e respeitar tradições.

AGRADECIMENTOS

Esta Tese de Doutorado não é fruto de um trabalho solitário. Ao contrário, representa o esforço de muitos, traduzido em apoio técnico-científico, em palavras de incentivo, em demonstrações de carinho, amizade e amor. Procuro pois, agradecer aqui, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

Em primeiro lugar ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Prolla, mestre e amigo, pela grande disponibilidade e apoio em todas as horas, meu profundo agradecimento.

Expresso também minha gratidão ao Prof. Eugene R. Schiff, Diretor do "Center for Liver Diseases" da Universidade de Miami, pela maneira generosa e afável com que me recebeu em seu serviço e estimulou a realização deste trabalho.

Aos professores Lennox J. Jeffers, Marcelo O. Silva e K. R. Reddy, do "Center for Liver Diseases", pelos ensinamentos valiosos e estímulo constante.

Ao meu irmão Nelson, acadêmico de Medicina, agradeço de coração pelo auxílio incansável em várias etapas da realização deste projeto, desde a revisão bibliográfica até a apresentação final. Seu bom-humor e grande disposição foram vitais para a execução desta tese.

À Prof. Sídia Jacques, do Departamento de Bioestatística da UFRGS, agradeço pela paciência com que orientou a análise estatística deste trabalho.

Aos meus colegas da Enfermaria 42 da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, minha lembrança pelos sábios conselhos e estímulo constante.

Por último, mas não menos importante, minha homenagem aos pacientes deste e de outros estudos. Muito mais do que as anônimas iniciais que os representam, constituem o objetivo final de nosso esforço.

Este trabalho foi realizado com o apoio da CAPES.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico das hepatites virais e a descoberta do VHC	1
1.2. Características do VHC	6
1.3. Métodos de detecção do VHC	10
1.3.1. Detecção dos anticorpos anti-VHC	11
1.3.2. Detecção do RNA do VHC por RT-PCR	13
1.3.3. Quantificação do RNA do VHC	15
1.3.4. Detecção dos antígenos do VHC no tecido hepático	16
1.4. Características da infecção pelo VHC	17
2. OBJETIVOS	21
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1. Casuística	22
3.1.1. Critérios de inclusão	22
3.1.2. Critérios de exclusão	23
3.1.3. Grupo controle	24
3.2. Métodos	24

3.2.1. Análise laboratorial das aminotransferases	24
3.2.2. Pesquisa dos anticorpos anti-VHC por ELISA II	25
3.2.3. Pesquisa dos anticorpos anti-VHC por RIBA II	26
3.2.4. Pesquisa do RNA do VHC pela técnica da RT-PCR	29
3.2.5. Quantificação do RNA do VHC pela técnica de bDNA	31
3.2.6. Análise histopatológica das biópsias hepáticas	33
3.2.7. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Características operacionais do teste de quantificação do RNA do VHC	37
4.2. Correlação entre histopatologia e características dos pacientes com doença hepática crônica C	40
4.2.1. Diagnóstico histopatológico e características demográficas	40
4.2.2. Diagnóstico histopatológico e características laboratoriais	41
4.2.3. Diagnóstico histopatológico e índice de atividade histopatoló- gica de Knodell.....	42
4.3. Correlação entre a viremia do VHC e as características dos pacientes com doença hepática crônica C	43
4.3.1. Quantificação do VHC e características demográficas	43
4.3.2. Quantificação do VHC e características laboratoriais	45
4.3.3. Quantificação do VHC e histopatologia hepática	47
5. DISCUSSÃO	49

5.1. Seleção dos pacientes	50
5.2. Seleção do método de quantificação	54
5.3. Reprodutibilidade dos métodos de quantificação	56
5.4. Acurácia do teste de quantificação do VHC	60
5.5. Quantificação do VHC e características demográficas	64
5.6. Quantificação do VHC e características laboratoriais	65
5.7. Quantificação do VHC e características histopatológicas	69
6. CONCLUSÕES	77
7. ANEXO	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
Abstract	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do genoma do vírus C e proteínas recombinantes	8
Figura 2 - Quantificação do RNA do VHC pelo método do DNA ramificado..	33
Figura 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação histopatológica.....	35
Figura 4 - Características operacionais do teste bDNA	38
Figura 5 - Representação gráfica do valor kappa considerando dois testes diagnósticos: bDNA e RT-PCR	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre histopatologia e características demográficas	41
Tabela 2 - Relação entre histopatologia e aminotransferases (AST e ALT)..	42
Tabela 3 - Relação entre histopatologia e índice de Knodell	43
Tabela 4 - Relação entre viremia e características demográficas	44
Tabela 5 - Relação entre viremia e aminotransferases (AST e ALT)	46
Tabela 6 - Relação entre viremia e histopatologia	48

RESUMO

Com o objetivo de avaliar as características operacionais da quantificação do RNA do vírus da hepatite C (VHC) pelo método do DNA ramificado (bDNA) e correlacionar a taxa de viremia com aspectos demográficos, laboratoriais e histopatológicos da doença hepática crônica C, foram estudados prospectivamente, no período de julho de 1991 à julho de 1992, 107 pacientes provenientes do ambulatório do Serviço de Hepatologia da Universidade de Miami, Flórida, E.U.A.. Todos apresentavam elevação das aminotransferases por mais de seis meses, anticorpos anti-VHC positivos por ELISA II e RIBA II, RNA do VHC positivo por reação em cadeia da polimerase pós-transcriptase reversa (RT-PCR) e diagnóstico histopatológico de hepatite crônica ou cirrose. Quanto ao sexo, 68 dos 107 (63,6%) pacientes eram homens e 39 (36,4%) eram mulheres. A idade variou entre 29 e 84 anos (média de 46,2 +/- 12,6 anos). Com relação à cor, 93 dos 107 (86,9%) pacientes eram brancos, 13 (12,1%) eram pretos e 1 (0,9%) amarelo. Como controles, foram selecionados 41 indivíduos com anticorpos anti-VHC negativos por ELISA II e RIBA II e negativos para o RNA do VHC por RT-PCR, compreendendo 11 pacientes avaliados ambulatorialmente no mesmo período (6 com cirrose biliar primária e 5 com hepatite crônica B), além de 30 voluntários saudáveis. Do total de 107 pacientes positivos para o RNA do VHC por RT-PCR, o teste bDNA foi positivo em 88 (sensibilidade de 82,2%), sendo negativo em todos os controles (especificidade de 100%). A concordância observada entre ambos os testes foi de 87,2%, com índice "kappa" de 0,74. A correlação entre os aspectos demográficos e o grau de atividade histopatológica mostrou que os pacientes com cirrose (CIR) possuíam idade média significativamente superior aqueles diagnosticados como hepatite crônica ativa (HCA) (52,4 +/- 14,3 *versus* 46,8 +/- 12,3 anos; $p < 0,02$) ou

hepatite crônica persistente (HCP) (52,4 +/- 14,3 *versus* 40,8 +/- 8,9 anos; $p < 0,0002$). A média da aminotransferase do aspartato (AST) mostrou-se significativamente superior no grupo CIR quando comparado aos grupos HCA (139,5 +/- 81,4 *versus* 96,4 +/- 40,2 U/l; $p < 0,009$) e HCP (139,5 +/- 81,4 *versus* 87,5 +/- 40,2 U/l; $p < 0,009$). A quantificação do RNA do VHC por bDNA não apresentou relação com os aspectos demográficos e laboratoriais dos pacientes com doença hepática crônica C. Porém, com relação a atividade histopatológica, observou-se que os indivíduos do grupo HCA apresentaram taxa média de viremia significativamente superior aos grupos HCP (16.908.490 +/- 13.654.660 *versus* 3.796.030 +/- 8.075.090 eq RNA-VHC/ml; $p < 0,0000$) e CIR (16.908.490 +/- 13.654.660 *versus* 4.200.030 +/- 5.543.480 eq RNA-VHC/ml; $p < 0,0000$). Concluindo, entre os vários resultados que confirmam dados anteriores ou ampliam os conhecimentos relativos a alguns aspectos da doença hepática crônica C, destaca-se a elevação progressiva da idade com relação à progressão da atividade histopatológica, a concordância substancial entre a quantificação viral por bDNA e a detecção do RNA do VHC por RT-PCR, além do achado de maior taxa média de viremia nos pacientes com HCA em relação aos demais grupos, aqui objetivamente demonstrada.

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DAS HEPATITES VIRAIS E A DESCOBERTA DO VÍRUS DA HEPATITE C

As hepatites virais vêm afligindo a humanidade por vários séculos. Tanto o "Talmud" Babilônico, no século V a.C., quanto os escritos de Hipócrates, no século IV a.C., já mencionavam a existência de formas epidêmicas de icterícia (*apud* RIZZETTO, 1991; *apud* KOFF, 1993). Da mesma maneira, no ano 751 de nossa era, o Papa Zacarias, em carta escrita à São Bonifácio, aconselhava o isolamento de pacientes ictericos para evitar a disseminação do processo (*apud* SHERLOCK, 1989).

Por outro lado, a transmissão parenteral das hepatites foi reconhecida mais tardiamente. De fato, credita-se à Lurman, em 1855, a primeira descrição de hepatite relacionada ao contato com soro infectado, ao relatar a ocorrência de icterícia em 15% dos 1.285 trabalhadores de um estaleiro de Bremen, Alemanha, até 6 meses após haverem sido imunizados contra varíola com vacina produzida a partir de linfa humana (*apud* ROBINSON, 1990).

Apesar de tão longa existência, os grandes avanços no entendimento desta afecção são recentes. Na década de 60, Krugman e cols. (KRUGMAN e cols., 1967) demonstraram a existência de pelo menos dois tipos distintos de hepatites: a primeira, chamada cepa MS1 ou hepatite infecciosa, caracterizava-se por apresentar transmissão fecal-oral e curto período de incubação, enquanto que a segunda, chamada cepa MS2 ou hepatite sérica, caracterizava-se por possuir transmissão principalmente parenteral e período de incubação longo.

Em 1965, Blumberg e cols. (BLUMBERG e cols., 1965) demonstraram a presença de sistema antigênico até então desconhecido no soro de aborígene australiano, denominando-o "antígeno Austrália" (AgAU). Estudos subsequentes demonstraram que o AgAU era, na verdade, o envelope do vírus da hepatite B (VHB), implicado como agente etiológico das hepatites séricas. (PRINCE, 1968; OKOCHI e MURAKAMI, 1968).

Pouco tempo após, em 1973, Feinstone e cols. (FEINSTONE e cols., 1973) detectaram, através de imunomicroscopia eletrônica, o vírus da hepatite A (VHA), implicado, por sua vez, como agente etiológico das hepatites infecciosas.

Assim, identificados os agentes causadores das formas sérica e infecciosa, parecia estar resolvido o problema do diagnóstico etiológico das hepatites virais. Porém, em 1974, Prince e cols., (PRINCE e cols., 1974) estudando prospectivamente 51 casos de hepatite pós-transfusional no Banco de Sangue de Nova York, observaram que 36 (71%) destes não possuíam evidência sorológica de exposição ao VHB ou ao VHA. Afastada a possibilidade de hepatite por outros vírus, como o citomegalovírus ou o vírus Epstein-Barr, estes autores sugeriram a possibilidade da existência de outro(s) agentes transmissíveis causadores de hepatite.

Estas observações originais foram corroboradas menos de um ano após por Feinstone e cols., (FEINSTONE e cols., 1975) através do achado de 22 pacientes com hepatite pós-transfusional que eram negativos para quaisquer dos vírus conhecidos.

Portanto, dois estudos independentes haviam mostrado claramente a existência de hepatites pós-transfusionais não relacionadas ao VHA ou VHB. Este fato motivou a publicação de editorial no periódico médico "Lancet", em 12 de julho de 1975, no qual registra-se, pela primeira vez, o uso do termo "hepatite não-A, não-B" (HNANB). (EDITORIAL, 1975)

Estudos subsequentes, envolvendo chimpanzés e humanos, demonstraram que a HNANB, era, de fato, causada por agente transmissível e que existia estado de portador crônico (HOOFNAGLE e cols., 1977; ALTER e cols, 1978; WYKE e cols., 1979; TABOR, 1980).

Neste ínterim, em 1977, Rizzetto e cols. (RIZZETO e cols. 1977) descobriram o vírus da hepatite D (VHD) ou Delta, considerado como vírus defectivo, originalmente encontrado em plantas. No entanto, por ocorrer via de regra em associação com o VHB, este agente não poderia explicar os casos de HNANB.

O problema tornava-se ainda mais complexo, na medida em que haviam evidências da existência de mais de um agente viral implicado na patogênese da HNANB. Destacava-se o fato de existirem pacientes com múltiplos episódios de HNANB (MOSLEY, 1977), casos com curto período de incubação (MEYERS e cols., 1977; HRUBY e SCHAUF, 1978), transmissão esporádica ou epidêmica sem exposição parenteral (VILLAREJOS e cols., 1975; DIENSTAG e cols., 1977), distribuição geográfica peculiar e alta mortalidade (20%) em gestantes (KHUROO, 1980).

Entre 1978 e 1984, inúmeros estudos sugeriram possíveis testes sorológicos para a detecção de antígenos da HNANB, porém nenhum provou ser sensível e específico o bastante para detectar, de modo confiável, painéis de amostras codificadas montados para este fim. (SHIRACHI e cols., 1978; KABIRI e cols, 1979; VITVITSKI e cols., 1979; SUH e cols., 1981; SPERTINI e FREI, 1982; SETO e cols., 1984).

Apesar das dificuldades encontradas no isolamento dos diferentes agentes virais, em 1985, cerca de 10 anos após o surgimento do termo HNANB, sabia-se o suficiente para inferir a existência de pelo menos três vírus distintos responsáveis por esta afecção (FEINSTONE e HOOFNAGLE, 1984; TABOR, 1985):

1) um vírus causador de epidemias relacionadas a reservatórios de água contaminados, principalmente em países menos desenvolvidos como a Índia, Paquistão, Nepal, México e certas regiões da antiga União Soviética, sem cronificação e com alta mortalidade em gestantes;

2) um vírus causador de hepatite pós-transfusional em 5 a 15% dos receptores de 1 a 5 unidades de sangue, inativado por formalina, aquecimento a 60°C por 10 horas e por clorofórmio;

3) um vírus causador de hepatite pós-transfusional com período de incubação muito curto.

Dentre os três agentes potencialmente implicados na gênese da HANANB o primeiro a ser descoberto foi aquele associado à forma epidêmica da doença.

Em 1987, Bradley e cols. (BRADLEY e cols, 1987) estabeleceram modelo animal da chamada "HANANB entérica" em macacos, identificando, no soro e no tecido hepático, partículas virais potencialmente infectantes, com diâmetro entre 27 e 34 nm. Atualmente, sabe-se que este vírus é do tipo RNA, sendo conhecido como o vírus da hepatite E (VHE) (KRAWCZYNSKI e BRADLEY, 1989).

Quanto aos agentes restantes, a procura do principal implicado na gênese das hepatites pós-transfusionais também parece ter chegado ao fim com a descoberta, em 1989, do vírus da hepatite C (VHC).

Nesta data, um grupo de pesquisadores da *Chiron Corporation* (Califórnia, E.U.A.), liderados por M. Houghton, em conjunto com investigadores do *Center for Disease Control* (CDC) dos E.U.A., liderados por D. Bradley, isolaram o VHC e decodificaram seu genoma (CHOO e cols., 1989; KUO e cols, 1989). Para tanto, foram utilizadas avançadas técnicas de biologia molecular, fazendo com que este fosse o primeiro agente infeccioso

na história da humanidade a ter o seu genoma identificado antes de haver sido sequer visualizado.

Os passos que levaram a identificação do VHC podem ser resumidos como se segue (ALTER, 1989; CHOO e cols., 1989; BRADLEY e cols, 1991):

1) um concentrado de fator VIII humano implicado em casos de HNANB foi inoculado em chimpanzé, o qual desenvolveu hepatite crônica e evidência sorológica de alta infecciosidade ($>10^6$ unidades infecciosas de chimpanzé/ml);

2) grande volume de plasma deste chimpanzé foi ultracentrifugado até formar sobrenadante, o qual, imaginava-se, deveria conter o material genético viral misturado ao do próprio animal;

3) como não se sabia se o VHC era do tipo RNA ou DNA, ambos foram extraídos do sobrenadante e DNAs complementares (DNAc) foram sintetizados a partir dos dois ácidos nucleicos;

4) os DNAc resultantes foram inseridos em vetor de clonificação (λ gt11) e suas proteínas expressadas em *Escherichia coli*, para gerar "livraria" de DNAc;

5) a seguir, estas proteínas foram colocadas em contato com o soro de paciente com HNANB crônica para observar o surgimento de reação antígeno-anticorpo. Aproximadamente um milhão de clones foram exaustivamente testados contra o soro do paciente infectado, até que um único clone (5-1-1) mostrou reatividade;

6) a partir deste clone 5-1-1 foram detectados vários outros adjacentes, os quais, colocados em conjunto, formaram o fragmento conhecido como c100-3. Este polipeptídeo foi, por sua vez, ligado à enzima superóxido dismutase (SOD) humana e expressado em levedura para produção em grande quantidade;

7) após solubilização e purificação, o c100-3 foi usado como antígeno em radioimunoensaio para permitir a detecção de anticorpos complementares em pacientes infectados pelo VHC.

A sensibilidade e a especificidade deste teste foi examinada de modo duplo-cego contra painel codificado pertencente ao *National Institute of Health* (NIH) dos E.U.A., o qual já havia demonstrado a falha de todos os testes surgidos até então para a detecção do agente etiológico da HNANB. (KUO e cols, 1989) No entanto, ao contrário dos anteriores, o teste da *Chiron* detectou corretamente a presença de anticorpos anti-c100-3 em 6 de 7 amostras com diagnóstico de HNANB, sem apresentar resultados discordantes ou falso-positivos nas retestagens.

1.2. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA HEPATITE C

Apesar das dificuldades encontradas até o momento para a visualização direta do VHC, estudos bioquímicos e de ultra-filtração permitiram conhecer algumas de suas propriedades físicas.

Sabe-se, atualmente, que o VHC é um vírus RNA de hélice simples com polaridade positiva, envelope lipídico e diâmetro variando entre 50-60 nm (CHOO e cols., 1989; KUO e cols., 1989; HOUGHTON e cols., 1991). Seu genoma contém aproximadamente 9.400 nucleotídeos e possui sequência aberta para leitura (*open reading frame*) que ocupa quase toda sua extensão, codificando grande polipeptídeo com 3011 aminoácidos (HOUGHTON e cols., 1991; VAN DOORN, 1994).

Como todo o material genético, o RNA do VHC está organizado entre duas extremidades, iniciando por radical amino (NH_2) na extremidade 5' e terminando por radical carboxila (COOH) na extremidade 3'. As proteínas estruturais do vírus são codificadas a partir de nucleotídeos

localizados próximos à região 5', enquanto que as proteínas não-estruturais derivam de nucleotídeos próximos à região 3' (HOUGHTON e cols., 1991; VAN DOORN, 1994) (figura 1).

Examinando-se o genoma do VHC no sentido 5' - 3', encontra-se, inicialmente, a região 5' não-codificadora (5'NCR) que representa a porção mais conservada do genoma viral. A seguir, inicia-se a porção do genoma responsável pela codificação das proteínas estruturais (HIJIKATA e cols., 1991; MATSUURA e cols., 1992; THOMAS, 1994):

- 1) a proteína do core (C), não-glicosilada, básica, com 19 a 22 kDa, representando o nucleocapsídeo viral;

- 2) duas glicoproteínas (E1 e E2), representando o envelope lipídico viral, com 33 a 35 kDa e 70 a 72 kDa, respectivamente.

Seguindo em direção ao terminal 3', seguem-se cinco regiões não-estruturais:

- 1) a primeira região não-estrutural (NS1) está intimamente conectada à região E2, representando um dos locais mais variáveis do genoma do VHC;

- 2) a segunda região não-estrutural (NS2), codifica proteína hidrofóbica de 23 kDa e função ainda desconhecida;

- 3) a terceira região não-estrutural (NS3), codifica proteína de 60 kDa, representando enzimas (helicase e protease) envolvidas na replicação viral;

- 4) a quarta região não-estrutural (NS4), codifica proteína hidrofóbica de 52 kDa, com função desconhecida e menos de 50% de homologia entre os diferentes genótipos do VHC;

- 5) a quinta região não-estrutural (NS5), codifica proteína de 116 kDa, representando RNA-polimerase diretamente responsável pela replicação do genoma viral.

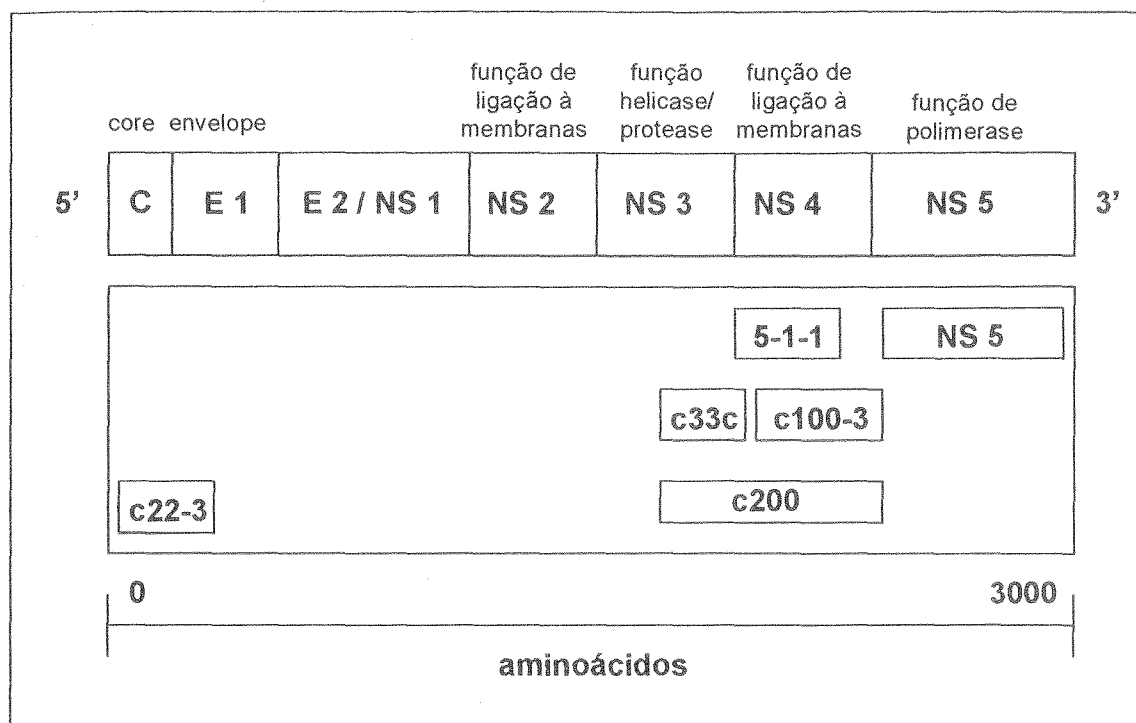


Figura 1 - Estrutura do genoma do vírus C e proteínas recombinantes (adaptado de DeMedina & Schiff, 1995)

A análise do genoma do VHC e de seu polipeptídeo decodificado mostrou muito pouca semelhança com as sequências de outros vírus conhecidos (HAN e cols., 1991; HOUGHTON e cols., 1991). No entanto, existem evidências sugerindo sua relação com a família *Flaviviridae*, que compreende o gênero dos *flavivirus*, causadores da febre amarela, dengue e encefalite japonesa, e o gênero dos *pestivirus*, causadores da diarreia bovina e da cólera suína (HOUGHTON e cols., 1991; SHERLOCK e DUSHEIKO, 1991; BRADLEY e cols., 1991; THOMAS, 1994; VAN DOORN, 1994).

A tendência atual é a de classificar o VHC como sendo o terceiro gênero da família dos *Flaviviridae*, devido ao grau de homologia

existente entre suas sequências genômicas e devido ao seu modo comum de replicação viral, sem a formação de intermediários DNA (MILLER e PURCELL, 1990; HOUGHTON e cols., 1991; THOMAS, 1994).

Outro aspecto a ser destacado com relação as características do VHC está relacionado ao problema da diversidade viral. O VHC original, isolado nos Estados Unidos, apresenta uma série de diferenças tanto na sequência de nucleotídeos quanto na composição do polipeptídeo, quando comparado a outros tipos de VHC isolados em diferentes regiões (SIMMONDS e cols., 1990; DUSHEIKO e SIMMONDS, 1994; OKAMOTO e MISHIRO, 1994; BUKH e cols., 1995).

A análise filogenética das sequências de nucleotídios das porções mais variáveis do genoma (NS5, E1 e E2), obtidas a partir de amostras provenientes de várias regiões do mundo, indicam a existência de pelo menos nove tipos principais e de mais de trinta subtipos do VHC (BUKH e cols., 1995).

Vários grupos de pesquisadores desenvolveram, recentemente, sistema consensual de classificação dos genótipos do VHC, onde cada tipo é designado por números arábicos e cada subtipo por letras minúsculas em ordem de descoberta (DUSHEIKO e SIMMONDS, 1994).

É possível que as diferenças encontradas entre os subtipos do VHC influam em aspectos tão diversos quanto a gravidade clínica e histopatológica da doença, a evolução para cronificação, a resposta ao tratamento antiviral, o desenvolvimento de vacinas e, até mesmo, a possibilidade de múltiplas infecções por diferentes tipos de VHC em um mesmo indivíduo (DUSHEIKO e SIMMONDS, 1994; JARVIS e cols., 1994; KAO e cols., 1994; LAI e cols., 1994; MITA e cols., 1994; OKAMOTO e MISHIRO, 1994; POZZATO e cols., 1994; HINO e cols., 1994; BUKH e cols., 1995).

No entanto, a maioria dos testes diagnósticos disponíveis atualmente utiliza porções altamente conservadas do genoma viral, de modo que a ocorrência de resultados falso-negativos relacionados aos diferentes genótipos não tem sido comumente demonstrada (BUKH e cols., 1995).

1.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VÍRUS C DA HEPATITE

Existem, atualmente, pelo menos quatro métodos distintos para a identificação do VHC (DE MEDINA e SCHIFF, 1995):

1) o primeiro envolve a detecção de anticorpos anti-VHC no soro, através diversas técnicas de primeira (I), segunda (II) e terceira (III) gerações, tais como o radioimunoensaio (RIA), o enzima imunoensaio (ELISA) e o "immunoblot" recombinante (RIBA);

2) o segundo envolve a detecção do material genético viral, tanto no soro quanto no tecido hepático, através da técnica da reação em cadeia da polimerase com uso prévio da enzima transcriptase reversa (RT-PCR);

3) o terceiro envolve a quantificação da taxa de vírus, tanto no soro quanto no tecido hepático, através de diversas técnicas semi-quantitativas, tais como a RT-PCR com séries de diluição, ou técnicas diretamente quantitativas, tais como o "DNA ramificado" (*branched DNA assay*, bDNA);

4) finalmente, o quarto e último método envolve a detecção dos antígenos virais no tecido hepático através de técnicas imunohistoquímicas, como a imunofluorescência e a imunoperoxidase.

A seguir, serão descritas sucintamente cada uma das técnicas mencionadas.

1.3.1. Detecção dos Anticorpos anti-VHC

A detecção dos anticorpos anti-VHC é, sem dúvida, o método mais utilizado para o diagnóstico da infecção pelo VHC. Cada um dos testes nesta categoria detecta a presença de anticorpos contra determinado número de epitopos do VHC.

O primeiro teste (RIA I) foi desenvolvido em 1989 pela equipe da *Chiron*, usando como antígeno a proteína C100, codificada pela região NS4, fusionada à SOD e expressada em levedura como proteína recombinante denominada c100-3 (CHOO e cols., 1989; KUO e cols., 1989; MIYAMURA e cols., 1990). Os mesmos pesquisadores elaboraram teste de enzimaímunoensaio utilizando o c100-3 (ELISA I), considerado equivalente ao RIA I e tecnicamente mais fácil por não necessitar de material radioativo (VAN DER POEL e cols., 1990).

Estudos preliminares com os testes RIA I e ELISA I mostraram a presença de anti-VHC em até 90% dos pacientes com diagnóstico de HNANB crônica pós-transfusional ou secundária a outro tipo de contato parenteral (KUO e cols., 1989; ALTER e cols., 1989; ROGGENDORF e cols., 1989; ESTEBAN e cols., 1989; VAN DER POEL e cols., 1990; MIYAMURA e cols., 1990).

Apesar do entusiasmo gerado pelos resultados iniciais, ficou logo evidente que estes testes apresentavam certas limitações. A primeira delas residia no fato de que o anti-VHC não era detectado no soro de pacientes com HNANB aguda ou recente. De fato, a seropositividade nestes casos costumava surgir em média 15 semanas após a exposição, podendo em alguns casos demorar até 1 ano (DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

A segunda limitação residia no fato de que, embora sensíveis, estes testes pareciam pouco específicos. Resultados falso-positivos foram

descritos em diversas situações clínicas, tendo sido associados à presença de anticorpos contra a enzima SOD, fator reumatóide e hipergamaglobulinemia, particularmente em casos de hepatite crônica ativa autoimune e paraproteinemia (IKEDA e cols., 1990; THEILMAN e cols., 1990; McFARLANE e cols., 1990; BOUDART e cols., 1990).

Com o objetivo de diminuir o intervalo de "janela" imunológica e aumentar a especificidade dos testes de primeira geração, os pesquisadores da *Chiron* introduziram novo teste chamado de RIBA I. Neste teste, os antígenos do VHC utilizados eram o mesmo polipeptídeo fusionado C100-3, acrescido da porção 5-1-1 e de banda isolada de SOD para servir de controle, dispostos de maneira fixa em posições pré-determinadas de faixa de nitrocelulose. (EBLING e cols., 1990).

Apesar do RIBA I mostrar-se mais específico que o ELISA I em relação ao grau de infectividade de uma amostra, provou ser menos sensível, dificultando seu uso como teste confirmatório, além de não alterar de maneira significativa o período de janela imunológica (ALBERTI, 1991).

Testes de segunda geração foram então desenvolvidos e introduzidos por volta de 1991 e 1992 (AACH e cols., 1991). Dentre estes, os mais usados atualmente são o ELISA II, que detecta a presença de anticorpos contra os antígenos C-100, C33c e C22-3, ligados à SOD, e o RIBA II, que além de detectar anti-VHC contra todos os epitopos do ELISA II conta ainda com o antígeno não-estrutural C33c e faixa isolada de SOD para controle (VAN DER POEL e cols., 1991).

Estudos preliminares demonstraram que além da melhora na sensibilidade e especificidade, os testes de segunda geração permitiram diminuição significativa no período de "janela" imunológica, pois os novos antígenos C22-3 e C33c são os primeiros a estimular anticorpos séricos. Com estes testes, os anticorpos anti-VHC são detectados em média 11 semanas

após o início do quadro clínico, sendo que em cerca de 50% dos casos tornam-se seropositivos ainda no primeiro mês (AACH e cols., 1991; ALBERTI, 1991; ALTER, 1992; AOKI e cols., 1994).

Em relação à classe de anti-VHC detectados, cabe salientar que a diferenciação entre anticorpos IgM e IgG não é feita na rotina da maioria dos laboratórios, embora haja a sugestão de que a presença do tipo IgM possa estar mais relacionada com a taxa de replicação viral e com a intensidade da atividade inflamatória do que com o fato da doença ser aguda ou crônica (YUKI e cols., 1994a; CHEN e cols., 1995; DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

Mais recentemente foram introduzidos testes de terceira geração (ELISA III e RIBA III) para a detecção de anticorpos anti-VHC, que adicionam antígenos da porção NS5 do genoma viral (LAVANCHY e cols., 1994). Estes testes, porém, não demonstraram ser significativamente superiores aos de segunda geração, que continuam a ser os testes usados e recomendados nos E.U.A. (LAMORIL e cols., 1994; LAVANCHY e cols., 1994; COUROUCÉ e cols., 1995).

1.3.2. Detecção do RNA do VHC por RT-PCR

Apesar da inegável importância da detecção dos anticorpos anti-VHC na prática clínica, o teste ideal para o diagnóstico desta infecção baseia-se na demonstração do material genético viral. Infelizmente, o RNA do VHC não pode ser detectado por técnicas mais simples e já consideradas rotineiras em centros mais avançados, como o "northern blot", provavelmente pelo fato deste vírus circular em baixos títulos (HOOFNAGLE e DI BISCEGLIE, 1991).

Portanto, a detecção dos antígenos do VHC é tarefa complexa, dependente da técnica da PCR. Este método baseia-se na identificação do VHC na amostra através de sondas (*primers*) formadas por material genético complementar, com capacidade de ligar-se à sequência de bases do genoma do VHC e amplia-lá cerca de um a dez milhões de vezes, dependendo do número de ciclos, por ação de enzima polimerase (EISENSTEIN, 1990).

A PCR foi idealizada originalmente para detecção de DNA, portanto, o RNA do VHC deve ser primeiramente transformado em DNA complementar (DNAc), através da enzima transcriptase reversa (RT). Os produtos da amplificação são então detectados por eletroforese em gel de agarose após serem corados por brometo de etídio (HOOFNAGLE e DI BISCEGLIE, 1991).

A PCR possui alta sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 10 moléculas/ml, motivo pelo qual está sujeita a resultados falso-positivos (WAYNER, 1990; ZAAIJER, 1993; URDEA, 1994a; DE MEDINA e SCHIFF, 1995). É imprescindível, portanto, que seja realizada em laboratórios especializados, que possuam fluxo aéreo laminar, para impedir que o material genético de uma amostra contamine outra por contiguidade. Além disto, a reação tem de ser repetida pelo menos duas vezes com controles positivos e negativos para que o resultado possa ser considerado confiável (DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

Não obstante, quando adequadamente realizada, é técnica muito valiosa que permite demonstrar a presença do vírus diretamente, sem depender do achado indireto de seus anticorpos, os quais podem em alguns casos estar presentes mesmo após a cura do processo infeccioso.

A RT-PCR pode ser realizada tanto no soro quanto no tecido hepático, sendo que os resultados positivos, quando obtidos mediante técnica meticulosa, permitem a constatação da presença do agente infeccioso e do

potencial de contágio da amostra (OKAMOTO, 1990). Além da grande sensibilidade, a vantagem deste teste reside na diminuição considerável do período de "janela" imunológica, permitindo a detecção da infecção já na primeira semana a partir do contágio (HOOFNAGLE e DI BISCEGLIE, 1991).

Vantagem adicional da RT-PCR são as técnicas derivadas que possibilitam a genotipagem do VHC, a qual tem permitido a realização de estudos epidemiológicos, identificando a distribuição geográfica mundial do VHC, bem como a correlação entre determinados genótipos e variáveis tão diversas quanto as taxas de viremia, evolução clínica e resposta ao tratamento antiviral (DUSHEIKO e SIMMONDS, 1994).

1.3.3. Quantificação do RNA do VHC

A quantificação do VHC pode ser realizada tanto no soro quanto no tecido hepático. Todos os métodos quantitativos baseados na realização prévia de PCR, são considerados como métodos semi-quantitativos, pois amplificam o alvo a ser quantificado, de modo que não permitem a obtenção de valor absoluto (URDEA, 1994a). Dentre estes, destacam-se RT-PCR com diluições seriadas (SIMMONDS e cols., 1990), RT-PCR competitivo (KANEKO e cols., 1992), RT-PCR multicíclico (ISHIYAMA e cols., 1992) e amplificação isotérmica dos ácidos nucleicos, conhecido como "NASBA" (KIEVITS e cols., 1991).

Por outro lado, o teste bDNA desenvolvido recentemente pela *Chiron* e chamado de *Quantiplex*, permite a quantificação direta da taxa de viremia, tanto no soro quanto no tecido hepático. Este teste difere da RT-PCR no sentido de que o material genético não é amplificado, mas sim ligado a marcador luminoso, cujo sinal é detectado por aparelho denominado "luminômetro" (URDEA, 1993). Nesta técnica, devido ao fato do VHC não ser

amplificado, a intensidade do sinal é proporcional à quantidade original de ácido nucleico viral na amostra, permitindo assim a quantificação direta do RNA do VHC (URDEA, 1994b).

1.3.4. Detecção dos antígenos do VHC no tecido hepático

Outra maneira de identificar a presença da infecção pelo VHC é através da demonstração de partículas antigênicas no tecido hepático por técnicas imunohistoquímicas.

O método descrito inicialmente detectou, por imunofluorescência, padrão focal e pouco denso no citoplasma dos hepatócitos de pacientes com hepatite aguda e crônica pelo VHC (KRAWCZYNSKI e cols., 1992; SANSONNO e DAMMACCO, 1993; GONZALES-PERALTA e cols., 1994; TSUTSUMI e cols., 1994). Dois grupos detectaram o mesmo padrão usando imunoperoxidase em tecido armazenado em parafina (INFANTOLINO e cols., 1990; BLIGHT e cols., 1993).

Outros autores têm utilizado a técnica de hibridização *in situ* para demonstração do RNA do VHC no tecido hepático, utilizando biópsias por congelamento, com resultados comparáveis à imunohistoquímica (BLIGHT e cols., 1992; YAMADA e cols., 1993; TANAKA e cols., 1993).

No momento, estas são técnicas reservadas para uso exclusivamente experimental, e não foram ainda avaliadas quanto ao grau de sensibilidade e especificidade para permitir seu uso no armamentário diagnóstico rotineiro. Contudo, têm sua importância assegurada, pois permitem melhor entendimento da fisiopatologia da doença hepática crônica C através da correlação entre a detecção do VHC no fígado e a natureza e intensidade das alterações hepáticas naquela localização (GOODMAN e ISHAK, 1995).

1.4. CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO PELO VHC

Sabe-se que a hepatite tipo C corresponde a mais de 90% das HANANB pós-transfusionais, sendo responsável por proporção considerável dos casos de doenças hepáticas em nível mundial. Somente nos Estados Unidos estima-se que existam cerca de 3,5 milhões de indivíduos infectados, com aproximadamente 150.000 novos casos descritos anualmente (SHAPIRO, 1994).

Além disto, entre 8.000 e 10.000 destes indivíduos morrem a cada ano por causas relacionadas à insuficiência hepática e/ou ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, sendo que cerca de 1.000 são transplantados (KANEKO e cols., 1994; TERRAULT e WRIGHT, 1995).

A HANANB pós-transfusional aguda apresenta aspectos clínicos semelhantes aos descritos para outras formas de hepatites virais (DIENSTAG, 1983), no entanto, algumas peculiaridades merecem ser destacadas:

- 1) O período de incubação, desde a transfusão até o surgimento dos sintomas e/ou elevação das transaminases, tem extensão mais abrangente do que o das outras hepatites virais, variando entre 2 a 26 semanas (média de 7,8 semanas);

- 2) Quando comparado com as formas de hepatite aguda pelos vírus A ou B, o curso clínico da hepatite aguda C tende a ser menos severo, sendo extremamente rara a ocorrência de hepatite fulminante (LIANG e cols., 1993; FÉRAY e cols., 1993; WRIGHT, 1993);

- 3) Um achado clínico muito característico da hepatite C é o padrão flutuante das transaminases, tornando difícil o estabelecimento inequívoco do período de convalescença. Nesta afecção, a persistência da

infecção é a regra, sendo estimadas taxas de cronificação superiores a 80% (ALTER, 1994).

A doença hepática crônica C, por sua vez, apesar de caracterizar-se por lenta progressão, sendo muitas vezes assintomática, não é doença benigna. A análise histopatológica revela que cêrca de 50% destes pacientes apresentam hepatite crônica ativa (HCA) com diferentes graus de severidade, com taxa de progressão para cirrose estimada em 25-30% após 5 a 10 anos de seguimento (ALTER, 1994; ALTER MJ, 1995).

Além disto, o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) também parece estar relacionado ao VHC, como sugerem os estudos que demonstraram alta prevalência deste agente em pacientes com CHC negativos para o VHB (KANEKO e cols., 1994; HINO e KAJINO, 1994; DI BISCEGLIE, 1995).

Certos aspectos histológicos da infecção crônica pelo VHC, embora não patognomônicos, são encontrados mais frequentemente do que nas hepatites A ou B. Dentre eles, destacam-se, em graus variáveis, a presença de esteatose, os agregados linfocitários focais, com ou sem centro germinativo e a lesão de ducto biliar, caracterizada por infiltrado inflamatório linfocitário intenso ao redor do ducto afetado, provocando destruição da membrana basal e hiperplasia epitelial. (MacSWEEN, 1991; UCHIDA, 1994; GOODMAN e ISHAK, 1995).

A transmissão do VHC ocorre principalmente por via parenteral. Dentre os grupos considerados como alto risco para infecção destacam-se os receptores de transfusões de sangue ou derivados, usuários de drogas endovenosas, trabalhadores da área de saúde com exposição ocupacional ao sangue, pacientes em hemodiálise e aqueles expostos a outros tipos de contatos parenterais, tais como, entre outros, cirurgias, tatuagens e acupuntura. Curiosamente, até 50% dos pacientes infectados pelo

VHC não apresentam história prévia de contato parenteral. Ao contrário do que ocorre com o VHB, tanto o contágio materno-fetal quanto o sexual parecem não ser responsáveis por grande número de infecções. Portanto, não é raro o achado de pacientes com sorologia positiva para o anti-VHC sem que haja fator etiológico prontamente identificável (ALTER MJ, 1991; MARGOLIS, 1993; SHAPIRO, 1994; NISHIOKA, 1994; ALTER MJ, 1995).

Apesar de todo o avanço tecnológico que tornou possível tal acúmulo de informações sobre a hepatite C em tão curto espaço de tempo desde sua descoberta, pelo menos uma questão crucial permanece em aberto: não se sabe com certeza qual o mecanismo patogênico envolvido na infecção pelo VHC.

Existem controvérsias na literatura se este vírus causa a lesão hepática através de mecanismo citopático direto, ou mediado pelo sistema imunológico como ocorre na infecção pelo VBH. É possível, ainda, que ambos os mecanismos estejam envolvidos em um mesmo momento ou em ocasiões distintas (THOMAS, 1994).

Os defensores do mecanismo citopático direto como evento fisiopatológico fundamental na infecção pelo VHC apoiam-se em estudos preliminares recentes que utilizaram o novo método de quantificação do RNA do VHC, cujos resultados mostram que a taxa de viremia parece ser diretamente proporcional à intensidade da lesão histopatológica hepática, sendo que a eventual diminuição da carga viral por tratamento com interferon correlaciona-se com a melhora histopatológica (JEFFERS e cols., 1992; LAU e cols., 1993; MARTINOT-PEIGNOUX, 1994; GORDON e cols., 1994).

Resultados semelhantes foram descritos por outros autores utilizando o método semi-quantitativo da PCR (SHINDO e cols., 1991; GRETCH e cols., 1994; NOLTE e cols., 1995; RAVAGGI e cols., 1995).

É difícil, porém, conciliar a presença de mecanismo citopático direto nesta afecção com o fato de que alguns pacientes cronicamente infectados pelo VHC não apresentam qualquer sintoma de doença ou lesão hepática à análise histopatológica, sendo considerados portadores não apenas "assintomáticos", mas, verdadeiramente, "sãos" (SHINDO e cols., 1993; PRIETO e cols., 1995).

De fato, vários estudos apoiam a existência de mecanismo imunológico na patogênese da doença hepática crônica C. Dentre estes, destacam-se aqueles que sugerem associação do VHC com hepatite autoimune. (LENZI e cols., 1990; MAGRIN e cols., 1991; TODROS e cols., 1991), embora este achado possa constituir-se em resultados falso-positivos dos anticorpos anti-VHC nesta situação (McFARLANE e cols., 1990; MITCHEL e cols., 1993).

Além disto, tem sido detectada a presença de linfócitos T citotóxicos e antígenos HLA classe I em zonas de necrose hepatocitária, na doença hepática crônica C (DIENES e cols., 1987). Com efeito, recentemente foram clonadas células T citotóxicas sensibilizadas contra regiões não-estruturais do VHC, a partir de fígado humano infectado por este agente viral (KATO e cols., 1992).

Apesar destas evidências, o fato do VHC apresentar tendência a provocar lesão hepática de maior gravidade em pacientes imunocomprometidos parece indicar que este agente viral pode comportar-se de forma citopática, mantendo, assim, a controvérsia sobre seu real mecanismo de lesão hepática (SORIANO e cols., 1995).

A quantificação do RNA do VHC pelo método de bDNA poderá fornecer dados adicionais em relação à sua patogênese, através da correlação entre a taxa de viremia e características demográficas, laboratoriais e histológicas dos pacientes com doença hepática crônica causada pelo VHC.

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar as características operacionais do teste de quantificação do RNA do VHC para o diagnóstico da doença hepática crônica C, usando a técnica da RT-PCR como padrão-ouro.

2.2. Correlacionar o diagnóstico histopatológico com as características demográficas e laboratoriais dos pacientes com doença hepática crônica C.

2.3. Correlacionar a quantificação do VHC com as características demográficas, laboratoriais e histopatológicas dos pacientes com doença hepática crônica C.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Foram estudados, prospectivamente, 107 pacientes com evidência sorológica da presença do VHC e diagnóstico histopatológico de hepatite crônica ou cirrose. Estes eram pacientes ambulatoriais que realizaram laparoscopia com biópsia hepática, no período de julho de 1991 à julho de 1992, como parte da rotina de avaliação de doença hepática crônica do Serviço de Hepatologia da Universidade de Miami, Flórida, E.U.A, aprovada por comitê de ética da instituição.

Quanto ao sexo, 68 dos 107 (63,6%) pacientes estudados eram masculinos e 39 (36,4%) eram femininos. A idade variou entre 29 e 84 anos (média de 46,2 +/- 12,6 anos). Noventa e três (86,9%) pacientes eram brancos, 13 (12,1%) eram pretos e 1 (0,9%) amarelo.

Os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

3.1.1. Critérios de inclusão

a) Idade maior do que 18 anos e assinatura de consentimento informado;

b) Evidência de alteração de transaminases por mais de 6 meses;

c) Evidência de infecção ativa pelo VHC, demonstrada através de positividade dos anticorpos anti-VHC pelos métodos de ELISA e RIBA de segunda geração e do RNA do VHC pela técnica de RT-PCR;

d) Evidência histopatológica de doença hepática crônica (hepatite crônica persistente, hepatite crônica ativa ou cirrose) em biópsia obtida por laparoscopia.

3.1.2. Critérios de exclusão

a) Presença de outras possíveis causas de doença hepática, tais como: 1) vírus B da hepatite, definido pela presença de HBsAg e/ou anti-HBc sem anti-HBs; 2) alcoolismo, definido como ingestão alcoólica superior a 80 g/dia, em média, por mais de 1 ano; 3) uso de drogas hepatotóxicas; 4) deficiência de alfa 1-antitripsina (A1AT), definida por valores de A1AT sérica inferiores a 100 mg/dl, ou abaixo de 40% do limite inferior da normalidade (SCHWARZENBERG e SHARP, 1993); 5) doença de Wilson, definida por valores de ceruloplasmina sérica inferiores a 20 mg/dl (STERNLIEB e SCHEINBERG, 1993); 6) hemocromatose, definida por valores de saturação de transferrina acima de 55% e elevação da ferritina acima de 300 ng/ml, associados à deposição intensa de ferro (3+ ou 4+) no citoplasma hepatocitário (TAVILL, 1993) e 7) hepatite autoimune, definida pela presença de autoanticorpos (anti-músculo liso, anti-núcleo, anti-antígeno solúvel do fígado e/ou anti-fração microssomal fígado rim) em títulos acima de 1:80 (BOYER e REUBEN, 1993).

b) Presença de tratamento prévio da doença hepática com interferon, corticóide ou qualquer outro medicamento com potencial de alterar a viremia e/ou o grau de lesão hepática;

c) Presença de carcinoma hepatocelular;

d) Presença de doença hepática clinicamente descompensada, interpretada como ascite tensa e/ou encefalopatia porto-sistêmica, por dificultar a realização do exame laparoscópico;

e) Presença de alterações nas provas de coagulação sangüínea que dificultassem a biópsia hepática, consideradas como função de protrombina inferior à 60% e plaquetas inferiores à 60.000 / mm³.

f) Presença de positividade para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV).

Preenchidos os critérios de inclusão e na ausência de quaisquer dos critérios de exclusão mencionados anteriormente, uma amostra de soro era coletada aproximadamente 1 hora antes do procedimento laparoscópico, sendo uma alíquota enviada para exames laboratoriais (AST e ALT) e outra centrifugada e armazenada a -70°C, no máximo 1 hora após ser coletada, para a posterior realização da quantificação viral pelo bDNA.

3.1.3. Grupo controle

O grupo controle foi formado por amostras de soro obtidas de 41 indivíduos, compreendendo 11 pacientes avaliados ambulatorialmente durante o mesmo período do estudo, no Serviço de Hepatologia da Universidade de Miami, Flórida, E.U.A (6 com diagnóstico de cirrose biliar primária e 5 com hepatite crônica pelo vírus B), além de 30 voluntários saudáveis. Todos apresentavam ausência de anticorpos anti-VHC por ELISA II e RIBA II, bem como ausência do RNA do VHC por PCR.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Análise Laboratorial das Aminotransferases

A determinação sérica da aminotransferase da alanina (ALT) e da aminotransferase do aspartato (AST) foi realizada pelo Método

Colorimétrico (unidades Cabaud), sendo considerados como valores normais entre 8 e 46 U/l.

3.2.2. Pesquisa dos Anticorpos Anti-VHC por ELISA II

O teste ELISA II usado para detecção dos anticorpos anti-VHC foi manufacturado pela *Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA*. Este teste usa três antígenos recombinantes do VHC, fornecidos pela *Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA*: O c100-3 (proteína não-estrutural derivada das regiões NS3 e NS4 do genoma do VHC), o c200 (proteína fusionada não-estrutural que engloba o c100-3 e o c33c derivados das regiões NS3 e NS4 do genoma) e o c22-3 (proteína estrutural derivada da região do *core* do genoma do VHC).

Os testes foram realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, divididas em três estágios distintos:

- 1) O soro a ser testado foi separado em alíquotas de 20 μ L, colocado em placas recobertas pelos tres antígenos recombinantes do VHC (c100-3, c200 e c22-3) e diluído em 200 μ L de solução salina com tampão de fosfato. O material, incubado a 37°C (+/- 1°C) por 60 minutos para permitir a formação de complexos antígeno-anticorpo na superfície das placas, foi lavado, a seguir, com solução tampão por cinco vezes;

- 2) Adicionou-se à reação 200 μ L de anticorpo monoclonal murino anti-IgG humana, conjugado com a enzima peroxidase e incubou-se novamente a 37°C por 60 minutos, seguido de lavagem com solução tampão por cinco vezes. A função deste anticorpo monoclonal é conjugar-se especificamente com a IgG humana envolvida nos complexos antígeno-anticorpo porventura formados no estágio anterior;

3) Um sistema enzimático para detecção da peroxidase ligada ao complexo antígeno-anticorpo, constituído por 200 µL de fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio, foi então adicionado e incubado no escuro por 30 minutos. Havendo conjugação a fenilenodiamina será oxidada, resultando em produto final colorido. Interrompe-se a reação através da adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N e a leitura é feita por espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 a 492 nm. A intensidade da coloração irá depender da quantidade de substrato conjugado, sendo, portanto, medida da concentração de anti-VHC presente na amostra testada.

O ponto de corte foi estabelecido a partir do cálculo da média de absorvância (densidade óptica) dos controles negativos somado à constante 0,600. A interpretação dos resultados obedeceu aos seguintes critérios:

1) amostras com absorvância inferior ao ponto de corte foram consideradas negativas;

2) amostras com absorvância superior ao ponto de corte foram consideradas inicialmente positivas e testadas em duplicata, sendo consideradas definitivamente positivas apenas quando os resultados confirmavam absorvância acima do ponto de corte;

3.2.3. Pesquisa dos anticorpos anti-VHC por RIBA II

O teste RIBA II usado para a detecção dos anticorpos anti-VHC foi manufaturado pela *Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA*. Este teste usa quatro antígenos recombinantes do VHC, fornecidos pela *Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA*: O 5-1-1 (proteína não-estrutural derivada da região NS4 do genoma do VHC), em conjunto com o c100-3, o c33c e o c22-3 (já mencionados no teste ELISA II). Além disto, o teste RIBA II

possui faixa isolada com o antígeno da enzima superóxido dismutase (SOD) para controle da presença de anticorpos anti-SOD.

O teste RIBA II foi realizado em matriz de nitrocelulose, idêntica àquela utilizada nos testes tipo *Western Blot*, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante:

1) O soro a ser testado foi separado em alíquotas de 20 μ L, colocado nas faixas de nitrocelulose recobertas pelos quatro antígenos do VHC e pela SOD e diluído com 1 ml de solução salina com tampão de fosfato. O material, incubado em movimento constante por 4 horas à temperatura ambiente (entre 15^o e 30^oC), para permitir a formação de complexos antígeno-anticorpo nas faixas correspondentes de nitrocelulose, foi lavado a seguir com solução tampão;

2) Adicionou-se à reação 1 ml de anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado com a enzima peroxidase e incubou-se em movimento circular de 110 +/- 5 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. A função deste anticorpo é conjugar-se especificamente com a IgG humana envolvida nos complexos antígeno-anticorpo porventura formados no estágio prévio;

3) Solução contendo 1 ml de peróxido de hidrogênio e 4-cloro-1-naftol foi adicionada e incubada em movimento circular de 110 +/- 5 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir, lavou-se as faixas de nitrocelulose por duas vezes com 60 ml de água destilada e deixou-se secar no escuro por pelo menos 20 minutos em temperatura ambiente. Havendo reação positiva, padrões de intensidade variável em escala de cinza desenvolvem-se em cada uma das cinco bandas da faixa de nitrocelulose, proporcionais a quantidade de anticorpo específico ligado a cada um dos quatro antígenos do VHC ou à SOD.

Os resultados são expressos quantitativamente (de 0 a 4+) para cada antígeno individualmente, através da comparação visual da intensidade de cada banda de antígeno com bandas de controle de dois níveis de intensidade de IgG humana incluídas em cada faixa de nitrocelulose: O nível I sendo o positivo fraco (equivalente a 1+) e o nível II sendo o positivo moderado (equivalente a 2+). Desta maneira, os seguintes resultados são possíveis:

- a) Banda não-visível = 0;
- b) Banda com intensidade menor que o controle nível I = +/-;
- c) Banda com intensidade igual a do controle nível I = 1+;
- d) Banda com intensidade maior que o controle nível I e menor que o controle nível II = 2+;
- e) Banda com intensidade igual a do controle nível II = 3+;
- f) Banda com intensidade maior que o controle nível II = 4+.

A interpretação dos resultados obedeceu aos seguintes critérios:

- a) Resultado negativo = nenhuma banda com intensidade igual ou maior do que 1+ presente, ou reatividade apenas à banda da SOD;
- b) Resultado positivo = pelo menos duas bandas presentes com reatividade igual ou maior do que 1+, com a banda da SOD sem reatividade;
- c) Resultado indeterminado = apenas uma banda reativa (de qualquer intensidade) ou reatividade de qualquer número de bandas com reatividade concomitante da banda da SOD.

3.2.4. Pesquisa do RNA do VHC pela técnica da RT-PCR

A técnica da RT-PCR foi realizada em duplicata para cada uma das amostras, sendo repetida uma terceira vez sempre que houvessem resultados conflitantes. Foram incluídos múltiplos controles positivos e negativos durante cada procedimento. A utilização da RT-PCR para detecção do RNA do VHC foi realizada de acordo com uma série de etapas que serão detalhadas a seguir.

Inicialmente foi conduzida a extração do RNA das amostras a serem testadas, utilizando-se o método do isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (LIANG e cols., 1993), da seguinte maneira:

1) O soro a ser testado foi separado em alíquotas de 150 μ L e homogeneizado em 450 μ L de solução contendo 4 mol/L de isotiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio com pH 7, 0,5% de sarcosil, 0,1 mol/L de 2-mercaptoetanol e 20 μ g/ml de MS2 RNA (*Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA*);

2) A este homogenato foram adicionados sequencialmente 15 μ L de acetato de sódio 2 M pH 4, 600 μ L de fenol saturado em água tratada e 100 μ L de clorofórmio/isopropanolol (24:1). Esta solução foi incubada em banho de gelo por 15 minutos, centrifugada a 10.000 g por 20 minutos a 4°C e a fase aquosa precipitada adicionando-se igual volume de isopropanol. Após centrifugação a 14.000 g por 20 minutos, o sedimento foi ressuscendido em 100 μ L da solução de isotiocianato de guanidina e precipitado da mesma maneira anteriormente descrita;

3) Finalmente, a solução obtida foi lavada com etanol 75%, seca sob vácuo, dissolvida em 10 μ L de 10 mM DTT com 20 unidades de RNasin (*Promega, Madison, WI, USA*) e estocada a -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA).

A síntese do cDNA tem por objetivo usar o RNA do VHC como base para formar hélice complementar de DNA, a qual será posteriormente amplificada pela PCR. O cDNA foi obtido através dos seguintes passos:

1) A solução de RNA extraída e congelada previamente, foi aquecida a 90°C por 3 minutos, resfriada em banho de gelo e incubada com 200 U/ml de MMLV-transcriptase reversa (*BRL, Gaithersburg, MD, USA*);

2) A esta reação foram adicionados 10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT e 1 mM de cada dNTP, perfazendo volume final de 15 µL, sendo incubados por período de 60 minutos a 42°C;

3) Finalmente, foi adicionado ao produto final 1 unidade de RNaseH (*BRL, Gaithersburg, MD, USA*) e a mistura foi incubada por mais 30 minutos a 37°C, estando pronta para iniciar a PCR.

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados, ditos *primers*, foram produzidos a partir de sequências publicadas do VHC tipo I em sintetizador de DNA modelo 391 (*Applied Biosystems, USA*). A técnica de RT-PCR utilizada foi a *double nested*, que usa dois pares de *primers*, sendo um par externo e um par interno, ambos compostos de sequências superponíveis e opostas (*sense* e *antisense*). Nesta técnica são realizadas duas amplificações sequenciais, uma com os oligonucleotídeos externos e outra com os internos. Os pares de *primers* foram escolhidos da região 5' conservada e não traduzida do genoma viral, por ser esta a região mais constante do VHC. Os nucleotídeos tinham a seguinte estrutura:

1) nucleotídeo externo *sense* (NES) = 5' -
CATGGTGCACGGTCTACGAGACC - 3';

2) nucleotídeo externo *antisense* (NEA) = 5' -
GGCGACACTCCACCATAGATC - 3';

3) nucleotídeo interno *sense* (NIS) = 5' -
GGA ACTACTGTCTTCACGCAGA - 3';

4) nucleotídeo interno *antisense* (NIA) = 5' - TCGCAAGCACCCCTATCAGGCAG - 3'.

A primeira amplificação por RT-PCR foi executada em volume de 100 μ l contendo 10 mM de Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM da cada dNTP, 0,5 μ M dos *primers* externos (NES e NEA) e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (*Amplitaq, Perkin-Elmer/Cetus*). A reação, coberta com 0,1 ml de óleo mineral de biologia molecular (*Sigma*), foi submetida a 35 ciclos de amplificação em termociclador automático (*Perkin-Elmer/Cetus*) com pré-aquecimento de 94°C por 3 min, desnaturação a 94°C por 1 min, anexação dos *primers* a 45°C por 2 min, e amplificação a 72°C por 3 min. A segunda amplificação da técnica *double nested* foi realizada com alíquota de 10 μ l originada da primeira amplificação, que foi submetida ao mesmo processo descrito anteriormente, exceto pela substituição dos *primers* externos pelos internos (NIS e NIA).

Finalmente, 10 μ l do produto da segunda reação de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, visualizado sob lâmpada de ultravioleta e fotografado com sistema polaroide. A utilização desta metodologia permitiu a amplificação de segmento de DNA com aproximadamente 259 pares de bases (bp).

3.2.5. Quantificação do RNA do VHC pela técnica de bDNA

Alíquota da mesma amostra de soro utilizada para a detecção do RNA do VHC por PCR foi codificada e armazenada a -70°C até a realização do bDNA em conjunto. Foram realizados testes em duplicata para cada amostra, sendo o coeficiente máximo de variação admitido inferior a 20%. O resultado final foi expresso como média aritmética das duas determinações. Controles positivos e negativos estabelecidos previamente por

ELISA II, RIBA II e PCR foram adicionados para atestar a confiabilidade dos resultados.

A técnica de bDNA para quantificação do genoma do VHC foi realizada a partir de amostra de 50 μ l de soro segundo informações fornecidas pelo fabricante. Esta técnica baseia-se na hibridização específica e captura do RNA do VHC na superfície de placa coberta com poliestireno, através do uso de oligonucleotídeos sintéticos. A placa (*Dynatech Laboratories, CA, USA*) permite a realização de 96 amostras simultâneas, sendo usada como suporte sólido para a reação. Ao complexo do RNA do VHC, imobilizado nesta fase sólida, adicionou-se múltiplas cópias de sonda específica para o genoma viral, constituídas por moléculas sintéticas de DNA ramificado, conjugadas com complexo enzimático à base de fosfatase alcalina. Posteriormente, acrescentou-se substrato quimioluminescente de dioxetano com capacidade de ligar-se as estruturas ramificadas de bDNA e fosfatase alcalina, procedendo-se então a leitura com o luminômetro (*Chiron*) a 37°C (figura 2).

Como o material genético não foi amplificado, a quantidade de luminosidade gerada era diretamente proporcional à quantidade de RNA viral na amostra, sendo expressa em número de cópias de equivalentes do genoma do VHC por mililitro (eqRNA-VHC/ml). O limite de sensibilidade do teste de bDNA para detecção do RNA do VHC é de 350.000 eqRNA-VHC/ml. Amostras com resultados inferiores a este valor são consideradas como negativas e com valor zero para fins de cálculo.

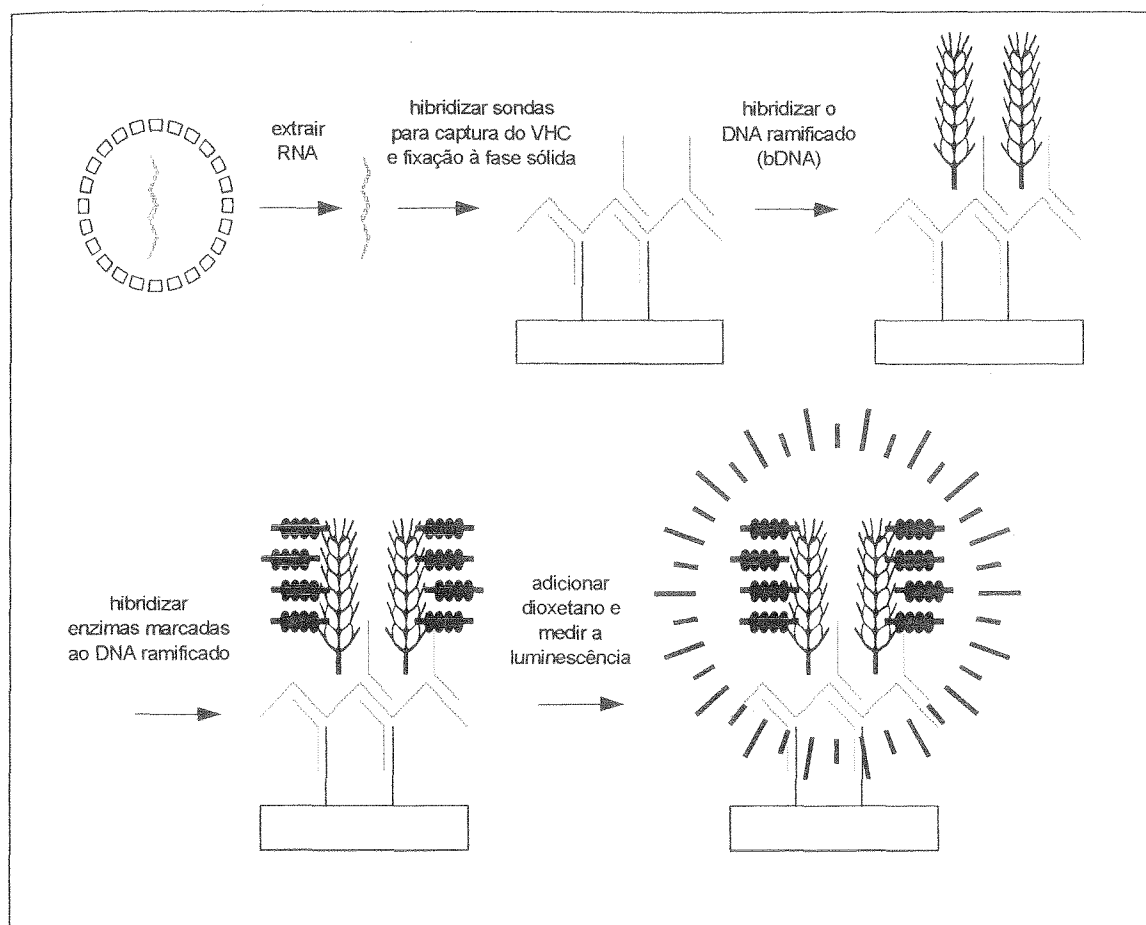


Figura 2 - Quantificação do RNA do VHC pelo método do DNA ramificado

3.2.6. Análise Histopatológica das Biópsias Hepáticas

As biópsias hepáticas foram realizadas durante procedimento laparoscópico, com agulha descartável do tipo "Tru-Cut" (*Travenol Laboratories Inc, Illinois, USA*), proporcionando fragmentos em torno de 20 mm de comprimento, em geral com mais de 5 espaços-porta, conforme recomendado por Knodell e cols (KNODELL e cols., 1981).

O tecido hepático obtido, fixado em formalina a 10% e incluído em parafina, foi seccionado na espessura de 5 micrômetros e montado em lâminas de vidro albuminizadas, totalizando 4 cortes sequenciais de cada bloco, em lâminas separadas. Após a secagem em estufa a 35°C, por 12 a 24 horas, os cortes foram submetidos a coloração por hematoxilina e eosina (2 lâminas) e tricromo de Masson (2 lâminas).

As lâminas foram codificadas e submetidas em pares (hematoxilina/eosina e tricromo de Masson) a dois patologistas independentes com experiência no diagnóstico histopatológico de doenças hepáticas. Cada examinador realizou interpretação individual, sendo que, na eventualidade de divergências quanto ao diagnóstico histopatológico de determinada biópsia, era realizada análise simultânea e discussão dos casos até obtenção de consenso.

A interpretação histopatológica foi realizada segundo critérios vigentes na época do estudo e descritos a seguir. (BIANCHI e GUDAT, 1994). O diagnóstico histopatológico de hepatite crônica persistente (HCP) baseou-se nos achados de infiltrado inflamatório restrito aos espaços-porta, respeitando a membrana limitante, sem necrose; o diagnóstico de hepatite crônica ativa leve (HCA-L), baseou-se na presença de necrose em saca-bocado em apenas um segmento focal do perímetro de alguns espaços-porta; o diagnóstico histopatológico de HCA moderada (HCA-M) fundamentou-se na presença de denso infiltrado inflamatório e extensa necrose em saca-bocado, envolvendo porções substanciais do perímetro de quase todos espaços-porta; o diagnóstico histopatológico de HCA severa (HCA-S) foi baseado na presença dos mesmos achados da HCA-M, acrescidos de necrose confluyente em ponte. Finalmente, o diagnóstico de cirrose (CIR) ativa, baseou-se na presença de fibrose, regeneração nodular e necrose em saca-bocado.

Os 107 pacientes estudados, com infecção crônica pelo VHC, foram divididos em tres grupos de acordo com o diagnóstico histopatológico: O grupo I, dito HCP, formado por 39 pacientes (36,4%) com diagnóstico histopatológico de HCP ou HCA-L; o grupo II, dito HCA, formado por 37 pacientes (34,6%) com diagnóstico histopatológico de HCA-M ou HCA-S, e, finalmente, o grupo III, dito CIR, formado por 31 pacientes (29%) com diagnóstico histopatológico de CIR ativa (figura 4).

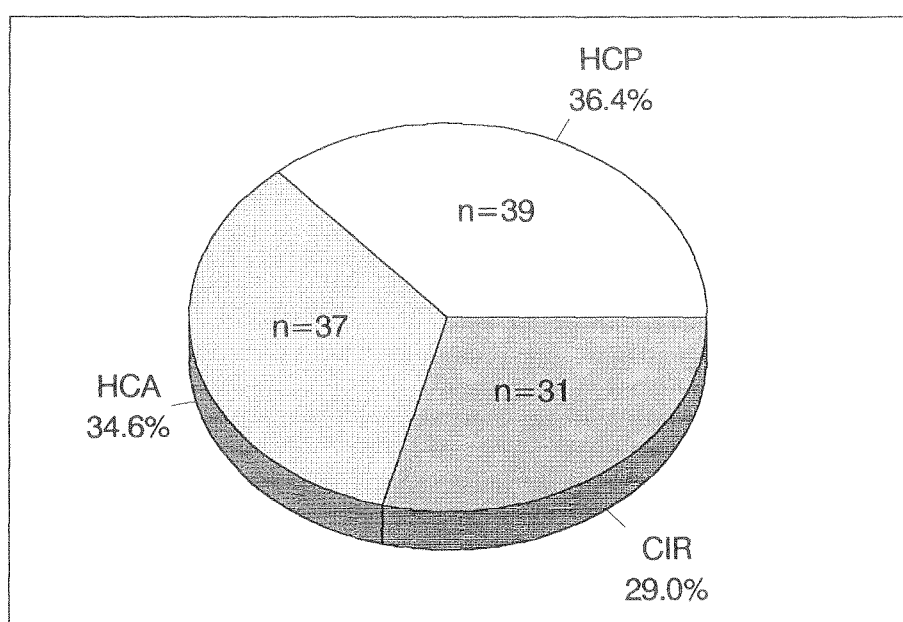


Figura 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação histopatológica.

Além do diagnóstico histopatológico convencional, procedeu-se a realização de escore numérico de cada fragmento de biópsia hepática por patologista independente, baseado no índice de atividade histopatológica (IAH) proposto por Knodell e cols. (KNODELL e cols., 1981). O valor total do IAH é obtido através da soma de pontos atribuídos para quatro categorias

distintas, incluindo: 1) necrose hepatocelular e/ou em ponte; 2) degeneração intralobular e necrose hepatocelular focal; 3) inflamação portal, e 4) fibrose.

3.2.7. Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis (χ^2 -K-W) nas comparações entre variáveis quantitativas e variáveis qualitativas descritivas, e pelo coeficiente de correlação de Spearman (rS) na verificação de correlação entre variáveis quantitativas. O nível mínimo de significância adotado foi de $\alpha=0,05$. Nas comparações múltiplas entre grupos, realizadas após se verificar diferença estatística no teste χ^2 -K-W, utilizou-se a correção do nível de significância através da divisão de α pelo número de testes realizados (COOPER DW, 1968).

As características operacionais da quantificação do RNA do VHC pelo método de bDNA foram obtidas através da determinação da sensibilidade e especificidade (FLETCHER e cols., 1989). O teste de kappa foi utilizado para avaliar o grau de concordância entre o bDNA e a determinação do RNA viral por RT-PCR (SACKETT e cols., 1991).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DO RNA DO VHC.

Do total de 107 pacientes com RNA do VHC detectado por RT-PCR, 88 (82,2%) apresentaram resultado positivo para a quantificação do RNA do VHC por bDNA, com valores superiores ao ponto de corte do teste, fixado em 350.000 eq RNA-VHC/ml.

Todos os 41 indivíduos do grupo controle, sem RNA do VHC detectável por RT-PCR, apresentaram resultado negativo para a quantificação viral pelo método de bDNA.

Para testar as características operacionais do teste bDNA com relação ao diagnóstico da infecção crônica pelo VHC, utilizou-se como padrão-ouro a presença do RNA do VHC por RT-PCR, de modo que os 107 pacientes RT-PCR positivos formaram o grupo dito "DOENTES", enquanto que os 41 controles RT-PCR negativos formaram o grupo dito "NÃO-DOENTES".

O teste bDNA, quando comparado ao RT-PCR, revelou taxa de sensibilidade de 82,2% e especificidade de 100% (figura 4).

	PCR +	PCR -	
bDNA +	88 a	0 b	88
bDNA -	19 c	41 d	60
	107	41	

a) Sensibilidade:

Fórmula: $S = (a) / (a + c)$

$S = 82,24\%$

b) Especificidade:

Fórmula: $E = (d) / (b + d)$

$E = 100\%$

Figura 4 - Características operacionais do teste bDNA

A concordância geral entre os testes ocorreu em 129 dos 148 casos estudados (87,2%). Considerando-se a que a concordância esperada com base apenas na chance é de cerca de 50%, os resultados evidenciam concordância adicional da ordem de 37%. Sabendo-se que a concordância máxima possível é de 100%, pode-se ainda estimar a concordância potencial além da chance (100% - 50% = 50%). Assim, o índice "kappa" para o teste bDNA, obtido através da divisão da concordância adicional além da chance (37%) pela concordância potencial além da chance (50%), foi de 0,74 (figura 5).

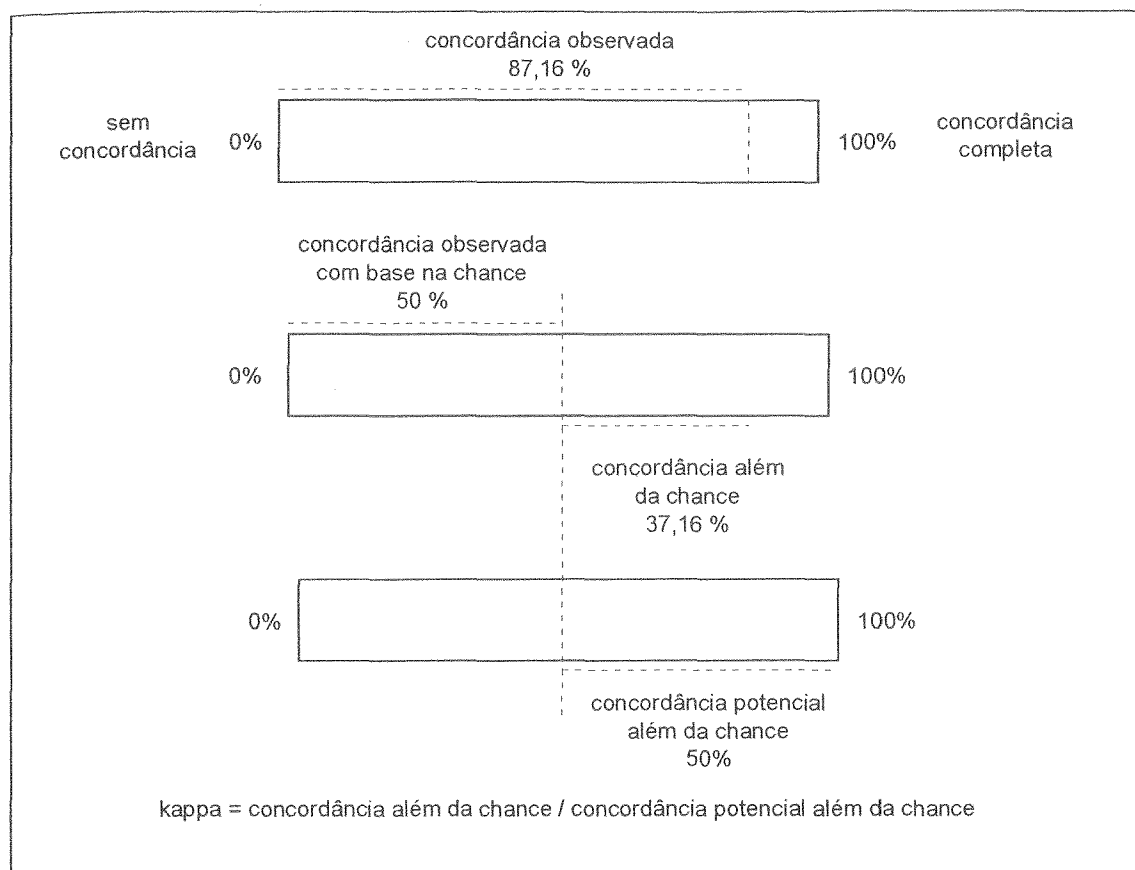


Figura 5 - Representação gráfica do valor kappa considerando dois testes diagnósticos: bDNA e RT-PCR

Cálculo do valor kappa:

a) Grau de concordância observado (v):

Fórmula: $(a + d) / (a + b + c + d)$

$v = 87,16\%$

b) Grau de concordância baseado na chance (z):

Fórmula:

$x = (a + c) / (a + b + c + d)$

$$y = (b + d) / (a + b + c + d)$$

$$z = [(a + b) \cdot x] + [(c + d) \cdot y] / (a + b + c + d)$$

$$z = 50\%$$

c) Índice kappa:

concordância além da chance / concordância potencial além da chance.

$$\text{kappa} = 0,74$$

4.2. CORRELAÇÃO ENTRE A HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA E AS DIVERSAS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA C

4.2.1. Diagnóstico Histopatológico e Características Demográficas

O Grupo I (HCP) era formado por 26 homens (66,7%) e 13 mulheres (33,3%), com idade variando entre 29 e 70 anos (média de 40,8 +/- 8,9 anos). Destes, 32 eram brancos (82,1%) e 7 eram pretos (17,9%);

O Grupo II (HCA), era formado por 24 homens (64,9%) e 13 mulheres (35,1%), com idade variando entre 30 e 74 anos (média de 46,8 +/- 12,3 anos). Destes, 33 eram brancos (89,1%), 3 eram pretos (8,1%) e 1 amarelo (2,8%);

O Grupo III (CIR), era formado por 18 homens (58,1%) e 13 mulheres (41,9%), com idade variando entre 32 e 84 anos (média de 52,4 +/- 14,3 anos). Destes, 28 eram brancos (90,3%) e 3 pretos (9,7%).

A análise estatística mostrou diferença significativa entre a média de idade do grupo HCP em relação ao grupo CIR (χ^2 -W=13,73; gl=1;

$p=0,0008$) e em relação ao grupo HCA (χ^2 -W=5,13; $gl=1$; $p=0,0236$). Por outro lado, não houve diferença significativa na média de idade do grupo HCA em relação ao grupo CIR (χ^2 -W=2,43; $gl=1$; $p=0,1190$).

Da mesma maneira, não foram significativas as diferenças de sexo e cor entre os diferentes grupos histológicos ($\chi^2=0,59$; $gl=2$; $p=0,7430$ e $\chi^2=1,30$; $gl=2$; $p=0,5230$, respectivamente) (tabela 1).

Tabela 1 - Relação entre histopatologia e características demográficas

	HCP	HCA	CIR
N (%)	39 (36,4%)	37 (34,6%)	31 (29,0%)
Idade (anos) ^a	40,8 +/- 8,9 ^d	46,8 +/- 12,3	52,4 +/- 14,3
Sexo (M/F) ^b	26/13	24/13	18/13
Cor (B/NB) ^c	32/7	33/4	28/3

^a Média +/- desvio padrão

^b M=masculino, F=feminino

^c B=branco, NB=não-branco (preto e amarelo)

^d Diferença estatisticamente significativa comparada com HCA ($p=0,02$) e CIR ($p=0,0008$)

4.2.2. Diagnóstico Histopatológico e Características

Laboratoriais

O parâmetro laboratorial analisado nos 107 pacientes com doença hepática crônica C foi o da determinação das aminotransferases AST e ALT.

Os 39 pacientes do Grupo I (HCP) apresentaram AST variando entre 25 e 215 UI/l (média de 87,54 +/- 40,23) e ALT variando entre 44 e 390 UI/l (média de 129,64 +/- 73,95);

Os 37 pacientes do Grupo II (HCA) apresentaram AST variando entre 27 e 305 UI/l (média de 96,43 +/- 40,23) e ALT variando entre 43 e 629 UI/l (média de 156,16 +/- 126,82);

Os 31 pacientes do Grupo III (CIR), por sua vez, apresentaram AST variando entre 21 e 398 UI/l (média de 139,48 +/- 81,42) e ALT variando entre 32 e 563 UI/l (média de 169,84 +/- 112,14).

A análise estatística destes dados mostrou diferença significativa na média da AST entre os grupos HCP e CIR (χ^2 -K-W=10,65; gl=1; p=0,0011) e HCA e CIR (χ^2 -K-W=6,72; gl=1; p=0,0095), mas não entre o grupo HCP e HCA (χ^2 -K-W=0,011; gl=1; p=0,9172). Quanto aos valores de ALT obtidos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tres grupos estudados (χ^2 -K-W=2,97; gl=2; p=0,2269) (tabela 2).

Tabela 2 - Relação entre histopatologia e aminotransferases (AST e ALT)

	HCP	HCA	CIR	Teste Estatístico
N (%)	39 (36,4%)	37 (34,6%)	31 (29,0%)	
AST (UI/l) ^a	87,54 +/- 40,23	96,43 +/- 40,23	139,48 +/- 81,42	$\chi^2=11,24$; gl=2;p=0,004 ^b
ALT (UI/l) ^a	129,64 +/- 73,95	156,16 +/- 126,82	169,84 +/- 112,14	$\chi^2=2,97$; gl=2;p=0,23

^a Valores normais para AST e ALT: até 40 UI/l (média +/- desvio padrão).

^b Kruskal-Wallis: HCP x HCA ($\chi^2=0,01$; gl=1; p=0,92); HCA x CIR ($\chi^2=6,72$; gl=1; p=0,009); HCP x CIR ($\chi^2=10,65$; gl=1; p=0,001), alfa corrigido = 0,017.

4.2.3. Diagnóstico Histopatológico e Índice de Atividade Histopatológica de Knodell

Houve correlação significativa entre o diagnóstico histopatológico convencional e a avaliação do IAH de Knodell. Os valores médios do escore de IAH encontrados nos grupos I, II e III foram de, respectivamente, 5,82 +/- 2,14, 11,14 +/- 3,38 e 16,29 +/- 2,64 ($p=0,0000$) (tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre histopatologia e índice de Knodell

	HCP	HCA	CIR	Teste Estatístico ^a
N (%)	39 (36,4%)	37 (34,6%)	31 (29,0%)	
Índice de Knodell	5,82 +/- 2,14	11,14 +/- 3,38	16,29 +/- 2,64	$\chi^2_{K-W}=73,26$; $gl=2$; $p=0,0000$

^a HCP x HCA ($\chi^2=34,73$; $gl=1$; $p=0,0000$); HCA x CIR ($\chi^2=49,23$; $gl=1$; $p=0,0000$), e HCP x CIR ($\chi^2=32,53$; $gl=1$; $p=0,0000$).

4.3. CORRELAÇÃO ENTRE A VIREMIA DO VHC E AS CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA C

4.3.1. Quantificação do VHC e Características Demográficas

Quanto ao sexo, 68 (63,6%) dos 107 pacientes estudados eram homens e apresentaram taxa de viremia do VHC que variou entre 0 e

43.008.000 eq RNA-VHC/ml (média de 8.109.870 +/- 11.421.440), enquanto que as 39 (36,4%) pacientes do sexo feminino apresentaram viremia variando entre 0 e 46.947.000 eq RNA-VHC/ml (média de 9.035.620 +/- 11.923.510). A análise estatística mostrou que os valores médios da viremia não diferiram de maneira significativa de acordo com o sexo (χ^2 K-W=0,24; gl=1; p=0,6218) (tabela 4).

Quanto à cor, 93 (86,9%) dos 107 pacientes estudados eram brancos e apresentaram taxa de viremia do VHC que variou entre 0 e 46.947.000 eq RNA-VHC/ml (média de 9.026.120 +/- 12.136.180), enquanto que os 14 pacientes (13,1%) não-brancos (13 pretos e 1 amarelo) apresentaram viremia variando entre 0 e 16.972.000 (média de 4.602.210 +/- 5.372.860). A análise estatística mostrou que os valores médios da viremia não diferiram significativamente de acordo com a cor (χ^2 K-W=1,69; gl=1, p=0,4300) (tabela 4).

Tabela 4 - Relação entre viremia e características demográficas

Característica	N (%)	Viremia (eq/ml)	log10 RNA	Teste Estatístico
Homens	68 (63,6%)	8.109.870 +/- 11.421.840	6,39 +/- 0,78	Kruskal-Wallis $\chi^2=0,24$; gl=1; p=0,62
Mulheres	39 (36,4%)	9.035.620 +/- 11.923.510	6,47 +/- 0,76	
Branco	93 (86,9%)	9.026.120 +/- 12.136.180	6,45 +/- 0,77	Kruskal-Wallis $\chi^2=1,69$; gl=1 p=0,43
Não-brancos	14 (13,1%)	4.602.210 +/- 5.372.860	6,18 +/- 0,81	

Quanto à idade, procurou-se estabelecer o coeficiente de correlação com a viremia nos 107 pacientes estudados. A análise estatística não mostrou correlação significativa ($rS=0,13$, $p>0,10$).

4.3.2. Quantificação do VHC e Características Laboratoriais

O parâmetro laboratorial analisado nos 107 pacientes com doença hepática crônica C foi o da determinação das aminotransferases AST e ALT.

Quanto à AST, procurou-se estabelecer o coeficiente de correlação com a viremia nos 107 pacientes estudados. A análise estatística não mostrou correlação significativa ($rS=-0,10$, $p>0,20$).

Além disso, para melhor analisar a relação entre a taxa de viremia e os valores de AST, os 107 pacientes foram divididos em dois grupos:

O primeiro grupo, constituído por 71 pacientes (66,4%) com AST inferior a 120 UI/l, apresentou viremia entre 0 e 46.947.000 eq RNA-VHC/ml (média de 9.684.630 +/- 12.792.050);

O segundo grupo, formado por 36 pacientes (33,6%) com AST igual ou superior a 120 UI/l, apresentou viremia entre 0 e 31.575.000 eq RNA-VHC/ml (média de 6.006.970 +/- 8.256.870).

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre a viremia do VHC e a média dos valores agrupados de AST ($\chi^2_{K-W}=0,43$; $gl=1$; $p=0,5128$) (tabela 5).

Quanto à ALT, procurou-se estabelecer o coeficiente de correlação com a viremia nos 107 pacientes estudados. A análise estatística não mostrou correlação significativa ($rS= -0,02$, $p>0,50$).

Da mesma maneira, para melhor analisar a relação entre a taxa de viremia e os valores de ALT, os 107 pacientes foram divididos em dois grupos:

O primeiro grupo, formado por 52 pacientes (48,6%) com ALT inferior a 120 UI/l, apresentou viremia entre 0 e 41.633.000 eq RNA-VHC/ml (média de 8.366.750 +/- 11.174.960);

O segundo grupo, formado por 55 pacientes (51,4%) com ALT igual ou superior a 120 UI/l, apresentou viremia entre 0 e 46.947.000 eq RNA-VHC/ml (média de 8.523.440 +/- 12.014.100).

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre a viremia do VHC e a média dos valores agrupados de ALT ($\chi^2_{K-W}=0,19$; gl=2; p=0,6663) (tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre viremia e aminotransferases (AST e ALT)

Aminotransferases ^a (UI/l)	N (%)	Viremia (eq/ml)	log10 RNA	Teste estatístico
AST < 120	71 (66,4%)	9.684.630 +/- 12.792.050	6,43 +/- 0,83	$\chi^2_{K-W}=0,43$; gl=1; p=0,51
AST ≥ 120	36 (33,6%)	6.006.970 +/- 8.256.870	6,37 +/- 0,66	
ALT < 120	52 (48,6%)	3.366.750 +/- 11.174.960	6,37 +/- 0,83	$\chi^2_{K-W}=0,19$; gl=1; p=0,67
ALT ≥ 120	55 (51,4%)	8.523.440 +/- 12.014.100	6,45 +/- 0,72	

^a Valores normais de AST e ALT = até 40 UI/l

4.3.3. Quantificação do VHC e Histopatologia Hepática

Para analisar a relação entre a taxa de viremia e o diagnóstico histopatológico, os 107 pacientes foram divididos em tres grupos:

Os 39 pacientes do Grupo I (HCP), com diagnóstico histopatológico de HCP ou HCA leve, apresentaram viremia entre 0 e 39.187.000 eq RNA-VHC/ml (média de 3.796.030 +/- 8.075.090);

Os 37 pacientes do Grupo II (HCA), com diagnóstico histopatológico de HCA moderada ou severa, apresentaram viremia entre 0 e 46.947.000 eq RNA-VHC/ml (média de 16.908.490 +/- 13.654.660);

Os 31 pacientes do Grupo III (CIR), com diagnóstico histopatológico de cirrose ativa, apresentaram viremia entre 0 e 19.860.000 eq RNA-VHC/ml (média de 4.200.030 +/- 5.543.480).

A análise estatística mostrou que os valores de viremia do VHC obtidos nos pacientes do grupo HCA foram significativamente superiores aos dos pacientes dos grupos HCP e CIR (χ^2 K-W=24,80; gl=1; p=0,0000 e χ^2 K-W=18,36; gl=1; p=0,0000, respectivamente). Não houve diferença significativa detectada entre os pacientes do grupo HCP e os do grupo CIR (χ^2 K-W=2,21; gl=1; p=0,1371) (tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre viremia e histopatologia

	HCP (n=39)	HCA (n=37)	CIR (n=31)	Teste Estatístico ^a
N (%)	39 (36,4%)	37 (34,6%)	31 (29,0%)	
Viremia (eq/ml)	3.796.030 +/- 8.075.090	16.908.490 +/- 13.654.660	4.200.030 +/- 5.543.480	x ² =30,59; gl=2 p=0,0000
log ₁₀ RNA	6,02 +/- 0,70	6,95 +/- 0,68	6,26 +/- 0,60	

^a Kruskal-Wallis: HCP x HCA (x²=24,80; gl=1; p=0,0000); HCA x CIR (x²=18,38; gl=1, p=0,0000), e HCP x CIR (x²=2,21; gl=1; p=0,1371).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da técnica de PCR, há cerca de 10 anos, representou verdadeira revolução no campo da biologia molecular. Ao permitir a amplificação de quantidades mínimas de material genético, este método propiciou avanços particularmente importantes na área da virologia, onde as infecções eram geralmente diagnosticadas de forma indireta, através da detecção de anticorpos direcionados contra determinantes antigênicos das partículas virais (EISENSTEIN, 1990).

Em relação ao VHC, a detecção do RNA viral por PCR associada à transcriptase reversa (RT-PCR), vem sendo aplicada de maneira cada vez mais frequente, auxiliando tanto na detecção da infecção ativa por este agente, quanto no manejo clínico dos pacientes com doença hepática crônica C. Sua instituição na prática clínica diária representa, sem dúvida, grande avanço tecnológico e permite antever que, num futuro próximo, o diagnóstico de toda e qualquer doença infecciosa envolverá o uso das técnicas de biologia molecular.

Sabe-se que a PCR é método extremamente sensível, podendo detectar quantidades de DNA tão baixas quanto 10 moléculas por ml de amostra testada. Com relação à detecção do RNA do VHC, por outro lado, a adição do passo de transcriptase reversa eleva o ponto de corte da técnica para cerca de 1.000 a 2.000 cópias do genoma/ml, ainda assim considerado extremamente sensível (ALTER e cols., 1995).

No entanto, a alta sensibilidade da RT-PCR, consiste, ao mesmo tempo, em desvantagem, pois torna-a susceptível a resultados falso-positivos, relacionados principalmente à contaminação da amostra a ser testada. Este fato, aliado a falta de padronização universal do método, tem

dificultado a comparação dos resultados entre os diferentes centros (URDEA, 1994a).

De fato, estudo recente envolvendo 31 laboratórios sediados principalmente na Europa, Estados Unidos e Japão, promoveu a detecção qualitativa do RNA do VHC por diferentes técnicas de RT-PCR em amostras conhecidas e séries de diluições. Apenas 5 dos 31 laboratórios (16%) identificaram corretamente todas as amostras, com taxa de falsos-positivos da ordem de 11% (ZAAIJER e cols., 1993).

Portanto, tornam-se necessários cuidados extremos para evitar a contaminação das amostras e aumentar a acurácia da RT-PCR. Dentre os principais, recomenda-se a utilização apenas de materiais descartáveis, equipamento de fluxo aéreo laminar e a extração do material genético em laboratório distinto do usado para amplificação (EISENSTEIN, 1990; DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

No presente estudo, todas estas precauções foram utilizadas, somadas ao emprego de controles positivos e negativos para atestar a reprodutibilidade e a confiabilidade do método.

5.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES

Todos os pacientes estudados apresentavam anticorpos anti-VHC no soro, detectados por técnicas de segunda geração (ELISA II E RIBA II). Neste sentido, vários estudos tem demonstrado boa correlação entre os resultados obtidos por RIBA II e RT-PCR (URDEA, 1994a; DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

Com efeito, Bresters e cols. (BRESTERS e cols., 1993), estudando doadores de sangue positivos para o RNA do VHC por RT-PCR, encontraram 94% de anti-VHC positivos por RIBA II. Estes resultados foram

semelhantes aos encontrados em diversas séries na literatura (LELIE e cols., 1992; WATSON e cols., 1992; McHUTCHISON e cols., 1992; CHEMELLO e cols., 1993).

Por outro lado, sabe-se que existem indivíduos anti-VHC positivos por ELISA II ou RIBA II, porém sem viremia detectável por RT-PCR. Alguns destes casos podem representar infecção aguda, curada ou em resolução, enquanto outros podem refletir pacientes cronicamente infectados nos quais o VHC esteja em baixa taxa de replicação (URDEA, 1994a).

Outra explicação possível para este fato poderia estar relacionada à infecção por cepas mutantes do VHC, com variações genômicas que escapam à detecção do RNA viral pelos métodos comumente utilizados. Contudo, esta ocorrência parece pouco provável, uma vez que os testes disponíveis utilizam *primers* de regiões altamente conservadas do genoma (ALTER e cols., 1995).

Em nossa série, foram selecionados apenas pacientes anti-VHC positivos para ambos métodos imunológicos de segunda geração (ELISA II E RIBA II), associados à presença do RNA do VHC por RT-PCR, na tentativa de evitar a inclusão de casos equívocos.

Além desta precaução, todos os pacientes apresentavam histopatologia hepática compatível com infecção crônica viral e elevação das aminotransferases.

Portanto, o somatório dos critérios laboratorial (ALT e AST), imunológico (ELISA II e RIBA II), virológico (RT-PCR) e histopatológico (PBH), tornam improvável a presença de casos falso-positivos na presente casuística.

Não obstante os cuidados previamente mencionados, procurou-se ainda excluir desta análise pacientes com outros diagnósticos ou tratamentos simultâneos que pudessem introduzir fator de confusão na aferição da quantificação viral. Assim, foram excluídos, entre outros, pacientes

HBsAg positivos, pacientes com uso de corticóides ou drogas antivirais, pacientes com evidência de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e pacientes alcoolistas.

Com relação ao VHB, existem estudos sugerindo que a coinfeção com o VHC pode aumentar o grau de atividade histopatológica da doença hepática e alterar a taxa de replicação de ambos agentes virais (ALBERTI e cols., 1995). Acredita-se que estes vírus causam lesão hepática através de mecanismos distintos, sendo sugerido por alguns estudos que a interação *in vivo* entre ambos agentes virais possa causar efeitos sinérgicos, levando inclusive à hepatite fulminante ou ao carcinoma hepatocelular (KAKLAMANI e cols., 1991; SHEEN e cols., 1992; ALBERTI e cols., 1995).

De fato, tem sido demonstrado que o VHC, de forma isolada, raramente está envolvido na gênese da hepatite fulminante ou subfulminante (LIANG e cols., 1993), porém, quando associado ao VHB pode determinar o surgimento deste estado de falência hepática (WRIGHT e cols., 1992; WRIGHT, 1993; FÉRAY e cols., 1993).

Neste sentido, Cheinquer e cols. (CHEINQUER e cols., 1992) estudaram 15 pacientes HBsAg e anti-HBc IgM positivos com hepatite fulminante, encontrando em 5 (33%) evidência de infecção pelo VHC por RIBA II e/ou RT-PCR. Da mesma maneira, Féray e cols. (FÉRAY e cols., 1993), analisando 17 casos de pacientes HBsAg positivos (com ou sem anti-HBc IgM), com hepatite fulminante ou subfulminante, detectaram o RNA do VHC em 8 (47%).

Também com relação à replicação viral, parece haver interferência recíproca entre estes agentes, sendo que a maioria dos pacientes apresenta supressão do VHC em presença do VHB (ALBERTI e cols., 1995). Com efeito, François e cols. (FRANÇOIS e cols., 1994), comparando a diferença nos níveis de RNA do VHC por bDNA entre 8

pacientes com HBsAg e anti-VHC (ELISA III e RIBA III) e 8 pacientes apenas com anti-VHC (ELISA III e RIBA III), mostraram que apenas uma amostra de soro foi positiva no grupo VHC/VHB (2.600.000 eq RNA-VHC/ml), enquanto todas as amostras foram positivas no grupo infectado apenas com o VHC (540.000 a 12.000.000 eq RNA-VHC/ml; $p < 0,01$).

Por outro lado, estudos recentes tem demonstrado que a coinfeção do VHC com o HIV apresenta potencial de aumentar a taxa de replicação do VHC (THOMAS, 1994; SORIANO e cols., 1995), parecendo facilitar, inclusive, a transmissão materno-fetal deste agente viral (ALTER MJ, 1991; NOVATI e cols., 1992; RHOUDOT-THORAVALL e cols., 1993; SHERMAN e cols., 1993).

Da mesma maneira, existem evidências de que o uso de corticóides ou outros agentes imunossupressores, em pacientes com doença hepática crônica C, possa aumentar a viremia (FONG e cols., 1993; McHUTCHINSON e cols., 1993; MAGRIN e cols. 1994). Neste sentido, foram excluídos desta amostra quaisquer pacientes que estivessem utilizando fármacos com este potencial reconhecido.

Com relação ao álcool, tem sido postulado que a ingestão de quantidades até mesmo moderadas poderia aumentar a taxa de replicação viral, resultando em progressão do dano hepático (KOFF e DIENSTAG, 1995). De fato, Oshita e cols. (OSHITA e cols., 1994), estudando a quantificação do RNA do VHC por método de RT-PCR competitivo em 53 pacientes com doença hepática crônica C, demonstrou que aqueles considerados alcoólistas (>60g de etanol/dia por mais de 5 anos) apresentaram viremia significativamente maior em comparação aos não-alcoólistas ($8,5 \pm 0,5$ versus $7,7 \pm 0,8 \log_{10}$ cópias RNA/ml; $p < 0,01$).

5.2. SELEÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

A utilização de métodos de quantificação dos genomas virais tem se tornado ferramenta clínica cada vez mais importante para o entendimento dos mecanismos de lesão e para o acompanhamento do tratamento dos pacientes infectados. No caso da hepatite B, por exemplo, a quantificação do DNA do VHB permite prever com maior acurácia a resposta ao tratamento com interferon (IFN), a identificação do fenômeno de reativação viral e a detecção de variantes do VHB, como os mutantes do pré-core (DAVIS e cols., 1994).

No caso do VHC, no entanto, a quantificação de seu RNA é tarefa bem mais complexa devido aos baixos níveis séricos comumente encontrados (KOBAYASHI e cols., 1992) e ao fato de não ser normalmente detectado pelos métodos usuais de hibridização (HU e cols., 1992). Existem técnicas de quantificação do RNA do VHC baseadas na RT-PCR, porém, estas são consideradas "semi-quantitativas", pois o material genético é submetido à amplificação e o resultado não corresponde de maneira fidedigna à quantidade de vírus presente inicialmente na amostra, podendo variar em até 1.000 vezes para uma mesma amostra (URDEA, 1994a).

Portanto, a quantificação do RNA do VHC por RT-PCR, dependente da repetição de vários procedimentos utilizando amostras progressivamente diluídas, aumenta os custos, consome tempo excessivo e torna maiores as chances de contaminação (ZAAIJER e cols., 1993; URDEA, 1994a).

Por outro lado, o método de quantificação do RNA do VHC utilizado no presente estudo, designado bDNA ou "Quantiplex", ao contrário dos métodos semi-quantitativos, amplifica apenas o sinal, e não o alvo a ser

detectado. (URDEA, 1994a; ALTER e cols., 1995; DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

No bDNA, o ácido nucleico é extraído dos vírions por ação enzimática e detergente, sendo capturado por sondas específicas e disposto na superfície de placa semelhante à utilizada em testes rotineiros de enzima-imunoenensaio. A seguir, múltiplas cópias de sondas de DNA ramificado, ligadas à fosfatases alcalinas, são hibridizadas ao complexo imobilizado na placa, resultando em amplificação do sinal. A detecção é obtida através da adição de substrato luminoso com afinidade pelas fosfatases alcalinas, denominado dioxetano, medindo-se a emissão de luz gerada através de instrumento conhecido como luminômetro. Desta maneira, a luminosidade encontrada é diretamente proporcional à quantidade de RNA ou DNA presentes na amostra. Os resultados obtidos são confrontados com curva padrão, obtida simultaneamente à cada realização do procedimento, a partir de amostras com quantidades de VHC previamente conhecidas, sendo expressos em equivalentes genômicos por ml (URDEA, 1994a; URDEA, 1994b, ALTER e cols., 1995; DE MEDINA e SCHIFF, 1995).

Deve ser destacado ainda que, tanto o bDNA quanto o RT-PCR, utilizam sondas direcionadas contra as regiões mais conservadas do genoma viral, dificultando, assim, possíveis variações relacionadas às frequentes mutações genômicas do VHC (COLLINS e cols., 1995). No entanto, como o teste bDNA utiliza *primers* baseados na sequência genômica do VHC tipo I, é possível que os resultados da quantificação viral apresentem certa variação quando testados em outros genótipos do VHC, fato que deverá ser corrigido quando do lançamento da segunda versão do teste bDNA, dita "Quantiplex" 2.0 (CHIRON, 1995).

Portanto, considera-se que as principais vantagens do bDNA em relação à RT-PCR incluem o fato de ser método diretamente quantitativo,

técnicamente mais fácil de ser realizado e menos propenso à contaminação, pois não depende da realização de múltiplas amplificações com diferentes diluições.

5.3. REPRODUTIBILIDADE DOS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

Tem sido demonstrada boa correlação entre os resultados quantitativos obtidos por bDNA e os semi-quantitativos obtidos por RT-PCR com diluição seriada ou RT-PCR competitivo (URDEA, 1994a).

Com efeito, Lin e cols. (LIN e cols., 1994) realizaram estudo multicêntrico comparando 6 diferentes métodos para quantificação do RNA do vírus HIV, incluindo o método do bDNA, demonstrando alta reprodutibilidade entre os resultados obtidos nos diversos centros. Estes achados foram corroborados por vários grupos que utilizaram ambos métodos, bDNA e RT-PCR semi-quantitativo, para quantificação do RNA do VHC (IINO e cols., 1993; LAU e cols., 1993; SHERMAN e cols., 1993; MAGRIN e cols., 1994; DAVIS e cols., 1994; URDEA, 1994a).

Apesar de constituírem inegável avanço tecnológico, os testes de quantificação do RNA do VHC apresentam problema comum a todos os métodos que envolvem a detecção de material genético à base de RNA, relacionado à extrema facilidade com que este ácido nucleico degrada-se no soro (WANG e cols., 1992).

Embora o mecanismo exato desta deterioração seja desconhecido, postula-se que esteja relacionado à destruição do envelope lipoproteico viral por granulócitos/monócitos, seguido de exposição do ácido nucleico viral à ação de ribonucleases endógenas (DAVIS e cols., 1994). Com efeito, estudos prévios tem demonstrado que a quantidade de RNA do VHC no

soro pode ser alterada se o material ficar exposto à temperaturas inadequadas, ou mesmo se for congelado e descongelado várias vezes para repetidas avaliações (BUSCH e cols., 1992).

Assim, os resultados da quantificação do RNA são confiáveis e reproduzíveis, desde que as amostras a serem estudadas sejam coletadas, processadas e armazenadas de acordo com metodologia precisa pré-estabelecida.

Neste sentido, Davis e cols. (DAVIS e cols., 1994) estudaram os resultados da quantificação do RNA do VHC por bDNA em soro armazenado sob diferentes condições, encontrando evidência de perda progressiva da atividade do RNA quando o tempo entre a formação do coágulo e a centrifugação da amostra excedia 2 horas. Após 6 e 24 horas, havia perda da atividade do RNA do VHC de 25% e 44%, respectivamente.

Baseados nestes achados, os autores sugeriram o seguinte procedimento padrão para amostras submetidas ao bDNA: 1) o soro deve ser centrifugado em tubo separador de soro imediatamente ou, no máximo, até 2 horas após a formação do coágulo, e 2) o soro centrifugado deve ser congelado, preferencialmente nas primeiras 2 horas a partir da coleta, a -70°C , embora tenha sido igualmente demonstrado que o congelamento a -20°C possa manter o RNA igualmente estável por curtos períodos de tempo.

No presente estudo, todas as amostras foram processadas nas primeiras duas horas após a coleta e congeladas a -70°C , para permitir a conservação do material por períodos mais longos e a realização do teste de quantificação de forma simultânea para todas as amostras.

Além disto, o teste bDNA foi realizado em duplicata para cada amostra, sendo considerados adequados apenas resultados com variação inferior a 20%. Porém, em nenhuma ocasião, neste trabalho, observou-se diferença superior a 10% quando da repetição da quantificação de uma

mesma amostra, o que contribui para reforçar o alto grau de reprodutibilidade do método.

Deve ser destacado ainda o fato de que o método de bDNA pode ser usado também para quantificar o RNA do VHC no tecido hepático. Para tanto, deve-se utilizar fragmentos hepáticos congelados a -70°C até o momento da realização da quantificação, para impedir a perda progressiva do material genético viral (URDEA, 1994a).

Neste sentido, Dailey e cols. (DAILEY e cols., 1993) relataram, recentemente, a detecção do sinal do RNA do VHC em quantidades de fígado tão pequenas quanto 2 mg de tecido, com alta taxa de reprodutibilidade quando comparada aos controles positivos e negativos.

Por outro lado, estudos comparativos entre as taxas de RNA do VHC, determinadas por bDNA no soro e na biópsia hepática, tem demonstrado correlação significativa, embora os resultados apresentados no tecido sejam, via de regra, bem mais elevados (URDEA, 1994a).

Com efeito, Jeffers e cols. (JEFFERS e cols., 1993), estudando 23 pacientes com doença hepática crônica C, encontraram RNA viral sérico variando entre 48 e $5.100 \text{ Eq/ml} \times 10^3$ e RNA tecidual variando entre 100 e $138.000 \text{ Eq/ml} \times 10^3$. Através desta comparação, os autores consideram que a taxa de RNA do VHC sérico, obtido por bDNA, reflete a replicação hepática do vírus.

Da mesma maneira, Coelho-Little e cols. (COELHO-LITTLE e cols. 1994), comparando amostras pareadas de soro e tecido de pacientes com hepatite crônica ativa C, demonstraram correlação entre os resultados de RNA do VHC encontrados, porém com índice médio fígado/soro da ordem de 36, variando entre 1 e 138 vezes.

Em estudo recente, Idrovo e cols. (IDROVO e cols., 1993) demonstraram correlação altamente significativa ($r=0,9$; $p=0,001$) entre os

valores quantitativos obtidos por bDNA a partir de biópsias do lobo hepático direito (média de 273.213 +/- 363.931 Eq/g x 10³) e lobo hepático esquerdo (348.316 +/- 401.615 Eq/g x 10³).

Estes resultados são importantes para atestar não apenas a alta reprodutibilidade do método, como também a natureza difusa do processo de doença hepática crônica C e da distribuição do genoma viral no fígado, de modo que biópsias hepáticas de diferentes lobos, em um mesmo indivíduo, resultam em valores de quantificação semelhantes.

Deve ser ressaltado que a comparação entre valores de quantificação viral é válida apenas para o momento em que foram obtidos, pois os resultados podem apresentar flutuação significativa quando acompanhados de forma seriada (GARSON e cols., 1990; ALTER MJ e cols., 1992; LAU e cols., 1993).

Neste sentido, sabe-se que os níveis de RNA do VHC atingem pico durante a fase aguda da infecção, mostrando padrões variáveis de evolução a seguir (ALTER e cols., 1995; URDEA, 1994a). Enquanto alguns pacientes apresentam variação da viremia superior a um milhão de vezes, passando de indetectável para 10¹⁰ eq/ml, outros podem permanecer com taxas relativamente estáveis, na faixa de 10⁵ a 10⁶ eq/ml, por longos períodos (GRETCH e cols., 1992; BRILLANTI e cols., 1993; YUKI e cols., 1994b).

Este fato torna-se ainda mais importante na medida em que alguns estudos tem implicado a taxa de viremia como um dos fatores determinantes da resposta ao tratamento antiviral na doença hepática crônica C, através da demonstração de que baixos níveis de RNA do VHC na fase pré-tratamento correlacionam-se significativamente com alto índice de resposta ao interferon (WILBER e cols., 1992; BRANDÃO e CHEINQUER, 1993; IINO e cols., 1994; FRIED e HOOFNAGLE, 1995).

Lau e cols. (LAU e cols., 1993), por exemplo, registraram resposta sustentada ao interferon em mais de 50% dos pacientes cujos valores de bDNA pré-tratamento eram inferiores a 3.5×10^5 eq/ml. Este achado sugere que a quantificação viral possa ser usada para aumentar as chances de resposta ao tratamento, através da realização de múltiplas análises da viremia ao longo do tempo, iniciando-se a terapia no momento de menor replicação viral (URDEA, 1994a; THOMAS, 1994.).

No entanto, deve ser considerado o fato de que estes valores pré- e pós-tratamento representam apenas instantâneos de uma situação dinâmica, podendo não refletir de forma fidedigna o real estado virológico ou bioquímico do indivíduo infectado.

Além disto, o percentual de pacientes com viremia flutuante ou estável é desconhecido, assim como é desconhecida a periodicidade da variação dos níveis de RNA do VHC, tornando difícil a escolha dos momentos adequados para medição da quantificação viral.

No presente estudo, realizou-se medida da viremia em uma única ocasião, de modo que valores individuais tornam-se difíceis de analisar. Por outro lado, isto não invalida a análise dos pacientes como um grupo, verdadeiro objetivo do estudo.

5.4. CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DO VHC

O teste de quantificação do VHC pela técnica de bDNA apresenta como limite mínimo de detecção a marca de 350.000 equivalentes genômicos por ml (URDEA, 1993; URDEA, 1994b; CHIRON, 1995.). Estudos recentes indicam que sua sensibilidade varia entre 72% e 95%, quando confrontado com o padrão-ouro representado pela técnica de RT-PCR, capaz

de detectar entre 1.000 e 2.000 cópias do genoma do RNA do VHC por ml (LAU e cols., 1993; YUKI e cols., 1994b; URDEA, 1994a; ALTER e cols., 1995).

Recentemente, Alter e cols. (ALTER e cols., 1995) avaliaram a sensibilidade e especificidade do teste bDNA em uma variedade de situações clínicas, incluindo painel de amostras codificadas, pacientes com hepatite C pós-transfusional em fase aguda, pacientes com doença hepática crônica C e doadores de sangue assintomáticos com anti-VHC positivo.

O painel codificado, elaborado pelo CDC (Atlanta, E.U.A.), constava de amostras comprovadamente positivas e negativas para o VHC por RT-PCR, com infecciosidade demonstrada inclusive em modelos animais (chimpanzés) e seguimento prospectivo de indivíduos receptores de sangue. O bDNA, confrontado com este painel, apresentou 100% de especificidade, sem qualquer resultado falso-positivo. No entanto, em relação à sensibilidade, o bDNA falhou em detectar uma de seis amostras comprovadamente positivas e infectantes, representando acerto final de 83% em relação ao RT-PCR.

Com relação aos casos de hepatite C aguda, o estudo mostrou que o bDNA, à semelhança da RT-PCR, não apresentava período de janela imunológica, podendo ser utilizado para detecção de pacientes recentemente infectados.

Entre os 32 pacientes com doença hepática crônica C testados por Alter, o bDNA mostrou-se negativo em apenas um caso, o qual era positivo por RT-PCR, reforçando a idéia de maior sensibilidade da amplificação genômica em relação ao método quantitativo.

Ainda neste estudo, ao analisarem 100 doadores de sangue assintomáticos, positivos para o anti-VHC por ELISA II, os autores encontraram resultados concordantes de bDNA e RT-PCR em 96 casos.

Dentre os 4 casos discordantes, todos eram positivos por RT-PCR e negativos por bDNA.

Resultados semelhantes foram descritos por Johnson e cols. (JOHNSON P e cols., 1993) ao realizarem o teste bDNA em 817 pacientes positivos para o RNA do VHC por RT-PCR, incluindo casos de HCP, HCA de vários graus, cirrose, transplantados renais e pacientes em hemodiálise. Houve resultado positivo para o bDNA em 655 casos (sensibilidade de 80%), com níveis de RNA viral variando entre 5×10^4 e 1×10^7 eq/ml. Ainda neste estudo, os autores encontraram 1067 casos negativos de bDNA entre 1069 controles sem infecção pelo VHC, por RT-PCR (especificidade de 99,8%).

Da mesma maneira, Dela Rosa e cols. (DELA ROSA e cols. 1993), analisando 34 pacientes positivos para o RNA do VHC por RT-PCR, encontraram 29 positivos pelo bDNA (sensibilidade de 85%). Interessante ressaltar o fato de que as 5 amostras negativas para quantificação viral apresentavam títulos de RNA abaixo de 10^5 moléculas/ml, quando analisadas por RT-PCR semi-quantitativo.

Finalmente, Li e cols. (LI e cols., 1993) estudando 706 amostras de soro provenientes de igual número de pacientes com suspeita de doença hepática de diferentes etiologias, encontraram RNA do VHC por RT-PCR e bDNA em 66,7% e 62,2% dos casos, respectivamente. Considerando-se a RT-PCR como padrão-ouro, o total de falsos-positivos encontrado neste estudo foi da ordem de 1,1% (8/706) e o de falsos-negativos da ordem de 5,5% (39/706).

Assim, nota-se clara concordância na literatura quanto ao fato da técnica de RT-PCR apresentar maior sensibilidade para a detecção do RNA do VHC, quando comparada ao teste do bDNA, embora ambas possuam especificidade virtualmente indistinguível.

No presente estudo, confrontou-se a técnica de bDNA com a de RT-PCR no diagnóstico de pacientes com infecção crônica pelo VHC e seus controles, obtendo-se taxas de sensibilidade e especificidade do teste quantitativo semelhantes às descritas nos trabalhos mencionados anteriormente.

O cálculo do índice kappa foi utilizado para avaliar o nível de concordância entre o teste bDNA e a RT-PCR, na detecção do RNA do VHC (SACKETT e cols., 1991). O valor de kappa obtido (0,74) é considerado como "substancial" (LANDIS e KOCH, 1977), reforçando a validade das altas taxas de sensibilidade e especificidade verificadas em relação ao teste bDNA.

Com efeito, dos 107 pacientes positivos para o RNA do VHC por RT-PCR, 88 (82,2%) apresentaram valores de bDNA acima do ponto de corte de 350.000 eq/ml, confirmando, assim, a menor sensibilidade do método quantitativo em relação à amplificação genômica.

Por outro lado, dentre os 41 casos do grupo controle, todos foram negativos para o RNA do VHC por bDNA, configurando a alta especificidade deste teste quantitativo, já descrita na literatura.

A maior sensibilidade da técnica de PCR reside no fato desta poder detectar quantidades tão pequenas quanto 10 moléculas de DNA por ml de amostra testada. Sabe-se que a adição da etapa de transcriptase reversa, passo indispensável para amplificação de material genético à base de RNA, diminui a sensibilidade do método, o qual passa a detectar apenas quantidades acima de 1.000 a 2.000 moléculas/ml (ALTER e cols., 1995).

O bDNA, por sua vez, apresenta limite de detecção fixado em 350.000 eq/ml. Como consequência, sua sensibilidade em relação à RT-PCR gira em torno de 72 a 95%, embora possa ser aumentada de 8 a 20 vezes se forem utilizados volumes de soro superiores aos 50 µl propostos na técnica original (URDEA e cols., 1994a; ALTER e cols., 1995; CHIRON, 1995).

Pode-se especular que outra explicação para a diferença encontrada entre os resultados obtidos por RT-PCR possa estar relacionada à variações no desempenho do método em relação aos diferentes genótipos do VHC.

De fato, parece existir estreita correlação entre viremia e genótipos do VHC. Neste sentido, alguns estudos tem demonstrado níveis significativamente mais elevados de RNA do VHC em pacientes infectados com o VHC tipo 1, quando comparado aos baixos níveis detectados nos pacientes com VHC tipo 2 (YOSHIOKA e cols., 1992; YANO e YATSUHASHI, 1993; McOMISH e cols., 1994).

Assim, é pouco provável, embora não de todo impossível, que os genótipos do VHC tenham influência significativa na menor sensibilidade do bDNA em relação à RT-PCR, na medida em que as sondas de ambos os testes são dirigidas às regiões mais conservadas do genoma viral, refletindo-se na demonstrada capacidade do bDNA em reagir com a maioria dos genótipos conhecidos do VHC, fornecendo valores quantitativos com baixo coeficiente de variação entre as amostras estudadas (ALTER e cols., 1995).

5.5. QUANTIFICAÇÃO DO VHC E CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

O grau de atividade histopatológica da doença hepática crônica pelo VHC parece apresentar relação diretamente proporcional com a idade dos pacientes infectados.

De fato, observou-se entre os 107 pacientes estudados diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0002$) entre a idade média do grupo com diagnóstico histopatológico de HCP e HCA leve (40,8 anos) em relação ao grupo com diagnóstico histopatológico de cirrose (52,4 anos).

Este achado parece indicar progressão temporal da infecção crônica pelo VHC, evoluindo de formas leves, como a HCP, para as formas mais avançadas, como a cirrose, com o passar do tempo.

No entanto, no presente estudo, não houve correlação significativa entre a taxa de viremia e a idade ($r=0,13$), sugerindo que outros fatores devem ser responsáveis pela manutenção dos níveis de replicação viral.

Da mesma maneira, estudo recente envolvendo a quantificação do RNA do VHC por bDNA em 127 pacientes com diferentes graus de doença hepática crônica C, não evidenciou qualquer correlação entre a idade e os níveis de viremia ($r^2=0,01$) (GORDON e cols., 1994).

Com relação ao sexo, não encontrou-se relação com o grau de atividade histopatológica do processo ($p=0,74$) ou com a taxa de viremia ($p=0,62$). No entanto, 68 dos 107 pacientes (63,6%) eram do sexo masculino, contra 39 (36,4%) do sexo feminino, achado que talvez possa estar relacionado à vício de seleção, causado pela maior prevalência de pacientes do sexo masculino em hospitais de veteranos nos E.U.A.

Quanto à cor, também não houve diferença significativa, tanto em relação ao diagnóstico histopatológico nos diversos grupos estudados ($p=0,52$), quanto em relação à taxa de viremia ($p=0,43$).

5.6. QUANTIFICAÇÃO DO VHC E CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS

A análise da história natural da infecção pelo VHC indica que mais de 50% dos pacientes com hepatite aguda C evoluem para a cronificação, definida como elevação da ALT por mais de 6 meses (THOMAS, 1994).

Estudos recentes, utilizando a detecção do RNA do VHC por RT-PCR mostram taxas de até 90% de cronificação, questionando, inclusive, se existem mesmo casos de infecção aguda pelo VHC que evoluem para cura (ALTER, 1994).

De acordo com o comportamento das aminotransferases, foram descritos três padrões distintos de doença crônica em pacientes infectados pelo VHC (THOMAS, 1994):

1) padrão intermitente ou recidivante, caracterizado por grande flutuação dos níveis de ALT em relação ao limite superior da normalidade, retornando aos valores normais entre os períodos de exacerbação;

2) padrão contínuo, caracterizado por flutuação da ALT em níveis menos elevados que o padrão intermitente, porém persistentemente alterados, sem períodos de normalização;

3) padrão ausente ou "portador são", caracterizado por níveis persistentemente normais de ALT.

A realização da biópsia hepática nestes três grupos revela graus variáveis de doença hepática crônica, compreendendo desde fígado normal ou reacional até casos de cirrose ativa.

Assim, as aminotransferases, apesar de possuírem grande utilidade na prática clínica diária, apresentam relação variável com os achados histológicos, existindo casos de pacientes com ALT e AST normais e atividade histopatológica significativa. Embora saiba-se que a maioria dos pacientes positivos para o RNA do VHC apresentam ALT elevada, existe subgrupo de indivíduos com viremia e ALT normal.

Em estudo recente de doadores assintomáticos com infecção pelo VHC demonstrada por RT-PCR, avaliados com biópsia hepática em banco de sangue da cidade de Barcelona, encontrou-se ALT elevada em 89%

dos 54 pacientes com HCA ou cirrose. Por outro lado, torna-se significativa a constatação de que 11% destes casos apresentaram aminotransferases persistentemente normais (ESTEBAN e cols., 1991).

Do mesmo modo, no NIH, 31 doadores anti-VHC positivos e assintomáticos foram biopsiados. Todos eram RIBA II positivos e 97% possuíam RNA do VHC presente por RT-PCR. Os resultados mostraram que entre os 12 pacientes com níveis de ALT acima de duas vezes o normal, 91% tinham HCA e 9% cirrose, comparados com os 43% de HCA e 0% de cirrose naqueles casos com ALT persistentemente normal (ALTER MJ, 1992).

Tem sido igualmente demonstrado que, após o término da fase aguda da hepatite C, os níveis de ALT podem flutuar mais de 10 vezes, variando desde valores normais (cerca de 40 UI/l) até valores superiores a 500 UI/l (ALTER, 1994). Curiosamente, em alguns pacientes, as alterações nos níveis de RNA do VHC tendem a preceder aquelas de ALT, enquanto outros não apresentam qualquer correlação identificável entre os dois parâmetros (URDEA, 1994a).

No presente estudo, realizou-se apenas uma única determinação das aminotransferases e da quantificação do VHC, dificultando o estabelecimento de correlação temporal entre estas variáveis. Além disto, foram incluídos apenas pacientes com viremia e elevação das aminotransferases, não sendo, pois, possível, tecer-se considerações sobre o estado de "portador são".

A análise dos resultados das aminotransferases, medida em UI/l, revelou níveis médios progressivamente maiores em relação ao grau de atividade histopatológica.

Quanto à AST, os valores obtidos foram de 87,5 para HCP, 96,4 para HCA e 139,5 para CIR, sendo considerada esta diferença

estatisticamente significativa entre os grupos HCP e CIR ($p=0,001$) e HCA e CIR ($p=0,01$), porém não entre HCP e HCA ($p=0,92$).

Os níveis de ALT, por outro lado, apesar de também aumentarem com a progressão histopatológica, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p=0,23$), evidenciando-se valores de 129,6 para HCP, 156,2 para HCA e 169,8 para cirrose.

Neste estudo, não houve relação significativa entre a quantificação viral e os níveis de aminotransferases. Neste sentido, a média da viremia nos pacientes com níveis de ALT menores do que três vezes o limite superior da normalidade ($3.366.750 \pm 11.174.960$) mostrou valores inferiores aos encontrados nos pacientes com níveis de ALT maiores do que três vezes o limite superior da normalidade ($8.523.440 \pm 12.014.100$), sem, contudo, alcançar significância estatística, provavelmente devido ao grande desvio-padrão encontrado.

A análise da literatura revela que estes achados estão de acordo com o relatado na maior parte dos estudos, os quais também não encontraram correlação significativa entre os níveis séricos das aminotransferases e a quantificação do RNA do VHC, tanto pelo método de bDNA quanto por RT-PCR semi-quantitativa (LAU e cols., 1993; GORDON e cols., 1994; MARTINOT-PEIGNOUX e cols., 1994).

De fato, Gordon e cols. (GORDON e cols., 1994), analisando 127 pacientes com doença hepática crônica C através do bDNA, não encontrou correlação significativa entre os níveis de aminotransferases e a quantificação viral ($p=0,52$). Da mesma maneira, Martinot-Peignoux e cols. (MARTINOT-PEIGNOUX e cols., 1994), estudando dois grupos de doadores de sangue infectados cronicamente com o VHC, 33 com aminotransferases persistentemente elevadas e 21 com aminotransferases persistentemente normais, não encontraram diferença significativa em relação à média dos

níveis séricos do RNA do VHC, embora houvesse tendência à maior viremia no grupo com ALT elevada em relação ao grupo com ALT normal ($28,6 \times 10^5$ versus $14,7 \times 10^5$ Eq/ml, respectivamente).

Por outro lado, estudo realizado recentemente em 64 doadores de sangue assintomáticos com infecção crônica pelo VHC, utilizando quantificação do RNA do VHC por RT-PCR competitiva, encontrou níveis médios de viremia significativamente superiores ao comparar o grupo com ALT normal ($5,8 \pm 1,5$ log mol/ml) com o grupo com ALT elevada ($6,9 \pm 0,8$) (GRETCH e cols., 1994).

No presente estudo, não foram incluídos pacientes com aminotransferases normais, fato que dificulta a comparação com os estudos acima mencionados.

5.7. QUANTIFICAÇÃO DO VHC E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

Os mecanismos através dos quais o VHC provoca lesão hepática são ainda pouco conhecidos. Não se sabe se este agente viral é diretamente citopático, como alguma cepas do VHA, ou se, por outro lado, age de modo indireto, como o VHB, induzindo a destruição dos hepatócitos infectados através da ativação do sistema imune. Por outro lado, estas hipóteses não se excluem mutuamente, de modo que tanto o mecanismo citopático quanto o imunológico possam interagir na determinação do grau de lesão hepática resultante da infecção pelo VHC (ALTER, 1994).

Estudos que apoiam a teoria do dano imunológico indireto incluem aqueles demonstrando possível papel do VHC na patogênese das hepatites autoimunes (STRASSBURG e MANNIS, 1995; McFARLANE e PATH, 1991). Existe, no entanto a possibilidade de que esta associação esteja

relacionada à resultados falsos-positivos dos anticorpos anti-VHC, provavelmente relacionados ao padrão característico de hipergamaglobulinemia às custas de IgG, comumente observado nas doenças autoimunes (McFARLANE e cols., 1990; MITCHEL e cols., 1993).

De fato, alguns autores tem encontrado alta taxa de resultados falsos-positivos para a detecção do anti-VHC pelos métodos de ELISA nestes pacientes, enquanto que a técnica de RIBA e a detecção do RNA do VHC por RT-PCR parecem proporcionar resultados confiáveis nesta situação (NISHIGUCHI e cols., 1992).

Neste sentido, Mitchel e cols. (MITCHEL e cols., 1993), em estudo recente, testaram 62 pacientes portadores de HCA autoimune para a presença de anticorpos anti-VHC por ELISA I e RIBA II, além do RNA do VHC por RT-PCR. Os resultados mostraram 12 pacientes (19%) positivos para ELISA I, porém apenas um destes confirmado por RIBA II e RT-PCR. Estudo detalhado dos 12 pacientes anti-VHC positivos mostrou valores mais altos de IgG sérica, quando comparados com os pacientes anti-VHC negativos (4.617 ± 1.712 mg/dl versus 2.484 ± 1.247 mg/dl, respectivamente).

Interessante ressaltar o fato de que associação do VHC com hepatite autoimune parece ser mais acentuada no subgrupo de pacientes classificados como HCA autoimune tipo II, caracterizada pela presença do anticorpo contra a fração microsomal fígado-rim (anti-LKM) (MITCHEL e cols., 1993). Nestes casos, parece que os peptídios do *core* do VHC apresentam sequências homólogas com proteínas celulares, ocasionando resposta imunológica de anticorpo chamado anti-GOR, direcionado ao mesmo tempo contra epitopos do VHC e da célula hepática (MISHIRO e cols., 1990; MICHEL e cols., 1992).

Outro fato que pode corroborar o papel do ataque imunológico do VHC reside no achado de diversas manifestações extra-hepáticas, em sua

maioria de natureza autoimune, descritas de forma variável em indivíduos com doença hepática crônica C. De acordo com os dados disponíveis, as afecções mais fortemente associadas ao VHC incluem a crioglobulinemia mista essencial, a glomerulonefrite membranoproliferativa e a porfiria cutânea tarda (JOHNSON RJ e cols., 1993; GUMBER e CHOPRA, 1995; ALTRAIF e cols., 1995; KOFF e DIENSTAG, 1995). Além destas, outras condições tem sido descritas, embora com menor número de evidências, tais como a tireoidite autoimune, úlcera de córnea de Mooren, síndrome de Sjögren, líquen plano e fibrose pulmonar idiopática (GUMBER e CHOPRA, 1995).

O potencial de lesão imunológica do VHC parece ser também reforçado pelo fato de haver sido descrita necrose hepatocelular associada à presença de linfócitos T citotóxicos e antígenos do sistema HLA-I em pacientes com doença hepática crônica C (ALTER, 1994; THOMAS, 1994).

Com efeito, células T citotóxicas, sensibilizadas contra antígenos provenientes da região não-estrutural do VHC, foram recentemente clonadas a partir de fragmentos de fígado humano infectado (KOZIEL e cols., 1992).

Em estudo recente, Freni e cols. (FRENI e cols., 1995) investigaram a natureza dos agregados linfóides intrahepáticos, comumente observados tanto na doença hepática crônica C quanto na HCA autoimune. Os autores descreveram este achado em 76 de 128 casos (59%), identificando por técnica imunohistoquímica a presença de *core* constituído por linfócitos B e linfócitos T (auxiliar/indutor), cercados por anel externo composto principalmente por linfócitos T (supressor/citotóxico).

Estes estudos, no entanto, demonstram apenas que existe algum grau de resposta imunológica do hospedeiro à presença do VHC, porém falham em determinar sua importância na patogênese do processo de doença hepática crônica. Por outro lado, a existência de estado de "portador

são", se confirmada, apoiaria de forma quase definitiva a hipótese de que existe, de fato, mecanismo indireto de lesão hepática nesta afecção.

Contudo, os estudos tem mostrado que existem alguns pacientes com RNA do VHC detectável, porém sem qualquer evidência clínica, bioquímica ou histopatológica de lesão hepática, configurando o chamado estado de portador "são" (ALTER, 1994).

Neste sentido, Prieto e cols. (PRIETO e cols., 1995) estudaram a histopatologia hepática de 98 doadores de sangue assintomáticos anti-VHC positivos, identificando subgrupo de 25 pacientes (25%) com fígado normal ou apenas com alterações mínimas. Em 24 destes (96%) os níveis de ALT eram persistentemente normais, sendo identificada a presença do RNA do VHC por RT-PCR em 8 casos (33,3%). Assim, os autores concluem que parece existir realmente o estado de portador "são" na infecção crônica pelo VHC, embora seja pouco frequente.

Deve, contudo, ser ressaltado que o simples fato de encontrar-se pacientes com RNA do VHC presente no soro e biópsia hepática "normal" ou com alterações mínimas, não indica de forma inequívoca a existência de mecanismo indireto de lesão na doença hepática crônica C. Este achado poderia estar na dependência do estado de *quasispécie*, no qual o VHC desenvolve cepas com mutações causadas por pressão do sistema imunológico hospedeiro, sendo possível a seleção eventual de variantes menos agressivas (BUKH e cols., 1995).

Por outro lado, tem sido descritos alguns casos de falha da biópsia hepática em demonstrar a presença da atividade histopatológica, seja devido a erro de amostragem ou erro de interpretação do observador (SOLOWAY e cols., 1971; MAHARAJ e cols., 1986).

No entanto, estudos comparativos demonstram a superioridade da biópsia hepática realizada através de laparoscopia, tanto por

proporcionar fragmentos mais adequados, quanto pelo fato de aumentar a acurácia do diagnóstico de cirrose, que pode ser perdido em até 20% das biópsias às cegas (BRUGUERA e cols., 1974; PAGLIARO e cols., 1982).

No presente estudo, todas as biópsias foram realizadas mediante laparoscopia, sendo de cerca de 1,5 a 2,0 cm o tamanho médio do fragmento hepático obtido.

Com relação ao mecanismo citopático do VHC, também existem evidências na literatura que apoiam a lesão hepática direta como fator determinante na patogênese da doença hepática crônica C. Entre as principais, destaca-se o fato do VHC aumentar sua taxa de replicação viral e seu potencial de causar doença mais grave em indivíduos imunocomprometidos, o padrão típico de evolução das aminotransferases no paciente respondedor ao interferon, além dos estudos relacionando de forma diretamente proporcional o grau de atividade histopatológica da doença com os níveis de RNA do VHC no soro dos pacientes infectados (ALTER, 1994).

Com relação ao comportamento do VHC em pacientes imunodeprimidos, têm sido relatado aumento da viremia e do grau de lesão hepática em pacientes transplantados, submetidos à tratamento imunossupressor e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (FONG e cols., 1993; McHUTCHINSON e cols., 1993; MAGRIN e cols. 1994; SORIANO e cols., 1995).

Em estudo recente, Soriano e cols. (SORIANO e cols., 1995) analisaram a taxa de viremia por RT-PCR quantitativo em 21 pacientes com doença hepática crônica C e graus diversos de imunossupressão causada pelo vírus da imunodeficiência humana. Seus resultados mostraram grande variação da viremia nos pacientes estudados (de 6.200 a 1 milhão de cópias do VHC/mm³), destacando, porém, o fato de que os indivíduos com contagem normal de linfócitos T CD4⁺ apresentaram viremia média significativamente

menor do que aqueles com imunodeficiência avançada e baixos níveis de CD4+ ($2,52 \times 10^5$ versus $3,78 \times 10^5$ cópias do VHC/mm³, $p < 0,05$).

Com relação a resposta ao tratamento antiviral, o paciente com doença hepática crônica C respondedor ao interferon apresenta, caracteristicamente, queda progressiva das aminotransferases, indicando que a diminuição da viremia correlaciona-se diretamente com a diminuição da atividade inflamatória. Este fenômeno é exatamente oposto ao observado na resposta ao tratamento do paciente portador de doença hepática crônica pelo VHB, o qual apresenta, via de regra, pico de elevação das aminotransferases antes de ocorrer a seroconversão do sistema HBeAg para anti-HBe, denunciando, ao contrário do VHC, o papel ativo do sistema imune do hospedeiro na inibição da replicação viral e na gênese da atividade inflamatória (BRANDÃO e CHEINQUER, 1993; IINO e cols., 1994; FRIED e HOOFNAGLE, 1995).

Quanto a correlação entre o grau de atividade histopatológica hepática e os níveis de RNA do VHC, alguns estudos tem demonstrado resultados controversos, utilizando diferentes escores para análise histopatológica e diferentes métodos para quantificação viral.

Assim, Gordon e cols. (GORDON e cols., 1994), analisaram o nível de viremia pelo método de bDNA em 121 pacientes com infecção crônica pelo VHC, dividindo-os de acordo com o diagnóstico histopatológico em HCP (42 casos), HCA (39 casos) e HCA com cirrose (40 casos). A média dos níveis de RNA do VHC para os três grupos, medidos em eq/ml $\times 10^5$, foi de, respectivamente, 29,5, 76 e 71. A análise estatística demonstrou que o grupo HCP possuía níveis de RNA do VHC significativamente inferiores aos dos pacientes dos grupos HCA e HCA com cirrose combinados ($p=0,02$). Neste estudo, não houve diferença entre os dois últimos grupos com relação à viremia ($p=0,52$). Além disso, a análise multivariada mostrou que a

histopatologia hepática foi a única variável a apresentar correlação com os níveis de RNA do VHC ($p=0,04$). Os autores concluem que os menores níveis de viremia estão, em geral, associados com doença hepática leve.

Do mesmo modo, Yuki e cols., (YUKI e cols., 1994), estudando a viremia, por bDNA, em 21 doadores de sangue assintomáticos positivos para o RNA do VHC por RT-PCR, encontraram estreita correlação com os achados histológicos avaliados pelo índice de Knodell. Levando em consideração os escores encontrados com relação à inflamação portal, inflamação lobular e necrose em saca-bocado, os autores mostraram níveis de viremia aumentando de modo progressivo conforme o aumento do índice de atividade histopatológica destes parâmetros. A análise estatística evidenciou resultados altamente significativos para esta correlação ($r=0,64$, $p<0,01$).

No presente estudo, como nos anteriores, a relação entre viremia e histopatologia mostrou resultados significativos. Dentre os 107 pacientes estudados, 39 apresentavam HCP, 37 apresentavam HCA e 31 apresentavam CIR. A média de viremia encontrada, medida por bDNA e expressa em eq/ml, foi de, respectivamente, 3.796.030, 16.908.490 e 4.200.030. A análise estatística mostrou diferença altamente significativa entre os grupos HCP *versus* HCA ($p=0,0000$) e HCA *versus* CIR ($p=0,0000$). Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos HCP *versus* CIR ($p=0,14$).

Apesar destes resultados confirmarem, em parte, a natureza citopática do VHC, deve ser ressaltado que a análise de resultados individuais evidenciou, por vezes, altos níveis de viremia em pacientes com HCP e baixos níveis de viremia em pacientes com HCA.

Da mesma maneira, é difícil explicar o achado, neste estudo, de níveis de RNA do VHC significativamente menores nos pacientes com cirrose ativa. Uma das razões para esta ocorrência pode residir no fato de que

a doença hepática avançada, ao provocar desarranjo importante da arquitetura hepática, modifique de tal forma o metabolismo da célula hepática, que termine por inibir de alguma forma os complexos mecanismos de replicação viral.

De qualquer modo, apesar das diferenças individuais encontradas, os achados aqui descritos parecem apontar para um papel predominantemente citopático do VHC. É possível que certas cepas deste agente viral possuam maior potencial citopático que outras, assim como alguns indivíduos apresentem maior grau de resposta imunológica que outros, porém existem diferenças fundamentais em relação ao VHB que fazem supor que a fisiopatologia da lesão hepática provocada pelo VHC esteja mais na dependência da presença direta do vírus no interior do hepatócito, e menos mediada por ataque imunológico indireto.

No entanto, qualquer que seja o mecanismo predominante de lesão hepática, percebe-se que este agente viral, que já infecta de forma crônica cerca de 1% da população mundial, está muito mais orientado no sentido de sua própria preservação do que no sentido da destruição do hospedeiro. Apenas o estudo criterioso e sistemático de todas as facetas desta complexa afecção poderá permitir a vitória contra esta formidável máquina de sobrevivência que é o VHC.

6. CONCLUSÕES

1. Em grupo de pacientes com doença hepática crônica C e controles negativos, a quantificação do RNA do VHC pelo método do bDNA mostrou boa correlação com a detecção qualitativa do RNA viral, obtida através da técnica de RT-PCR. A concordância de 87% verificada entre ambos os testes foi considerada altamente significativa, com índice "kappa" de 0,74. Considerando-se a especificidade de 100% encontrada nesta série, conclui-se que resultados positivos de bDNA confirmam a infecção pelo VHC de modo idêntico a RT-PCR, com a vantagem de proporcionarem informação sobre a taxa de viremia. No entanto, devido a sua menor sensibilidade, o achado de resultado negativo por bDNA não afasta a possibilidade de infecção, necessitando confirmação adicional por RT-PCR.

2. Quanto a correlação entre os aspectos demográficos e histopatológicos nos casos de doença hepática crônica C estudados, houve tendência a elevação progressiva da idade média dos pacientes na medida em que aumentava o grau de atividade histopatológica. Deste modo, a idade média do grupo HCP foi considerada significativamente inferior aquela encontrada nos grupos HCA e CIR. Este achado enfatiza o caráter aparentemente progressivo desta afecção e acrescenta dados em relação a maior probabilidade de encontrar-se doença avançada entre os indivíduos mais idosos. Com relação ao sexo, houve tendência definida à superioridade numérica masculina nos três grupos histológicos estudados, podendo-se supor que este dado reflita maior prevalência do VHC entre homens. Contudo, existe a possibilidade de que este achado possa representar vício de seleção, pois parte dos pacientes analisados eram provenientes de Hospital de

Veteranos dos E.U.A., onde existe predomínio de pacientes do sexo masculino. Com relação à cor, o número de pacientes não-brancos na presente casuística foi pequeno, dificultando a avaliação desta característica em relação à intensidade do processo histopatológico.

3. Quanto a correlação entre os níveis de aminotransferases e o grau de atividade histopatológica, houve tendência a elevação progressiva da média de ALT e AST nos grupos HCP, HCA e CIR. Os níveis de AST foram significativamente maiores no grupo CIR em relação aos grupos HCA e CIR, contudo, analisando-se os resultados obtidos de pacientes isolados, encontrou-se considerável superposição dos valores destas enzimas. Concluiu-se, portanto, que uma única determinação de aminotransferases não possibilita, de modo fidedigno, a estimativa do grau de diferenciação histopatológica do indivíduo com doença hepática crônica C.

4. Quanto aos aspectos demográficos não foi detectada correlação significativa entre os resultados de quantificação do RNA viral, obtidos pelo método de bDNA, e os dados referentes à idade, sexo e cor dos pacientes com doença hepática crônica C estudados. Quanto aos aspectos laboratoriais, embora sem significado estatístico, notou-se tendência ao achado de níveis médios mais altos de viremia no grupo de pacientes com ALT maior ou igual a 120 UI/l. Concluiu-se que, na presente casuística, a taxa de viremia não parece variar de modo importante com os aspectos demográficos e laboratoriais.

5. Quanto a correlação entre o grau de atividade histopatológica e a quantificação viral, houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de doença hepática crônica C aqui estudados. Os

pacientes do grupo HCA apresentaram nível médio de viremia consideravelmente superior ao dos pacientes do grupo HCP e CIR. Este achado parece apoiar a existência de mecanismo citopático na patogênese da doença hepática crônica C, porém deve ser destacado o fato de não haver sido encontrada diferença entre os níveis de viremia dos grupos HCP e CIR, além do achado de grande superposição individual nos valores individuais de viremia. Pode-se, portanto, supor que existam outras variáveis determinantes do grau de lesão hepática nos pacientes com doença hepática crônica C, além das estudadas na presente casuística, servindo estes achados como referência para investigações futuras.

7. ANEXO
(lista dos pacientes)

No.	Nome	Idade	Sexo	Cor	PBH	AST	ALT	RNA-VHC (eq/ml)	log10 RNA	Knodell
1	R.A.	41	M	B	HCA-L	81	196	32,247,000	7.5	5
2	E.A.	32	M	B	CIR	92	175	1,612,000	6.21	16
3	V.A.	64	F	B	CIR	166	198	486,000	5.7	18
4	W.B.	58	M	B	HCA-S	75	102	26,000,083	7.41	15
5	M.B.	57	F	B	CIR	164	113	505,000	5.7	18
6	K.C.	38	M	B	HCP	74	107	5,937,000	6.77	2
7	D.E.	36	M	B	HCA-L	62	107	1,044,000	6.02	5
8	R.E.	42	M	B	CIR	152	116	2,538,000	6.4	17
9	A.G.	66	F	B	CIR	68	122	2,127,000	6.42	16
10	S.H.	33	M	B	HCA-S	160	362	2,946,000	6.47	13
11	D.I.	38	F	B	HCA-S	159	188	1,732,000	6.24	16
12	J.J.	51	F	B	HCA-S	49	67	34,091,000	7.53	15
13	P.K.	46	F	B	CIR	174	254	15,813,000	7.2	15
14	G.K.	35	M	B	HCA-L	83	151	6,391,000	6.8	5
15	B.K.	42	F	B	HCP	81	135	39,187,000	7.59	3
16	B.K.	78	F	B	CIR	107	109	14,323,000	7.16	16
17	A.L.	29	M	B	HCA-L	56	86	722,000	5.85	3
18	J.L.	49	M	B	HCA-M	45	94	22,738,000	7.36	9
19	G.L.	60	F	P	HCA-S	103	171	16,972,000	7.23	11
20	J.M.	36	M	B	HCA-S	158	439	30,387,000	7.48	14
21	J.M.	37	M	B	HCA-L	35	44	353,000	5.55	4
22	C.M.	74	F	B	HCA-S	94	126	20,943,000	7.32	14
23	E.M.	36	M	B	CIR	101	118	2,206,000	6.34	18
24	N.O.	58	F	A	HCA-S	138	195	5,338,000	6.73	12
25	A.P.	38	M	B	HCA-M	42	46	20,102,000	7.3	7
26	L.R.	30	M	B	HCA-M	48	79	19,763,000	7.29	7
27	S.S.	79	M	B	CIR	208	378	829,000	5.92	18
28	G.S.	54	F	B	HCA-L	91	202	4,089,000	6.61	4
29	R.S.	37	F	B	CIR	173	326	660,000	5.82	18
30	J.S.	59	M	B	HCA-M	88	127	43,008,000	7.63	6
31	M.W.	42	M	B	HCA-M	59	77	41,633,000	7.62	9
32	P.W.	46	F	B	HCA-S	105	47	20,789,000	7.32	14
33	L.W.	58	M	B	HCA-S	156	283	16,190,000	7.21	13
34	E.Z.	48	M	B	CIR	72	72	3,169,000	6.5	18
35	B.S.	34	F	B	HCA-L	138	197	691,000	5.84	11
36	R.C.	32	M	B	CIR	87	113	8,774,000	6.94	18
37	J.C.	48	M	B	CIR	273	387	3,905,000	6.59	14
38	M.D.	43	M	B	HCA-M	75	132	7,685,000	6.88	6
39	D.M.	38	M	B	HCA-M	49	109	2,951,000	6.47	12
40	F.M.	51	M	B	HCA-L	144	262	3,299,000	6.52	3
41	D.L.	44	M	B	HCA-M	27	58	6,454,000	6.81	5
42	R.H.	40	M	B	HCA-M	73	130	16,261,000	7.21	7
43	J.M.	41	M	B	HCA-M	83	172	8,470,000	6.93	9
44	L.W.	37	M	B	HCA-L	50	89	3,497,000	6.54	5
45	A.B.	43	F	B	HCA-L	122	144	14,076,000	7.15	3
46	S.P.	39	M	B	HCA-M	35	57	22,263,000	7.35	5
47	W.D.	36	M	B	HCA-L	69	169	768,000	5.88	3

No.	Nome	Idade	Sexo	Cor	PBH	AST	ALT	RNA-VHC (eq/ml)	log10 RNA	Knodell
48	R.K.	31	F	B	HCA-M	94	174	5,495,000	6.74	10
49	M.B.	38	M	B	HCA-M	45	90	3,687,000	6.57	7
50	E.W.	69	F	B	CIR	144	146	17,433,000	7.24	20
51	M.D.	41	M	B	CIR	127	102	19,860,000	7.3	22
52	L.A.	50	M	B	CIR	127	139	1,053,000	6.02	16
53	B.S.	41	F	B	HCA-L	87	187	859,000	5.93	8
54	F.D.	40	M	B	HCA-S	89	102	7,613,000	6.88	15
55	J.P.	54	F	B	HCA-M	104	128	15,816,000	7.2	13
56	R.M.	40	M	B	HCA-L	73	144	6,659,000	6.82	8
57	L.L.	37	M	B	HCA-M	81	136	37,460,000	7.57	10
58	O.P.	66	F	B	HCA-M	54	64	31,189,000	7.49	12
59	L.H.	70	M	B	HCA-M	146	106	31,575,000	7.5	8
60	D.B.	34	F	B	HCA-M	43	96	449,000	5.65	11
61	R.B.	38	M	B	HCP	124	87	5,693,000	6.75	8
62	P.M.	40	M	B	HCP	80	116	2,410,000	6.38	7
63	W.G.	84	M	P	CIR	21	32	8,920,000	6.95	17
64	P.D.	44	F	B	HCA-S	65	154	46,947,000	7.67	15
65	L.B.	35	F	P	HCP	41	49	5,182,000	6.71	3
66	C.G.	35	M	B	CIR	94	87	1,401,000	6.15	16
67	R.D.	67	F	B	CIR	72	159	367,000	5.56	18
68	E.I.	49	F	B	HCA-S	212	163	4,875,000	6.69	15
69	P.H.	34	M	B	HCA-M	30	64	32,348,000	7.51	13
70	T.P.	46	M	B	CIR	68	68	4,671,000	6.67	14
71	D.V.	62	F	P	HCA-L	123	110	3,943,000	6.59	7
72	L.B.	70	M	B	HCA-L	52	102	615,000	5.79	3
73	M.E.	55	F	B	CIR	165	204	960,000	5.98	15
74	E.D.	32	M	B	HCA-L	50	88	2,309,000	6.36	5
75	L.F.	56	F	B	CIR	132	124	7,914,000	6.9	16
76	A.L.	55	F	B	HCA-L	50	75	2,742,000	6.44	6
77	R.F.	40	F	P	HCA-M	44	52	10,529,000	7.02	10
78	R.P.	52	F	B	CIR	111	161	1,616,000	6.21	16
79	J.L.	46	F	B	CIR	192	218	2,158,000	6.33	15
80	P.T.	38	M	B	CIR	86	173	481,000	5.68	17
81	R.B.	42	M	B	CIR	348	165	2,795,000	6.45	7
82	C.B.	37	M	P	HCA-M	305	629	10,832,000	7.01	11
83	E.F.	41	M	P	CIR	139	127	516,000	5.71	12
84	R.C.	32	M	P	HCA-L	140	274	2,199,000	6.34	6
85	M.M.	57	M	B	CIR	137	185	2,609,000	6.42	14
86	L.C.	32	M	B	HCA-L	125	188	848,000	5.93	8
87	S.R.	41	F	B	HCA-L	215	188	1,593,000	6.2	8
88	D.D.	38	M	B	HCA-L	116	390	692,000	5.84	7
89	E.G.	51	M	B	CIR	55	78	<350.000	5.24	18
90	M.T.	41	M	B	HCA-M	181	335	<350.000	5.24	11
91	S.O.	37	F	B	HCA-L	70	137	<350.000	5.24	8
92	M.C.	58	M	B	HCA-S	72	43	<350.000	5.24	17
93	J.J.	42	F	P	HCA-L	64	53	<350.000	5.24	8
94	M.M.	74	M	B	HCA-S	182	381	<350.000	5.24	15

No.	Nome	Idade	Sexo	Cor	PBH	AST	ALT	RNA-VHC (eq/ml)	log10 RNA	Knodell
95	J.C.	50	M	P	HCA-L	44	78	<350.000	5.24	8
96	R.M.	39	M	B	HCA-L	77	56	<350.000	5.24	7
97	S.B.	38	M	B	HCA-L	40	60	<350.000	5.24	5
98	G.T.	72	M	B	CIR	398	563	<350.000	5.24	18
99	B.G.	40	M	P	HCA-L	81	49	<350.000	5.24	5
100	M.C.	59	F	P	HCA-L	91	121	<350.000	5.24	5
101	J.M.	38	M	B	HCP	76	111	<350.000	5.24	6
102	G.P.	57	F	P	CIR	71	53	<350.000	5.24	14
103	J.C.	36	M	B	HCP	25	50	<350.000	5.24	4
104	L.S.	39	M	B	HCA-L	112	94	<350.000	5.24	7
105	T.W.	29	M	B	HCA-L	175	214	<350.000	5.24	9
106	G.M.	41	M	B	HCA-L	92	44	<350.000	5.24	8
107	L.D.	35	F	B	HCA-L	105	102	<350.000	5.24	7

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACH RD, STEVENS CE, HOLLINGER FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N. Engl. J. Med.*, 325: 1325-1329, 1991.
- ALBERTI A. Diagnosis of hepatitis C: Facts and perspectives. *J. Hepatol.*, 12: 279-282, 1991.
- ALBERTI A, PONTISSO P, CHEMELLO L, et al. The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J. Hepatol.*, 22 (Suppl. 1): 38-41, 1995.
- ALTER HJ. Discovery of the Non-A, Non-B hepatitis virus: The end of the beginning or the beginning of the end. *Transf. Med. Rev.* 3: 77-81, 1989.
- ALTER HJ. New kit on the block: Evaluation of second generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology*, 15: 350-353, 1992.
- ALTER HJ. Hepatitis C: Natural history. *American Association for the Study of Liver Diseases, Postgraduate Course, Viral Hepatitis A to F: An Update.*, Chicago, November, 1994. p. 225-245.
- ALTER HJ, PURCELL RH, HOLLAND PV, et al. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, i: 459-463, 1978.
- ALTER HJ, PURCELL RH, SHIH JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic Non-A, Non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 321: 1494-1500, 1989.

- ALTER HJ, SANCHEZ-PESCADOR R, URDEA MS, et al. Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J viral hepatitis*, 2: 121-132, 1995.
- ALTER MJ. Inapparent transmission of hepatitis C: Footprints in the sand. *Hepatology*, 14: 389-391, 1991.
- ALTER MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 5-14, 1995.
- ALTER MJ, MARGOLIS HS, KRAWCZYNSKI K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 27: 1899-1905, 1992.
- ALTRAIF IH, ABDULLA AS, AL SEBAYEL MI, et al. Hepatitis C associated glomerulonephritis. *Am. J. Nephrol.*, 15: 407-410, 1995.
- AOKI SK, KURAMOTO IK, ANDERSON S, et al. Evidence that use of a second generation hepatitis C antibody assay prevents additional cases of transfusion-transmitted hepatitis. *J. Viral Hepatitis*, 1: 73-77, 1994.
- BIANCHI L and GUDAT F. Chronic hepatitis. In: MacSWEEN RNM, ANTHONY PP, SCHEUER PJ and PORTMANN BC. *Pathology of the Liver*, 3rd ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994. p. 349-395.
- BLIGHT K, ROWLAND R, HALL PD, et al. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology. *Am. J. Pathol.*, 143: 1568-1573, 1993.
- BLIGHT K, TROWBRIDGE R, ROWLAND R and GOWANS E. Detection of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization. *Liver (Spec Issue)*, 12: 286-289, 1992.

- BLUMBERG BS, ALTER HJ, and VISNICH SA. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA*, 191: 101-106, 1965.
- BOUDART D, LUCAS JC, MULLER JY, et al. False positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinemia. *Lancet*, 335: 982-983, 1990.
- BOYER JL and REUBEN A. Chronic hepatitis. In: SCHIFF L & SCHIFF ER. *Diseases of the Liver*, 7th ed., Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1993. v. 1, p. 586-637.
- BRADLEY DW, KRAWCZYNSKI K, BEACH MJ and PURDY MA. Non-A, non-B hepatitis: Toward the discovery of hepatitis C and E viruses. *Sem. Liv. Dis.*, 11: 128-146, 1991.
- BRADLEY DW, KRAWCZYNSKI K, COOK EH Jr, et al. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27 to 34 nm viruslike particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6277-6281, 1987.
- BRANDÃO ABM e CHEINQUER H. Tratamento das hepatites crônicas B e C com interferon. Estado Atual. *Rev. Med. Sta. Casa P. Alegre*, 4: 836-847, 1993.
- BRESTER D, ZAAIJER HL, CUYPERS HTM, et al. Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion*, 33: 634-638, 1993.
- BRILLANTI S, FOLI M, GAIANI S, et al. Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *Lancet*, 341: 464-465, 1993.
- BRUGUERA M, BORDAS JM, MAS P and RODES J. A comparison of the accuracy of peritoneoscopy and liver biopsy in the diagnosis of cirrhosis. *Gut*, 15: 799-800, 1974.

- BUKH J, MILLER RH and PURCELL RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: Quasispecies and genotypes. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 41-63, 1995.
- BUSCH MP, WILBER JC, JOHNSON P, TOBLER L and EVANS CS. Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion*, 32: 420-425, 1992.
- CHEINQUER H, REDDY R, LI XM, et al. Prevalence of HCV infection and its influence on outcome in HBV-related fulminant hepatic failure. *Gastroenterology (abstract)*, 102: A792, 1992.
- CHEMELLO L, CAVALLETTO D, PONTISSO P, et al. Patterns of antibodies to hepatitis C virus in patients with chronic non-A, non-B hepatitis and their relationship to viral replication and liver disease. *Hepatology*, 17: 179-182, 1993.
- CHEN M, SÖNNERBORG A and SÄLLBERG M. Levels of hepatitis C virus (HCV) RNA in serum and their relationship to levels of immunoglobulin M and G antibodies against HCV core protein. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 778-780, 1995.
- CHIRON CORPORATION. Comparison of Quantiplex HCV RNA (bDNA) assay version 1.0 and version 2.0. *Chiron Diagnostics*, 1995.
- CHOO Q-L, KUO G, WEINER AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genomen. *Science*, 244: 359-362, 1989.
- COELHO-LITTLE E, REDDY KR, SCHIFF ER, JEFFERS LJ and DAILEY PJ. Correlation of HCV-RNA in serum and liver of patients with chronic hepatitis C (letter). *J. Hepatol.*, 20: 765, 1994.
- COLLINS M, ZAYATI C, DETMER J, et al. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. *Analytical Biochemistry*, 226: 120-129, 1995.

- COOPER DW. The significance level in multiple tests made simultaneously. *Heredity* 23(4): 614-617, 1968.
- COUROUCÉ A-M, BARIN F, BOTTÉ C, et al. A comparative evaluation of the sensitivity of seven anti-hepatitis C virus screening tests. *Vox. Sang.*, 69: 213-216, 1995.
- DAILEY JP, COLLINS MA, WRIGHT TL, et al. Development of a method to prepare liver tissue samples for quantification of HCV RNA using a branched DNA signal amplification (bDNA-SA) assay. *Gastroenterology (abstract)*, 104 (part2): A892, 1993.
- DAVIS GL, LAU JY-N, URDEA MS, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: Definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology*, 19: 1337-1341, 1994.
- DE MEDINA M and SCHIFF ER. Hepatitis C: Diagnostic Assays. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 33-40, 1995.
- DELA ROSA C, GRETCH D, LEE W and COREY L. Quantitation of HCV RNA in viremic patients: Comparison of quantitative RNA PCR with Chiron branched DNA microtiter assay. *93rd Annual ASM General Meeting, Atlanta, May, 1993.*
- DI BISCEGLIE AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 64-69, 1995.
- DIENES H, HUTTEROTH T, HESS G and MEUER S. Immunoelectron microscopic observation on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B. *Hepatology*, 7: 1317-1325, 1987.

- DIENSTAG JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. II. Experimental transmission, putative virus agents and markers, and prevention. *Gastroenterology*, 85: 439-462, 743-768, 1983.
- DIENSTAG JL, ALAAMA A, MOSLEY JW, et al. Etiology of sporadic hepatitis B surface antigen-negative hepatitis. *Ann. Intern. Med.*, 87: 1-6, 1977.
- DUSHEIKO G and SIMMONDS P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J. Viral Hepatitis*, 1: 3-15, 1994.
- EBLING F, NAUKKARIEN R and LÜKOLA J. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus as a predictor of infectivity. *Lancet*, 335: 982-983, 1990.
- EDITORIAL. Non-A, non-B ? *Lancet*, ii: 64-65, 1975.
- EISENSTEIN BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. Med.*, 322: 178-180, 1990.
- ESTEBAN JI, ESTEBAN R, VILADOMIU L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet*, ii: 294-297, 1989.
- ESTEBAN JI, LOPEZ-TALAVERA JC, GENESCA J, et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann. Int. Med.*, 115: 443-449, 1991.
- FEINSTONE SM, and HOOFNAGLE JH. Non-A, maybe-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 311: 185-189, 1984.
- FEINSTONE SM, KAPIKIAN AZ and PURCELL RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, 116: 1026-1028, 1973.

- FEINSTONE SM, KAPIKIAN AZ, PURCELL RH, et al. Transfusion- associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.*, 292: 767-770, 1975.
- FÉRAY C, GIGOU M, SAMUEL, et al. Hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in serum and liver of patients with fulminant hepatitis. *Gastroenterology*, 104: 549-555, 1993.
- FLETCHER RH, FLETCHER SW and WAGNER EH. *Epidemiologia clínica: Bases científicas da conduta médica*. Porto Alegre, Artes Médicas, 1989.
- FONG T-L, VALINLUCK B, GOVINDARAJAN S, et al. Effect of short-term prednisone administration on aminotransferase (ALT) levels and HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C. *Presented to American Association for the Study of Liver Disease*, Chicago, November, 1993.
- FRANÇOIS M, ROINGEARD P, DUBOIS F, et al. Lower serum hepatitis C virus RNA titers in patients with concurrent chronic hepatitis B virus infection. *J. Infect. Dis.*, 169: 1411-1412, 1994.
- FRIED MW e HOOFNAGLE JH. Therapy of hepatitis C. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 82-91, 1995.
- FRENI MA, ARTUSO D, GERKEN G, et al. Focal lymphocytic aggregates in chronic hepatitis C: Occurrence, immunohistochemical characterization and relation to marker of autoimmunity. *Hepatology*, 22: 389-394, 1995.
- GARSON JA, TUKE PW, MAKRIS M, et al. Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis-C-virus contaminated factor VIII concentrates. *Lancet* ii: 1022-1025, 1990.
- GONZALES-PERALTA RP, FANG JWS, DAVIS GL, et al. Optimization for the detection of hepatitis C virus antigens in the liver. *J. Hepatol.*, 20: 143-147, 1994.

- GOODMAN ZD and ISHAK KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 70-81, 1995.
- GORDON SC, KODALI VP, SILVERMAN AL, et al. Levels of hepatitis C virus RNA and liver histology in chronic type C hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 89: 1458-1461, 1994.
- GRETCH D, COREY L, WILSON J, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: High-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J. Infect. Dis.*, 169: 1219-1225, 1994.
- GRETCH D, LEE W and COREY L. Use of aminotransferase, hepatitis C antibody, and hepatitis C polymerase chain reaction RNA assays to establish the diagnosis of hepatitis C virus infection in a diagnostic virology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 8: 2145-2149, 1992.
- GUMBER SC and CHOPRA S. Hepatitis C: A multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann. Intern. Med.*, 123: 615-620, 1995.
- HAN JH, SHYMALA V, RICHMAN KH, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3'end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 1711-1715, 1991.
- HIJIKATA M, NOBUYUKI K, OOTSUYAMA Y, NAKAGAWA M and SHIMOTOHNO K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Biochemistry*, 88: 5547-5551, 1991.
- HINO O and KAJINO K. Hepatitis virus-related hepatocarcinogenesis. *Intervirology*, 37: 133-135, 1994.

- HINO K, SAINOKAMI S, SHIMODA K, et al. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.*, 42: 299-305, 1994.
- HOOFNAGLE JH and DI BISCEGLIE AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Sem. Liv. Dis.*, 11: 73-83, 1991.
- HOOFNAGLE JH, GERETY RJ, TABOR E, et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis. *Ann. Intern. Med.*, 87: 14-20, 1977.
- HOUGHTON M, WEINER A, HAN J, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 14: 381-388, 1991.
- HRUBY MA, and SCHAUF V. Transfusion-related short-incubation hepatitis in hemophilic patients. *JAMA*, 240: 1355-1357, 1978.
- HU K-Q, YU C-H and VIERLING JM. Direct detection of circulating hepatitis C virus RNA using probes from the 5' -untranslated region. *J. Clin. Invest.*, 89: 2040-2045, 1992.
- IDROVO V, JEFFERS L, COELHO-LITTLE E, et al. HCV-RNA quantitation in right and left lobes of the liver in patients with chronic hepatitis C (abstract). Presented at the *American Association for the Study of Liver Diseases Meeting*, Chicago, November, 1993.
- IINO S, HINO K and YASUDA K. Current state of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intervirology*, 37: 87-100, 1994.
- IINO S, KOMATA M, KUMADA H, et al. Quantification of HCV RNA by branched DNA probe assay. *J. Med. Pharmac. Sci.*, 2: 327-334, 1993.

- IKEDA Y, TODA G, HASHIMOTO N, et al. Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet*, 335: 1345-1346, 1990.
- INFANTOLINO D, BONINO F, ZANETTI AR, et al. Localization of hepatitis C virus (HCV) antigen by immunohistochemistry on fixed-embedded liver tissue. *Ital. J. Gastroenterol.*, 22: 198-199, 1990.
- ISHIYAMA N, KATAYAMA K, ISHIMI N, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus by multicyclic RT-PCR. *Jap. J. Gastroenterol.*, 6:1396, 1992.
- JARVIS LM, WATSON HG, McOMISH F, et al. Frequent reinfection and reactivation of hepatitis C virus genotypes in multitransfused hemophiliacs. *J. Infect. Dis.*, 170: 1018-1022, 1994.
- JEFFERS LJ, CHEINQUER H, HUNT W, et al. Correlation of ALT levels and severity of hepatic histology with a new quantitative HCV RNA method in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (abstract)*, 16: 588, 1992.
- JEFFERS LJ, DAILEY PJ, COELHO-LITTLE E, et al. Correlation of HCV-RNA quantitation in sera and liver tissue of patients with chronic C hepatitis. *Gastroenterology (abstract)*, 104: A923, 1993.
- JOHNSON P, CHAN C, DETMER J, et al. Direct detection and quantitation of HCV RNA in human serum. *Pan American Group for Rapid Viral Diagnosis Clinical Virology Symposium*, Clearwater, April, 1993.
- JOHNSON RJ, GRETCH DR, YAMABE H, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 329: 465-470, 1993.
- KABIRI M, TABOR E, and GERETY RJ. Antigen-antibody system associated with non-A, non-B hepatitis detected by indirect immunofluorescence. *Lancet*, ii: 221-224, 1979.

- KAKLAMANI E, TRICHOPOULOS D, TZONOU A, et al. Hepatitis B and C viruses and their interaction in the origin of hepatocellular carcinoma. *JAMA*, 265: 1974-1976, 1991.
- KANEKO S, MURAKAMI S, UNOURA M, and KOBAYASHI K. Quantitation of hepatitis C virus RNA by competitive polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, 37: 278-282, 1992.
- KANEKO S, UNOURA M, TAKEUCHI M, et al. The role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology*, 37: 108-113, 1994.
- KAO J-H, CHEN P-J, LAI M-Y, et al. Mixed infections of hepatitis C virus as a factor in acute exacerbations of chronic type C hepatitis. *J. Infect. Dis.*, 170: 1128-1133, 1994.
- KATO T, ESUMI M, YAMASHITA S, et al. Interferon-inducible gene expression in chimpanzee liver infected with hepatitis C virus. *Virology*, 190: 856-860, 1992.
- KHURROO MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.*, 68: 818-823, 1980.
- KIEVITS T, VAN GEMEN B, VAN STRIJP D, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods*, 35: 273-286, 1991.
- KNODELL RG, ISHAK KG, BLACK WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1: 431-435, 1981.
- KOBAYASHI Y, WANTANABE S, KONISHI M, et al. Detection of hepatitis C virus RNA by nested polymerase chain reaction in sera of patients with

chronic non-A, non-B hepatitis treated with interferon. *J. Hepatol.*, 16: 138-144, 1992.

KOFF RS. Viral Hepatitis. In: SCHIFF L & SCHIFF ER. *Diseases of the Liver*, 7th ed., Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1993. v. 1, p. 492-577.

KOFF RS and DIENSTAG JL. Extrahepatic manifestations of hepatitis C and the association with alcoholic liver disease. *Sem. Liv. Dis.*, 15: 101-109, 1995.

KOZIEL MJ, DUDLEY D, WONG JT, et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J. Immunol.*, 149: 3339-3344, 1992.

KRAWCKZYNSKI K, BEACH MJ, BRADLEY DW, et al. Hepatitis C antigen in hepatocytes. Immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology*, 103: 622-629, 1992.

KRAWCKZYNSKI K and BRADLEY DW. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.*, 159: 1042-1049, 1989.

KRUGMAN S, GILES JP, and HAMMOND J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA*, 200: 365-373, 1967.

KUO G, CHOO Q-L, ALTER HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 244: 362-364, 1989.

LAI ME, MAZZOLENI AP, ARGIOLOU F, et al. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassemic children. *Lancet*, 343: 388-390, 1994.

- LAMORIL J, LUNEL F, LAURENT-PUIG P, et al. Indeterminate third-generation recombinant immunoblot assay in hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 21: 133-134, 1994.
- LANDIS RJ and KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33: 159, 1977.
- LAU JYN, DAVIS GL, KNIFFEN J, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet*, 341: 1501-1504, 1993.
- LAVANCHY D, MAYERAT C, MOREL B, et al. Evaluation of third-generation assays for detection of anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies and comparison with presence of HCV RNA in blood donors reactive to c100-3 antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2272-2275, 1994.
- LENZI M, BALLARDINI G, FUSCONI M, et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet*, 335: 258-259, 1990.
- LELIE PN, CUYPERS HTM, REESINK HW, et al. Patterns of serological markers in transfusion-transmitted hepatitis C virus infection using second-generation HCV assays. *J. Med. Virol.*, 37: 203-209, 1992.
- LI XM, DE MEDINA M, SHAO JL, et al. Evaluation of HCV-bDNA assay by HCV-RT-PCR. *Presented to American Association for the Study of Liver Diseases Meeting*, Chicago, November, 1993.
- LIANG TJ, JEFFERS L, REDDY RK, et al. Fulminant or subfulminant non-A, non-B viral hepatitis: The role of hepatitis C and E viruses. *Gastroenterology*, 104: 556-562, 1993.
- LIN HJ, MYERS LE, YEN-LIEBERMAN B, et al. Multicenter evaluation of quantification methods for plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Infect. Dis.* 170: 553-562, 1994.

- MacSWEEN RNM. The pathology of chronic hepatitis. *American Association for the Study of Liver Diseases, Postgraduate Course: Liver Biopsy Interpretation for 1990's*, Chicago, November, 1991. p. 129-147.
- MAGRIN S, CRAXI G, FABIANO C, et al. Hepatitis C viremia in chronic liver disease: Relationship to interferon-alpha or corticosteroid treatment. *Hepatology*, 19: 273-279, 1994.
- MAGRIN S, CRAXI G, FIORENTINO C, et al. Is autoimmune chronic active hepatitis an HCV-related disease? *J. Hepatol.*, 13: 56-60, 1991.
- MAHARAJ B, MAHARAJ RJ, LEARY WP, et al. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* i: 523-525, 1986.
- MARGOLIS H. Epidemiology and control of viral hepatitis. *American Association for the Study of Liver Diseases, Postgraduate Course: New and Evolving Therapies for Hepatic and Biliary Diseases*, Chicago, November, 1993. p. 124-130.
- MARTINOT-PEIGNOUX M, MERCELLIN P, GOURNAY J, et al. Detection and quantitation of serum HCV-RNA by branched DNA amplification in anti-HCV positive blood donors. *J. Hepatol*, 20: 676-678, 1994.
- MATSUURA Y, HARADA S, SUZUKI R, et al. Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *J. Virol.*, 66: 1425-1431, 1992.
- McFARLANE IG and PATH MRC. Autoimmunity and hepatotropic viruses. *Sem. Liv. Dis.*, 11: 223-233, 1991.
- McFARLANE IG, SMITH HM, JOHNSON PJ, et al. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenic factor or false-positive result? *Lancet*, 335: 754-757, 1990.

- McHUTCHISON JG, PERSON JL, GOVINDARAJAN S, et al. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology*, 15: 19-25, 1992.
- McHUTCHISON JG, WILKES L, POCKROS P, CHAN C and WILBER J. Pulse corticosteroid therapy increases viremia (HCV RNA) in patients with chronic HCV infection. *Presented to American Association for the Study of Liver Disease*, Chicago, November, 1993.
- McOMISH F, CHAN SW, DOW BC, et al. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: Investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of aminotransferase abnormalities. *Transfusion*, 33: 7-13, 1993.
- MEYERS JD, DIENSTAG JL, PURCELL RH, et al. Parenterally transmitted non-A, non-B hepatitis. An epidemic reassessed. *Ann. Intern. Med.*, 87: 57-59, 1977.
- MICHEL G, RITTER A, GERKEN G, E COLS. Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver diseases. *Lancet*, 339: 267-269, 1992.
- MILLER RH and PURCELL RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2057-2061, 1990.
- MISHIRO S, HOSHI Y, TAKERA K, et al. Non-A, non-B hepatitis specific antibodies directed at host-derived epitope: implication for an autoimmune process. *Lancet*, 336: 1400-1403, 1990.
- MITA E, HAYASHI N, HAGIWARA H, et al. Predicting interferon therapy efficacy from hepatitis C virus genotype and RNA titer. *Dig. Dis. Sci.*, 39: 977-982, 1994.

- MITCHEL LS, JEFFERS LJ, REDDY KR, et al. Detection of hepatitis C virus antibody by first and second generation assays and polymerase chain reaction in patients with autoimmune chronic active hepatitis types I, II and III. *Am. J. Gastroenterol.*, 88: 1027-1034, 1993.
- MIYAMURA T, SAITO I, KATAYAMA T, et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: Application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 983-987, 1990.
- MOSLEY JW, REDEKER AG, FEINSTONE SM, et al. Multiple hepatitis viruses in multiple attacks of acute viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 296: 75-78, 1977.
- NISHIGUCHI S, KUROKI T, TADASHI , et al. Detection of hepatitis C virus antibody in the absence of viral RNA in patients with autoimmune hepatitis. *Ann. Intern. Med.*, 116: 21-25, 1992.
- NISHIOKA K. Epidemiological studies on hepatitis C virus infection: Detection, prevalence, exposure and prevention. *Intervirology*, 37: 58-67, 1994.
- NOLTE FS, THURMOND C and FRIED MW. Preclinical evaluation of AMPLICOR hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1775-1778, 1995.
- NOVATI R, THIERS V, D'ARMINIO-MONFORTE A, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 165: 720-723, 1992.
- OKAMOTO H and MISHIRO S. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology*, 37: 68-76, 1994.
- OKAMOTO H, OKADA S, SUGIYAMA Y, et al. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers

deduced from the 5'-noncoding region. *Jap. J. Experim. Med.*, 4: 215-222, 1990.

OKOCHI J and MURAKAMI S. Observation on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang*, 15: 374-375, 1968.

OSHITA M, HAYASHI N, KASHARA A, et al. Increased serum hepatitis C virus RNA levels among alcoholic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 20: 1115-1120, 1994.

PAGLIARO L, RINALDI F, CRAXI A, et al. Percutaneous blind biopsy versus laparoscopy with guided biopsy in diagnosis of cirrhosis. A prospective, randomized trial. *Dig. Dis. Sci.*, 28: 39-43, 1983.

POZZATO G, KANEKO S, MORETTI M, et al. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J. Med. Virol.*, 43: 291-296, 1994.

PRIETO M, OLASO V, VERDÚ C, et al. Does the healthy hepatitic C carrier state really exist? An analysis using polymerase chain reaction. *Hepatology*, 22: 413-417, 1995.

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

PRINCE AM, BROTMAN B, GRADY GF, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*, ii: 241-246, 1974.

RAVAGGI A, ZONARO A, MAZZA C, et al. Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive amplification of RNA from denatured serum and hybridization microtiter plates. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 265-269, 1995.

- RIZZETO M, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta-antidelta) associated with hepatitis B in liver and in serum of HBsAg carriers. *GUT*, 18: 997-1003, 1977.
- RIZZETO M. Viral Hepatitis. In: McINTYRE N, BENHAMOU J-P, BIRCHER J, RIZZETTO M, and RODES J. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, Oxford, Oxford University Press, 1991. v. 1, p. 529-530.
- ROBINSON WS. Biology of human hepatitis virus. In: ZAKIM D & BOYER TD. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, 2nd ed., Philadelphia, W.B.Saunders Company, 1990. v. 2, p. 890-945.
- ROGGENDORF M, DEINHARDT F, RASSHOFER R, et al. Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet*, ii: 324-325, 1989.
- ROUDOT-THORAVAL F, PAWLOTSKY J-M, THIERS V, et al. Lack of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-seronegative women: A prospective study with hepatitis C virus RNA testing. *Hepatology*, 17: 772-777, 1993.
- SACKETT DL, HAYNES RB, GUYATT GH, TUGWELL P. *Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine*. 2nd ed. Boston, Little, Brown, 1995.
- SANSONNO D and DAMMACCO F. Hepatitis C virus c100 antigen in liver tissue from patients with acute and chronic infection. *Hepatology*, 18: 240-245, 1993.
- SCHWARZENBERG SJ and SHARP HL. α 1-antitrypsin deficiency. In: SCHIFF L & SCHIFF ER. *Diseases of the Liver*, 7th ed., Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1993. v. 1, p. 692-706.
- SETO B, COLEMAN WG Jr, IWARSON S, et al. Detection of reverse transcriptase activity in association with the non-A, non-B hepatitis agent(s). *Lancet*, ii: 941-943, 1984.

- SHAPIRO CN. Epidemiology of viral hepatitis. *American Association for the Study of Liver Diseases, Postgraduate Course, Viral Hepatitis A to F: An Update.*, Chicago, November, 1994. p. 1-12.
- SHEEN IS, LIAW YF, CHU CM, and PAO CC. Role of hepatitis C virus infection in spontaneous hepatitis B surface antigen clearance during chronic hepatitis B virus infection. *J. Infect. Dis.*, 165: 831-834, 1992.
- SHERLOCK S. *Diseases of the Liver and Biliary System*, 8th, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1989. p. 301-338.
- SHERLOCK S and DUSHEIKO G. Hepatitis C virus updated. *Gut*, 32: 965-967, 1991.
- SHERMAN KE, O'BRIEN J, GUTIERREZ AG, et al. Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent human immunodeficiency virus infections. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2679-2682, 1993.
- SHINDO M, ARAI K, SOKAWA Y and OKUNO T. The virological and histological stages of anti-hepatitis C virus-positive subjects with normal liver biochemical values. *Hepatology*, 22:418-425, 1993.
- SHINDO M, DI BISCEGLIE AM, CHEUNG L, et al. Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann. Intern. Med.*, 115: 700-704, 1991.
- SHIRAIISHI R, SHIRAIISHI H, TATEDA A, et al. Hepatitis "C" antigen in non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet*, ii: 853-856, 1978.
- SIMMONDS P, ZHANG LQ, WATSON HG, et al. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs, and drug users. *Lancet*, 336: 1469-1472, 1990.

- SOLOWAY RD, BAGGENSTOSS AH, SCHOENFIELD LJ and SUMMERSKILL WHJ. Observer error and sampling variability tested in evaluation of hepatitis and cirrhosis by liver biopsy. *Dig. Dis.*, 16: 1082-1086, 1971.
- SORIANO V, BRAVO R, MAS A, et al. Impact of immunosuppression caused by HIV infection on the replication of hepatitis C virus. *Vox Sang*, 69: 259-260, 1995.
- SPERTINI O, and FREI PC. Demonstration of a single antigen-antibody system in 26 patients with non-A, non-B viral hepatitis. *Lancet*, ii: 899-903, 1982.
- STERNLIEB I and SCHEINBERG IH. Wilson's disease. In: SCHIFF L & SCHIFF ER. *Diseases of the Liver*, 7th ed., Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1993. v. 1, p. 659-668.
- STRASSBURG CP and MANNS MP. Autoimmune hepatitis versus viral hepatitis C. *Liver*, 15: 225-232, 1995.
- SUH DJ, WHITE Y, EDDLESTON ALWF, et al. Specificity of an immunoprecipitin test for non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, i: 178-180, 1981.
- TABOR E. The three viruses of non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, i: 743-745, 1985.
- TABOR E, SEEF LB, and GERETY RJ. Chronic non-A, non-B hepatitis carrier state. Transmissible agent documented in one patient over a six-year period. *N. Engl. J. Med.*, 303: 140-143, 1980.
- TANAKA Y, ENOMOTO N, KOJIMA S, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in the liver by in situ hybridization. *Liver*, 13: 203-208, 1993.
- TAVILL AS. Hemochromatosis. In: SCHIFF L & SCHIFF ER. *Diseases of the Liver*, 7th ed., Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1993. v. 1, p. 669-691.
- TERRAULT N and WRIGHT T. Interferon and hepatitis C. *N. Engl. J. Med.*, 332: 1509-1511, 1995.

- THEILMAN L, BLAZEK M, GOESER T, et al. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 335: 1346, 1990.
- THOMAS HC. Chronic hepatitis C: The role of interferons in chronic viral hepatitis. *Consultant Series*, 2: 1-50, 1994.
- TODROS L, TOUSCOZ G, D'URSO N, et al. Hepatitis C virus related chronic liver disease with auto-antibodies to liver kidney microsomes (LKM). *J. Hepatol.*, 13: 128-131, 1991.
- TSUTSUMI M, URASHIMA S, TAKADA A, et al. Detection of antigens related to hepatitis C virus RNA encoding the NS5 region in the livers of patients with chronic type C hepatitis. *Hepatology*, 19: 265-272, 1994.
- UCHIDA T. Pathology of hepatitis C. *Intervirology*, 37: 126-132, 1994.
- URDEA MS. Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for direct quantitative detection of CMV, HBV, HCV, HIV. *Clin. Chemistry*, 39: 725, 1993.
- URDEA MS. Hepatitis C virus. *American Association for the Study of Liver Diseases, Postgraduate Course, Viral Hepatitis A to F: An Update.*, Chicago, November, 1994a. p. 193-224.
- URDEA MS. Branched DNA signal amplification. Does bDNA represents post-PCR amplification technology? *Bio/Technology*, 12: 926-928, 1994b.
- VAN DER POEL CL, CUYPERS HT, REESINK HW, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet*, 337: 317-319, 1991.
- VAN DER POEL CL, REESINK HW, SCHAASBERG W, et al. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet*, 335: 558-560, 1990.

- VAN DOORN L-J. Review: Molecular biology of the hepatitis C virus. *J. Med. Virol.*, 43: 345-356, 1994.
- VILLAREJOS MV, VISONA KA, EDUARTE CA, et al. Evidence for viral hepatitis other than type A or type B among persons in Costa Rica. *N. Engl. J. Med.*, 293: 1350-1352, 1975.
- VITVITSKI L, TREPO C, PRINCE AM, et al. Detection of virus-associated antigen in serum and liver of patients with non-A non-B hepatitis. *Lancet*, ii :1263-1267, 1979.
- WANG JT, WANG TH, SHEU JC, et al. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase reaction assay for hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 750-753, 1992.
- WATSON HG, LUDLAM CA, REBUS S, et al. Use of several second generation serological assays to determine the true prevalence of hepatitis C virus infection in haemophiliacs treated with non-virus inactivated factor VIII and IX concentrates. *Brit. J. Haematol.*, 80: 514-518, 1992.
- WAYNER AJ, KUO G, BRADLEY DW, et al. Detection of hepatitis C virus sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 336: 1-3, 1990.
- WILBER JC, DETMER L, JEFFERS W, et al. Monitoring for the effect of α -interferon with a new quantitative method for measurement of HCV-RNA in serum of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 102: A910, 1992.
- WRIGHT TL. Etiology of fulminant hepatic failure: Is another virus involved? *Gastroenterology*, 104: 640-643, 1993.
- WRIGHT TL, MAMISH D, COMBS C, et al. Hepatitis B virus and apparent fulminant non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 339: 952-955, 1992.

- WYKE RJ, TSIQUAYE KN, THORNTON A, et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis to chimpanzees by factor-IX concentrates after fatal complications in patients with chronic liver disease. *Lancet*, i: 520-524, 1979.
- YAMADA G, NISHIMOTO H, ENDOU H, et al. Localization of hepatitis C viral RNA and capsid protein in human liver. *Dig. Dis. Sci.*, 38: 882-887, 1993.
- YANO M and YATSUHASHI H. HCV viral load, genotypes and efficacy of IFN therapy. *Current Therapy*, 11: 87-91, 1993.
- YOSHIOKA K, KAKUMU S, WAKITA T, et al. Detection of hepatitis C virus by polimerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: Relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, 16: 293-299, 1992.
- YUKI N, HAYASHI N, HAGIWARA H, et al. IgG and IgM core antibodies and viral replication in hepatitis C virus carriers. *J. Hepatol.*, 21: 110-114, 1994.
- YUKI N, HAYASHI N, TAKEHARA T, et al. Serum hepatitis C virus RNA levels and liver injury in volunteer blood donors. *Am. J. Gastroenterol.*, 89: 1462-1466, 1994.
- ZAAIJER HL, CUYPERS HTM, REESINK HW, et al. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet*, 341: 722-724, 1993

ABSTRACT

The objective of this study was to analyse the operational characteristics of the quantitation of hepatitis C virus (HCV) RNA by the branched DNA (bDNA) assay and to correlate the level of viremia with demographical, biochemical, and histopathological aspects of chronic hepatitis C. A total of 107 patients were prospectively studied from July 1991 to July 1992, in the Hepatology Service of the University of Miami School of Medicine, Florida, U.S.A. All patients had elevated aminotransferase levels for more than six months, were positive for anti-HCV antibodies by ELISA II and RIBA II, were HCV RNA positive by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and had a histopathological diagnosis of chronic hepatitis or cirrhosis. There were 68 (63,6%) males and 39 (36,4%) females. Age ranged from 29 to 84 years (mean 46,2 +/- 12,6 years). There were 93 (86,9%) caucasians, 13 (12,1%) blacks and 1 (0,9%) oriental. Forty one individuals were selected as controls, being all anti-HCV negative by ELISA II and RIBA II, and also HCV RNA negative by RT-PCR. Eleven of them were patients seen in the same liver clinic during the same period of the study (6 had primary biliary cirrhosis and 5 had chronic hepatitis B), while the other 30 were healthy volunteers. From a total of 107 patients that were HCV RNA positives by RT-PCR, bDNA testing was positive in 88 (sensitivity of 82,2%), and was negative among all controls (specificity of 100%). The agreement observed between both assays was 87,2%, with a "kappa" index of 0,74. The correlation between demographical data and the degree of histopathological activity showed a significantly higher mean age among patients with cirrhosis (CIR) as compared to those with chronic active hepatitis (HCA) (52,4 +/- 14,3 *versus* 46,8 +/- 12,3 years; $p < 0,02$) or chronic persistent hepatitis (HCP) (52,4 +/- 14,3 *versus* 40,8

+/- 8,9 years; $p < 0,0002$). Mean aspartate aminotransferase (AST) was significantly higher among patients with CIR, as compared to HCA (139,5 +/- 81,4 *versus* 96,4 +/- 40,2 UI/l; $p < 0,009$) and HCP (139,5 +/- 81,4 *versus* 87,5 +/- 40,2 UI/l; $p < 0,009$). HCV RNA quantitation by bDNA did not show any significant correlation with demographical or biochemical aspects of chronic C hepatitis patients. However, there was a significant correlation with the degree of histopathological activity. Patients from group HCA had a significantly higher mean viremia as compared to groups HCP (16.908.490 +/- 13.654.660 *versus* 3.796.030 +/- 8.075.090 eq RNA-VHC/ml; $p < 0,0000$) and CIR (16.908.490 +/- 13.654.660 *versus* 4.200.030 +/- 5.543.480 eq RNA-VHC/ml; $p < 0,0000$). In conclusion, the main findings of this work that support and contribute to a better understanding of chronic hepatitis C are the direct correlation between age and progression of histopathological activity, the substantial agreement between viral quantitation by bDNA and HCV RNA detection by RT-PCR, besides the fact that patients with a diagnosis of HCA had a significantly higher level of viremia, as a group, when compared to those diagnosed as HCP or CIR.