

Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura

Ajacio Bandeira de Mello Brandão,¹ Sandra Costa Fuchs,²
Mauro Alberto dos Anjos Silva¹ e Letícia Fanck Emer¹

RESUMO

Objetivo. O objetivo do presente estudo foi revisar a literatura a respeito dos testes laboratoriais para diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C, disponíveis desde 1989. O diagnóstico da hepatite C é baseado em métodos serológicos e em técnicas de biologia molecular. O método serológico, que utiliza pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C, é o mais frequentemente empregado para identificar a infecção, presente ou passada. Existem dois tipos de testes serológicos: os que adotam a técnica ELISA, de alta sensibilidade, usados no rastreamento da infecção; e os que utilizam a técnica immunoblot, de maior especificidade, denominados por isso suplementares ou confirmatórios. Em relação às técnicas de biologia molecular, existem vários testes. Um deles possibilita a detecção do RNA do vírus C, sendo útil para estabelecer o diagnóstico de infecção em situações específicas, como na fase inicial da infecção, em pacientes imunossuprimidos ou com baixa probabilidade de estarem infectados. Também são recomendados antes de se iniciar o tratamento com interferon e ribavirina e para monitorizar a resposta terapêutica. Outros testes de biologia molecular possibilitam determinar a carga viral, mediante amplificação do alvo, como na reação em cadeia de polimerase, ou amplificação de um sinal, como no DNA ramificado. A determinação do genótipo do vírus da hepatite C pode ser feita por metodologias de biologia molecular ou de serotipagem. A determinação da carga viral e do genótipo do vírus C servem para definir a duração do tratamento da hepatite crônica com interferon e ribavirina. Em geral, pode-se dizer que na última década houve grandes avanços no diagnóstico da hepatite C, com melhora na sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para detecção de anticorpos, o que permitiu diagnósticos mais rápidos e relativamente mais baratos. Contudo, é necessário desenvolver testes de maior acurácia para avaliar grupos determinados, como pacientes imunossuprimidos ou com hepatite aguda.

Palavras-chave

Hepatite C, serologia, ELISA, immunoblot, reação em cadeia de polimerase.

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é um problema de saúde pú-

blica em todo o mundo, inclusive no Brasil. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que em torno de 3% da população brasileira estaria infectada por esse vírus (1). O objetivo do presente estudo foi revisar a literatura existente a respeito dos testes laboratoriais para diagnóstico da infecção pelo VHC.

A disponibilidade de testes diagnósticos data de 1989 (2), quando foi decodificado o genoma do VHC por Choo et al. (3). A produção de antígenos e

peptídeos sintéticos possibilitou o desenvolvimento de testes que permitem a detecção de anticorpos contra o VHC (anti-VHC), como os testes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e RIBA (*recombinant immunoblot assay*). A terceira geração desses testes, que já está disponível, é proporcionalmente mais sensível e específica do que a primeira e segunda gerações (4). O desenvolvimento de técnicas para detecção qualitativa e quantitativa do ácido ribonucléico (RNA) do VHC, através da

¹ Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia. Correspondência e pedidos de separatas devem ser enviados a Ajacio Bandeira de Mello Brandão no seguinte endereço: Rua Engenheiro Álvaro Nunes Pereira 400/apto. 402, CEP 90570-110, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: ajacio@via-rs.net

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Social, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), aumentou a acurácia diagnóstica, mas as técnicas ainda não foram padronizadas (4) e os resultados variam entre os laboratórios. Também tornou-se possível determinar o genótipo do VHC em laboratórios clínicos, o que pode ser útil em situações específicas (4).

A disponibilidade de diferentes testes viabiliza o diagnóstico precoce, minimizando o potencial para disseminação da infecção, e torna relevante a discussão das indicações de cada teste, a partir de sua sensibilidade e especificidade.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HEPATITE C

Pesquisa de anticorpos contra o VHC

O VHC circula no sangue em baixa concentração (5). A detecção de anticorpos contra antígenos específicos do VHC é a maneira mais freqüentemente empregada para identificar a infecção, presente ou passada. Para isso, são utilizados testes de rastreamento, que apresentam alta sensibilidade, e testes suplementares, também denominados confirmatórios, com maior especificidade.

Testes de rastreamento

Em função da prevalência de infecção pelo vírus C, estimada em 3%, o diagnóstico da hepatite C requer um teste bastante sensível. Os testes comercializados para detecção do anti-VHC são os ELISA, que apresentam vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo (6). As três gerações de ELISA desenvolvidas até o momento utilizam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos para a captação do anti-VHC (tabela 1).

O teste ELISA I, de primeira geração (não mais utilizado na prática clínica), tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3. A sensibilidade de 80% do teste ELISA I indicava que, de cada 100 pacientes com evidências

TABELA 1. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos empregados nos testes para pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C^a

Antígeno (região do genoma)	ELISA I	RIBA I	ELISA II	RIBA II	ELISA III	RIBA III
5-1-1 (NS4)		×		×		
c100-3 (NS3-4)	×	×	×	×		×
c33-c (NS3)			×	×		×
c200 (fusão c100-3/c33-c)			×		×	
c22-3 (core)			×	×	×	×
NS5					×	×

^a A tabela inclui os antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos mais comumente utilizados nos testes para pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C.

clínicas e virológicas de infecção pelo VHC, 80 tinham um resultado positivo no teste (7). Por outro lado, entre os indivíduos sem infecção, o resultado do teste era positivo para 50 a 70% (taxa de falso-positivos) (4, 8). Assim, em grupos com baixa prevalência de infecção, como os doadores de sangue (9–11), apenas 30 a 50% daqueles com resultado positivo no ELISA I tinham infecção, documentada por teste de maior especificidade, como o RIBA ou a PCR.

A segunda geração do teste ELISA (ELISA II) surgiu em 1992 nos Estados Unidos (12), tendo incorporado duas proteínas recombinantes do VHC: c22-3 (derivada da região estrutural, ou *core*) e c33-c (derivada da região não-estrutural NS3). A proteína c33-c foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200. Em relação ao ELISA I, o ELISA II mostrou as seguintes vantagens: a) em grupos de baixo risco para a infecção pelo VHC, como os doadores de sangue, aumentou tanto a sensibilidade quanto a especificidade, reduzindo a taxa de falso-positivos para 40 a 50% (4, 8, 12–14); b) em grupos de alto risco de infecção, como hepatopatas ou aqueles com história de potencial exposição ao VHC, apresentou maior sensibilidade e especificidade, identificando cerca de 95% dos pacientes infectados com o VHC (4); c) reduziu de 16 para 10 semanas o tempo médio de seroconversão, ou seja, o tempo transcorrido entre a infecção e o surgimento do anticorpo (4). Em um estudo utilizando o ELISA I e II para avaliar amostras de sangue de

doadores cujos receptores tinham desenvolvido hepatite postransfusional, o ELISA I identificou 78% dos doadores anti-VHC reagentes, enquanto que o ELISA II identificou 89% (12).

Recentemente, evidenciou-se que um teste ELISA construído de forma artesanal e utilizando apenas o antígeno recombinante-22 foi comparável, no que se refere à sensibilidade e especificidade, a um ELISA II (15). É de realização mais simples e, possivelmente, mais barato do que os testes comerciais disponíveis, o que representaria uma vantagem adicional (15).

O teste ELISA de terceira geração (ELISA III) incluiu antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e adicionou um antígeno da região NS5 (tabela 1). A principal vantagem dessa nova geração do teste foi a redução do tempo médio de seroconversão, que passou para 7 a 8 semanas (4). Além disso, houve um aumento na sensibilidade para detectar infecção pelo VHC, tanto em doadores de sangue quanto em hepatopatas (16–19). A maior sensibilidade do ELISA III foi atribuída à nova configuração dos antígenos já presentes no ELISA II, e não à presença do antígeno NS5 (16, 20). Em doadores de sangue, a especificidade do ELISA III parece ser semelhante (21) ou até superior à do ELISA II (4, 17). Para grupos de alto risco, contudo, ela não está estabelecida (4). Em pacientes com suspeita de hepatite aguda pelo VHC, a negatividade da pesquisa do anti-VHC com ELISA III nas primeiras 8 semanas não exclui a doença.

Na tabela 2, adaptada de Gretch (4), estão indicadas a sensibilidade e o valor preditivo positivo das três gerações do teste ELISA em populações com alta e baixa prevalência de infecção pelo VHC. A sensibilidade identifica quantos indivíduos com infecção detectada através dos testes RIBA e PCR (padrão ouro positivo) têm resultado positivo no teste ELISA. O valor preditivo positivo caracteriza quantos indivíduos com um resultado positivo no teste ELISA são portadores da infecção, comparativamente ao diagnóstico através dos testes RIBA e PCR. Destaca-se o aumento da sensibilidade e a redução na taxa de falso-positivos a partir da primeira geração. Entretanto, os testes ELISA não detectam todas as pessoas infectadas com o VHC (4, 22–25) e, como não há padronização na produção de antígenos entre os vários fabricantes, os resultados podem variar, principalmente em grupos com baixo risco de infecção (26, 27).

Testes suplementares

A baixa especificidade dos ELISA determinou o desenvolvimento de testes suplementares para confirmação diagnóstica da infecção pelo VHC em indivíduos com resultados positivos. Nos testes suplementares, a especificidade indica a proporção de indivíduos com resultado negativo quando a infecção está ausente (padrão ouro negativo). Contudo, um resultado positivo mesmo em um teste suplementar, nem sempre é indicativo de infecção, visto que os pacientes que se recuperam da infecção podem permanecer anti-VHC positivos durante anos (28).

Um dos testes por *immunoblot* mais utilizados é comercializado com o nome de RIBA e produzido pela Chiron Corporation (Estados Unidos). As modificações de configuração do RIBA foram surgindo concomitantemente com as dos testes ELISA, havendo até o momento três gerações (29), sendo que o RIBA I não é mais comercializado. A tabela 1 mostra as proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos empregados nas três gerações dos testes ELISA e RIBA.

TABELA 2. Sensibilidade e valor preditivo positivo dos testes ELISA para pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C^a

ELISA	Sensibilidade ^c (%)	Valor preditivo positivo ^b (%)	
		Grupos de baixa prevalência	Grupos de alta prevalência
I	70 – 80	30 – 50	70 – 85
II	92 – 95	50 – 61	88 – 95
III	97	25	não avaliado

^a Tabela modificada a partir de Gretch (4).

^b Em comparação com RIBA. Os grupos de baixa prevalência incluem os doadores de sangue; entre os grupos de alta prevalência estão os pacientes com hepatite crônica.

^c Com base em achados clínicos e na detecção do RNA do vírus da hepatite C pela técnica de reação em cadeia de polimerase.

No RIBA, incuba-se o soro do paciente com tiras de nitrocelulose. Nessas tiras estão imobilizados, em bandas individuais, os diferentes antígenos recombinantes do VHC, a superóxido dismutase (SOD) — já que, pela tecnologia utilizada, todos os antígenos são fusionados com a SOD — e duas bandas controle de imunoglobulina G (29). Considera-se reação positiva o surgimento de bandas escuras nas tiras de nitrocelulose após a incubação com o soro do paciente. O teste é considerado positivo quando houver reação positiva a dois ou mais antígenos e indeterminado quando ocorrerem outros padrões de positividade (29).³

Tecnicamente, os testes suplementares não são considerados confirmatórios, uma vez que contêm os mesmos antígenos presentes nos testes ELISA (8). Entretanto, como o RIBA identifica

anticorpos a antígenos individuais, possui maior especificidade (28). Em relação aos testes para pesquisa do RNA viral, são de realização mais simples e de maior reprodutibilidade (28, 30).

Os testes RIBA II ou III têm sido empregados na avaliação diagnóstica de pessoas com baixa probabilidade de infecção pelo VHC e com reação positiva ao teste ELISA (4, 8, 31). Como a taxa de falso-positivos dos testes ELISA II ou III nesse grupo é elevada, justifica-se o uso de um teste suplementar para estabelecer o diagnóstico da infecção. Ao contrário, nas pessoas com maior probabilidade de infecção (história de exposição ao vírus ou alterações de aminotransferases, por exemplo) e com teste ELISA de segunda ou terceira geração positivo, mais de 95% apresentam confirmação da infecção pelo *immunoblot* (4, 8, 32). Nesse caso, o alto valor preditivo positivo do ELISA torna desnecessária a solicitação de um teste complementar (4, 8, 32, 33).

A interpretação dos resultados do RIBA II depende da probabilidade de o paciente apresentar infecção pelo VHC antes de realizar o teste. Entre os indivíduos com baixo risco de infecção pelo VHC, cerca de 76% daqueles com testes RIBA II positivos e 2% dos com resultado indeterminado são positivos no teste por PCR (34). Entre os indivíduos com alto risco para infecção pelo VHC, 90% daqueles com resultado positivo no RIBA II e 68% daqueles com resultado indeterminado (com reatividade aos antígenos c22-3 e c33-c) são

³ No RIBA II, uma banda visível com intensidade entre 1+ e 3+ (comparativamente à intensidade das bandas controle de imunoglobulina G; a intensidade máxima é 4+), é considerada 2+; e uma banda visível com intensidade acima de 3+ é considerada 4+, de acordo com os fabricantes. O resultado é indeterminado quando houver reatividade de 1+ ou mais a um único antígeno ou reatividade de 1+ ou mais contra os antígenos c100-3 e 5-1-1. O resultado é positivo quando houver reatividade de 1+ ou mais contra outras combinações de dois ou mais antígenos. Ocorrendo reatividade contra a SOD, o resultado positivo deve ser considerado indeterminado. No RIBA III, o teste é positivo quando ocorrer reatividade de 1+ ou mais contra dois ou mais antígenos. O resultado é indeterminado se ocorrer reatividade de 1+ ou mais contra um antígeno. Reatividade a múltiplos antígenos combinada com reatividade à SOD também configura resultado indeterminado.

positivos para a presença de RNA do VHC (34). Quando há reatividade apenas para os antígenos 5-1-1 ou c100-3 (que são da mesma região do genoma), praticamente não haverá confirmação da infecção (4, 8, 34).

A não detecção de RNA viral em amostras RIBA II positivas pode ter vários significados: a) manuseio inadequado da amostra, com conseqüente degradação do RNA viral; b) viremia intermitente (com nível, no momento da testagem, abaixo do limite de detecção); c) heterogeneidade genética do VHC, determinando incapacidade de detectar infecção com os testes disponíveis; d) resultado falso-positivo (35).

Comparativamente ao teste RIBA II, o RIBA III é mais específico e possui maior acurácia em relação aos resultados da PCR, além de produzir menor número de resultados indeterminados (36–38). Na série de Pawlotsky et al. (38), os resultados do teste RIBA III foram indeterminados em 10% dos pacientes, havendo confirmação da infecção, através da PCR, em 53% dos casos. Ao contrário, houve confirmação da infecção em 90% dos pacientes RIBA III positivos (38). Pacientes imunossuprimidos, com infecção pelo VHC confirmada pela pesquisa do RNA viral, têm maior probabilidade para resultados indeterminados no RIBA III (38). Em doadores de sangue, apenas 50% dos RIBA III positivos apresentam confirmação da infecção (37). O teste utiliza antígenos e peptídeos do genótipo 1 do VHC, o que pode comprometer os resultados na avaliação de pacientes infectados com outros genótipos (39).

Além do RIBA, existem outros testes suplementares por *immunoblot* para pesquisa do anti-VHC, de similar sensibilidade, produzidos por outros fabricantes como, por exemplo, o teste Matrix HCV (Abbott Laboratories, Chicago, Estados Unidos) ou o Innolia HCV III (Innogenetics, Zwijnaarde, Bélgica) (40).

Determinação do RNA do VHC

O padrão ouro para o diagnóstico de infecção pelo VHC é a determinação

do RNA do VHC através da PCR. O método utiliza sondas de ácido nucléico (sondas genéticas, ou *primers*), que são fragmentos de DNA ou RNA com estrutura complementar a uma seqüência do ácido nucléico a ser detectado. A PCR possibilita ampliar seqüências genéticas específicas, de tal modo que uma única molécula de DNA possa ser detectada na presença de milhões de outras.

Testes qualitativos

Os testes qualitativos informam a presença — ou não — do RNA viral (resultado positivo ou negativo). Um teste sensível para a identificação do RNA do VHC é a reação em cadeia de polimerase com a enzima transcriptase reversa (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR), que catalisa a síntese do DNA complementar (DNAC) a partir da região 5'RNC do RNA viral. A seguir, a PCR é utilizada para amplificar o DNAC, produzindo quantidades suficientes para serem detectadas em gel de agarose (29). O limite teórico de detecção, por PCR, em condições ótimas, é de aproximadamente 1 000 cópias do genoma/ml (41), mas existem variações da técnica, e uma das mais sensíveis é capaz de detectar até 100 cópias do genoma/ml de soro (42). A RT-PCR é uma técnica laboriosa que requer cuidados extremos para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos (43). Como os protocolos não são padronizados, os resultados variam entre os laboratórios. Um estudo comparando os resultados da determinação do RNA do VHC por RT-PCR em 31 laboratórios (principalmente europeus) constatou que apenas cinco (16%) identificaram corretamente todas as amostras do painel de controle (44).

Recentemente, tornaram-se disponíveis testes industrializados para detecção qualitativa do RNA do VHC utilizando a técnica da RT-PCR (45). De acordo com o fabricante do primeiro desses testes (Amplicor, Roche Diagnostics), o limite de detecção é de 700 cópias/ml (46). Contudo, com modificação da técnica, é possível detec-

tar menos de 100 cópias/ml, com especificidade de 97 a 99% (4, 8).

Outro método empregado para a detecção qualitativa do RNA do VHC, ainda em investigação, é a amplificação mediada pela transcriptase (*transcription-mediated amplification*, TMA). É um método simples, rápido e capaz de detectar menos de 50 cópias/ml dos principais genótipos do VHC (31).

Com o objetivo de tornar a administração de sangue e derivados mais segura, tem sido preconizado pesquisar o RNA do VHC através de técnicas de amplificação de ácidos nucléicos (47). Recentemente, a OMS estabeleceu o primeiro padrão de referência para esses testes (48). Apesar de a técnica indicar aumento de segurança no uso de derivados de sangue, há registro de transmissão do VHC através da transfusão de concentrado de plaquetas feito a partir de sangue com teste de amplificação negativo (49).

Na prática clínica, na maioria dos pacientes a investigação diagnóstica começa pela pesquisa de anticorpos contra o VHC através do teste ELISA. No entanto, em pacientes com hepatite crônica que são negativos para a presença de anti-VHC (como os pacientes em hemodiálise ou submetidos a transplante de órgãos) (50, 51), ou em pacientes anti-VHC positivos e com aminotransferases normais, por exemplo, é necessário utilizar o teste PCR qualitativo. Nestes últimos, os resultados do teste podem indicar duas possibilidades: infecção curada (RNA do VHC negativos) ou em atividade (RNA do VHC positivos), a despeito da normalidade das enzimas (52, 53). No caso de pacientes com positividade para a presença de RNA do VHC, se as aminotransferases persistirem com valores normais, não há indicação de tratamento (33). Contudo, deve ser caracterizada a infecção, a fim de orientar o paciente sobre as vias de transmissão do VHC, medidas preventivas e necessidade de acompanhamento clínico.

Outra situação que requer o uso do teste PCR qualitativo é a de pacientes com hepatite pelo VHC, candidatos a tratamento com interferon isolado ou associado com a administração de ribavirina. A testagem seriada desses

pacientes define a existência de resposta virológica e orienta a necessidade de manutenção ou não do tratamento (33). Por fim, o teste é também preconizado para hepatite aguda no período de janela imunológica, quando o RNA do VHC pode ser detectado 1 semana após a exposição (54).

Testes quantitativos

O nível de RNA do VHC (ou a carga viral) no soro ou no plasma reflete as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro. Foram desenvolvidas basicamente duas técnicas de biologia molecular para a quantificação do VHC: uma utiliza a tecnologia da PCR e a outra, a do DNA ramificado (*branched DNA*) (55). Esta última se baseia na amplificação de um sinal, e não do DNA alvo, como ocorre na PCR. O ácido nucléico do agente infeccioso, se presente na amostra, é capturado por sondas, hibridizado com fitas de DNA que possuem inúmeras ramificações e revelado pelo sistema indicador. Esse sistema é composto de oligonucleotídeos complementares conjugados à enzima com atuação sobre um substrato quimiluminescente (55). Assim, o "sinal de amplificação" é obtido sem amplificação do ácido nucléico do vírus.

O teste produzido pela Roche Molecular Systems, já em segunda geração (Amplicor HCV Monitor™ 2.0), usa a tecnologia da PCR, enquanto o produzido pela Chiron Diagnostics (Quantiplex™ HCV RNA 2.0) adota a técnica do DNA ramificado. Conforme os fabricantes, o limite de sensibilidade do Amplicor HCV Monitor™ 2.0 é de 1 000 cópias de RNA viral/ml, e o do Quantiplex™ HCV RNA 2.0 é de 200 000 equivalentes de genoma/ml (56). Contudo, esses limites de sensibilidade não são comparáveis, já que as "cópias" e os "equivalentes de genoma" não representam a mesma quantidade de RNA do VHC (56). Ambos os testes quantificam de maneira semelhante os vários genótipos do VHC e são capazes de quantificar a viremia em 89 a 95% dos pacientes RT-PCR positivos que não estão em tratamento (56). O Amplicor

HCV Monitor™ 2.0 parece ser mais sensível do que o Quantiplex™ HCV RNA 2.0 para detectar baixos níveis de viremia em pacientes em tratamento (57); contudo, nesses casos, os testes recomendados são os qualitativos, pela maior sensibilidade (33, 58). Apesar de os testes quantitativos apresentarem resultados bastante confiáveis, é importante que sejam conhecidas suas limitações para evitar interpretações equivocadas.

A principal indicação para solicitação de carga viral, na prática médica, é a definição do tempo de tratamento combinado (interferon/ribavirina) de pacientes com hepatite crônica pelo VHC. O consenso da Associação Europeia para o Estudo do Fígado, realizado em 1999, sugere que, para pacientes infectados com o genótipo 1 do VHC, a duração do tratamento deve ser determinada pela carga viral pré-tratamento: 6 meses de tratamento se a carga viral for inferior a 2 000 000 cópias/ml e 12 meses se a carga viral for maior. Pacientes infectados com outros genótipos do VHC que não o 1 devem ser tratados durante 6 meses, independentemente da viremia basal (33).

Os trabalhos multicêntricos (59, 60) que evidenciaram o efeito benéfico do tratamento combinado em pacientes com hepatite crônica pelo VHC e que serviram de base para as recomendações de consenso utilizaram um teste quantitativo (HCV Superquant™, National Genetics Institute, Estados Unidos) comercializado apenas para laboratórios de pesquisa. Recentemente, demonstrou-se que os resultados desse teste são comparáveis aos dos testes Quantiplex HCV RNA 2.0 e Amplicor HCV Monitor, utilizados em laboratórios clínicos (61).

Estão sendo desenvolvidas outras técnicas para a quantificação do VHC, sendo que uma das mais promissoras utiliza sistema de detecção em tempo real (62).

DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DO VHC

O VHC constitui-se em uma família heterogênea de vírus, com no mínimo

seis genótipos e inúmeros subtipos (63, 64). Embora o método de maior acurácia para a determinação do genótipo do VHC seja a identificação completa da sequência dos 9 500 nucleotídeos e a construção de uma árvore filogenética, esse método só pode ser utilizado em laboratórios de pesquisa (65), e não em laboratórios clínicos. Assim, foram desenvolvidos métodos para genotipagem utilizando apenas as regiões mais conservadas do genoma, como a proteína do envoltório (E1), a proteína *core* e a proteína não estrutural NS5B. A sequência dos nucleotídeos dentro dessas regiões relativamente conservadas é genótipo-específica, e os isolados podem ser genotipados, independentemente da região que for utilizada para análise (63–65). Para uso em laboratórios clínicos foram desenvolvidas basicamente duas metodologias que se valem de técnicas de biologia molecular (genotipagem) ou serológicas (serotipagem).

Os métodos que adotam técnica de biologia molecular para genotipagem, utilizando porções do genoma, incluem a PCR aninhada (*nested PCR*) (66), a técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (67), a hibridização reversa (68) (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica; Gen.Eti DEIA HCV, Sorin Biomedica, Itália) e o seqüenciamento direto da região não-codificante 5' (TruGene, Visible Genetics, Canadá). Suas principais vantagens são a informação direta sobre sequência dos nucleotídeos do genoma viral, a alta sensibilidade, por se basearem na PCR, e a possibilidade de identificar o subtipo viral (69).

Os métodos para determinação do genótipo que utilizam serotipagem baseiam-se na detecção de anticorpos genótipo-específicos contra epítomos do VHC (por exemplo, proteínas da região do *core*) (70). Os testes comercializados utilizam diferentes técnicas, ELISAs competitivos ou *immunoblot* (Murex-HC1-6, Murex Diagnostics Ltd, Reino Unido; RIBA HCV Serotyping Assay, Chiron Diagnostics, Estados Unidos). As principais vantagens da técnica de serotipagem são o baixo custo e maior facilidade de realização, em comparação com os testes de biologia molecular (69).

A determinação do genótipo, anteriormente utilizada em pesquisas, mas sem maior utilidade na prática médica, atualmente é recomendada para uso clínico. Como já mencionado, os pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC devem ser tratados por 12 meses enquanto os demais, por 6 meses (33).

CONCLUSÕES

Em geral, pode-se dizer que na última década houve grandes avanços no diagnóstico da hepatite C. Nesse período houve progressiva melhora na sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para detecção de anticorpos contra o VHC, sendo possível identificar pessoas infectadas com o vírus de maneira rápida e relativamente barata. Contudo, é necessário que sejam desenvolvidos testes de maior acurácia na avaliação de determinados grupos de enfermos, como os imunossuprimidos ou com hepatite aguda.

Estão disponíveis testes qualitativos ou quantitativos para a detecção do RNA do VHC, que possibilitam a detecção da viremia. Os testes qualitativos, fundamentalmente utilizando a RT-PCR, são usados antes de se iniciar o tratamento de pacientes com hepatite C e para avaliar a eficácia do tratamento. Os testes quantitativos, assim como a determinação do genótipo do VHC, são importantes para definir a duração do tratamento da hepatite C com interferon e ribavirina. Portanto, os testes são utilizados não só para estabelecer o diagnóstico da infecção mas, também, no manejo dos pacientes com hepatite C. Em relação aos testes qualitativos para a detecção do RNA do VHC, também houve significativo avanço nos últimos anos, estando melhor definidas as condições técnicas que possibilitam obtenção de resultados mais confiáveis e reproduzíveis. É esperado que o desenvolvimento de espécimes de referência padronizados e a

estandardização dos testes possibilite uma melhora na acurácia dos testes qualitativos.

Também observou-se notável progresso em relação à disponibilidade de testes industrializados para a detecção do RNA do VHC. A determinação da carga viral é realizada basicamente por testes que utilizam a metodologia da PCR ou do DNA ramificado. Pesquisas nesta área devem desenvolver o método ideal para a quantificação da carga viral do VHC. É importante estar ciente de que os valores da carga viral obtidos por PCR ou DNA ramificado não são intercambiáveis. Portanto, no acompanhamento de um paciente deve-se usar sempre o mesmo teste. A determinação do genótipo do VHC pode ser feita por PCR ou serotipagem. A primeira técnica é mais sensível e possibilita a identificação de subtipos do VHC. Contudo, a segunda é de mais fácil realização e mais barata, razão pela que é importante que a técnica seja aprimorada.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Hepatitis C: Global prevalence. Update. *Wkly Epidemiol Rec* 1997;72(46):341-344
2. Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244(4902):362-364.
3. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis. *Science* 1989;244(4902):359-369.
4. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):43S-47S.
5. Bradley DW. Hepatitis C Virus: Background and strategies for cloning a major etiologic agent of PT-NANB. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p.320-328.
6. Reis MM. Testes imunológicos. Manual ilustrado para profissionais da saúde. Porto Alegre (RS): AGE Editora; 1998.
7. Gretch DR, Lee W, 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* 1992;30(8):2145-2149.
8. Gretch DR. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. *Clin Liver Dis* 1997;1(3):543-557.
9. Hsu HH, Gonzalez M, Fong SKH, Feinstone S M, Greenberg HB. Antibodies to hepatitis C virus in low-risk blood donors: Implications for counseling positive donors. *Gastroenterology* 1991;101(6):1724-1727.
10. Romeo JM, Ulrich PP, Busch MP, Vyas GN. Analysis of hepatitis C virus RNA prevalence and surrogate markers of infection among seropositive voluntary blood donors. *Hepatology* 1993;17(2):188-195.
11. van der Poel CL, Reesink HW, Schaasberg W, Leentvaar-Kuypers A, Bakker E, Exel-Oehlers PJ, et al. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet* 1990;335(8689):558-560.
12. Alter HJ. New kit on the block: Evaluation of a second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus [editorial]. *Hepatology* 1992;15(2):350-353.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325(19):1325-1329.
14. Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegmeir G, Nelles M, et al. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 1992;32(9):805-813.
15. Lopes EPA, Granato CH, Lanzoni V, Granero, Paranhos-Baccala G, Tomiyama H, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for hepatitis C virus antibody detection using a recombinant protein derived from the core region of hepatitis C virus genome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(5):717-720.
16. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, et al. Improved detection of anti-VHC in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang* 1995;68(1):15-18.
17. Craxi A, Valenza M, Fabiano C, Magrin S, Fiorentino G, Diquattro O, et al. Third-generation hepatitis C virus tests in asymptomatic anti-HCV-positive blood donors. *J Hepatol* 1994;21(5):730-734.
18. Kao J-H, Lai M-Y, Hwang Y-T, Yang P-M, Chen P-J, Sheu J-C, et al. Chronic hepatitis C without anti-hepatitis C antibodies by second-generation assay. A clinicopathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. *Dig Dis Sci* 1996;41(1):161-165.
19. Uyttendaele S, Clayes H, Mertens W, Verhaert H, Vermynen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory as-

- says for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994;66(2):122-129.
20. Lee RS, Wood CL, Lane MJ, Francis B, Gust C, Higgs CM, et al. Increased detection of hepatitis C virus infection in commercial plasma donors by a third-generation screening assay. *Transfusion* 1995;35(10):845-849.
 21. Vrieling H, Reesink HW, van der Burg PJM, Zaaijer H, Cuypers HTM, Lelie PN, et al. Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion* 1997;37(8):845-849.
 22. Beld M, Penning M, van Putten M, van den Hoek A, Damen M, Klein ME, et al. Low levels of hepatitis C virus RNA in serum, plasma, and peripheral blood mononuclear cells of injecting drug users during long antibody-undetectable periods before seroconversion. *Blood* 1999;94(4):1183-1191.
 23. Dow BC, Follett EAC, Munro H, Buchanan I, Roy K, McOmish F, Yap PL, et al. Failure of 2nd- and 3rd-generation HCV ELISA and RIBA to detect HCV polymerase chain reaction-positive donations [letter]. *Vox Sang* 1994;67(2):236-237.
 24. Rapietta M, Dettori S, Kondili LA, Chionne P, Ciccaglione AR, Miceli M, et al. Persistence of HCV-RNA in a blood donor with negative antibody assays [letter]. *Vox Sanguinis* 1999;76(3):192.
 25. Troisi CL, Hollinger FB. Detection of antibodies to hepatitis C virus in seronegative patients using an immune complex dissociation assay. *J Viral Hep* 1997;4(6):383-386.
 26. León P, López JA, Domingo C, Echevarría JM. Evaluation of laboratory assays for screening antibody to hepatitis C virus. *Transfusion* 1993;33(3):268-270.
 27. Wendel S, Fachini R, Campos LC, Levi JE, Hamada G, Lima LP. HCV ELISA donor screening tests performance from seven different kits [resum]. *Gastroenterologia Endoscopia Digestiva* 1998;17 Supl:S44.
 28. Lok A SF, Gunaratnam NT. Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):485-565.
 29. de Medina M, Schiff ER. Hepatitis C: diagnostic assays. *Semin Liver Dis* 1995;15(1):33-40.
 30. Martin P, Fabrizi F, Dixit V, Quan S, Brezina M, Kaufman E, et al. Automated RIBA hepatitis C virus (HCV) strip immunoblot assay for reproducible HCV diagnosis. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):387-390.
 31. Schiff ER, de Medina M, Kahn R. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999(19 Suppl 1):19:3-15.
 32. Pawlotsky J-M, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998;27(6):1700-1702.
 33. European Association for the Study of the Liver. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28 February 1999. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999;30(5):956-961.
 34. Bresters D, Zaaijer HL, Cuypers HTM, Winkel IN, van Exel-Oehlers PJ, van Drimelen AAJ, et al. Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion* 1993;33(8):634-638.
 35. Terrault NA, Wriugh TL. Viral hepatitis A through G. In: Feldman M, Scharshmidt BF, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology, diagnosis, management*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1998. p. 1123-1170.
 36. Aiza I, de Medina M, Li XM, Poniachik J, Bartholomew M, Jeffers LJ, et al. Evaluation of RIBA™ HCV2.0 SIA indeterminate specimens by RIBA™ HCV 30 SIA and HCV-RNA by PCR [abstract]. *Hepatology* 1994;20(4 Pt 2):240A.
 37. Damen M, Zaaijer HL, Cuypers HT, Vrieling HL, van der Poel CL, Reesink HW, et al. Reliability of third-generation recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. *Transfusion* 1995;35(9):745-749.
 38. Pawlotsky J, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, et al. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):80-83.
 39. Dow BC, Munro H, Buchanan I, Follett EAC, Davidson F, Yap PL, Simmonds PL. Third-generation recombinant immunoblot assay: comparison of reactivities according to hepatitis C virus genotype. *Transfusion* 1996;36(6):547-551.
 40. Courouce AM, Noel L, Barin F, Elghouzzi MH, Lunel F, North ML, et al. A comparative evaluation of the sensitivity of five anti-hepatitis C virus immunoblot assays. *Vox Sang* 1998;74(4):217-224.
 41. Davis GL. Hepatitis C. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, eds. *Schiff's Diseases of the Liver*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p. 793-836.
 42. Gretch DR, Wilson JJ, Carithers Jr RL, Rosa C, Han JH, Corey L. Detection of hepatitis C virus RNA: Comparison of one-stage polymerase chain reaction (PCR) with nested-set PCR. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):289-291.
 43. Kwok S, Higushi R. Avoiding false positives with PCR [published erratum appears in *Nature* 1989; 339(6224):490]. *Nature* 1989;339(6221):237-238.
 44. Zaaijer HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993;341(8847):722-724.
 45. Lunel F, Mariotti M, Cresta P, De La Croix I, Huraux JM, Lefrere JJ. Comparative study of conventional and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in-house PCR. *J Virol Methods* 1995;54(2-3):159-171.
 46. Young KKY, Archer JJ, Yokosuka O, Omata M, Resnick RM. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription PCR assay: comparison with nested amplification and antibody testing. *J Clin Microbiol* 1995;33(3):654-657.
 47. Roth WK, Weber M, Seifried WE. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* 1999;353(9150):359-363.
 48. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sanguinis* 1999;76(3):149-158.
 49. Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA [letter]. *Lancet* 2000;355(9197):41-42.
 50. Seelig R, Renz M, Botter C, Seelig HP. Hepatitis C virus infection in dialysis units: prevalence of HCV RNA and antibodies to HCV. *Ann Intern Med* 1994;26(1):45-52.
 51. Lok ASF, Chien D, Choo Q-L, Chan T-M, Chiu EKW, Cheng IKP, et al. Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology* 1993;18(3):497-502.
 52. Dickson RC. Clinical manifestations of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997;1(3):569-585.
 53. Hoofnagle JH. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):15S-20S.
 54. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991;352(2):98-104.
 55. Gretch DR, Corazon dela Rosa MT, Carithers Jr RL, Wilson RA, Williams B, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: Correlations and clinical implications. *Ann Intern Med* 1995;123(5):321-329.
 56. Pawlotsky JM. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: Can we trust the assays? *Hepatology* 1997;26(1):1-4.
 57. Lunel F, Cresta P, Vitour D, Payan C, Dumont B, Frangeul L, et al. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and Monitor assays. *Hepatology* 1999;29(2):528-535.
 58. Pockros PJ, Bain VG, Hunter EB, Conrad A, Balart A, Hollinger FB, Albert D. A comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction and branched-chain DNA assays for hepatitis C virus RNA in patients receiving interferon treatment. Consensus Interferon Study Group. *J Viral Hep* 1999;6(2):145-150.
 59. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339(21):1485-1492.
 60. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederaul C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon α2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352(9128):1426-1432.
 61. Marinot-Peignoux M, Boyer N, Le Breton V, Le Guludec G, Castelnau C, Akreimi R, et al. A new step toward standardization of serum hepatitis C virus-RNA quantification in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31(3):726-729.
 62. Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, et al. Real-

- time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1999;116(3): 636-642.
63. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: Quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15(1): 41-63.
 64. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21(2):570-583.
 65. Ohno T, Lau JYN. The "gold standard", accuracy, and the current concepts: hepatitis C virus genotype and viremia [editorial]. *Hepatology* 1996;25(4):1312-1315.
 66. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992;73(Pt 3):673-679.
 67. Simmonds P, MsOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: Identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 4):661-668.
 68. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel IM, Vanderborght B, van Heuverswyn H, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 6): 1093-1102.
 69. Pawlotsky JM, Gretch DR. Molecular tools for the treatment of hepatitis C. In: Schinazi RF, Sommadossi JP, Thomas HC, eds. *Therapies for Viral Hepatitis*. London: International Medical Press; 1998. p.103-113.
 70. Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, Munekata E, Tanaka T, Akhane Y, et al. Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies direct to the putative core protein. *Hepatology* 1992;16(4):886-891.

Manuscrito recebido em 14 de junho de 2000. Aceito em versão revisada em 21 de novembro de 2000.

ABSTRACT

Diagnosing hepatitis C in clinical practice: a literature review

The objective of this study was to review the literature concerning laboratory tests to detect hepatitis C virus infection, which have been available since 1989. The diagnosis of hepatitis C is mainly based on serological techniques and on molecular techniques. Serological techniques to detect hepatitis C virus antibodies are the method of choice to identify past or present infection. There are two types of serological assays: highly sensitive enzyme-linked immunosorbent screening assays; and more specific immunoblot techniques, which are used as supplemental or confirmatory tests. With respect to molecular diagnostic techniques, there are several types of assays. One such assay detects viral RNA. It is useful for diagnosis in such situations as the early stages of infection, with immunosuppressed patients, and with persons who have a low probability of infection. Molecular assays are also recommended before treatment with interferon and ribavirin, in order to monitor response to treatment. Other assays allow determination of viral load by either target amplification (as in polymerase chain reaction) or signal amplification (as in branched-DNA). Determining the hepatitis C virus genotype is possible using either molecular techniques or serotyping. Determining viral load and genotype is useful for planning the duration of interferon and ribavirin treatment. There have been major advances in the diagnosis of hepatitis C in the past decade. Improvements in the sensitivity and specificity of antibody tests have provided faster, less expensive diagnoses. However, more accurate assays are still needed for such groups as immunosuppressed persons and acute hepatitis patients.