AC&T CIENTÍFICA®

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C – *Revisão da Literatura*

CLÁUDIA REGINA FAVALI SCAVASSA

RESUMO

Diante da grande importância da infecção causada pelo vírus da hepatite C e da complexidade dos testes laboratoriais para o diagnóstico dessa infecção, sendo que os métodos sorológicos, disponíveis desde 1989, não são conclusivos para a confirmação da mesma, necessitando para este fim, de testes de biologia molecular, este presente estudo visa apresentar uma compilação de informações de modo resumido, simplificado e sistematizado, para contribuir no conhecimento dos profissionais de saúde diretamente envolvidos, considerando a alta prevalência mundial de 3% de pessoas infectadas pelo VHC, cuja exposição ao vírus resulta em até 85% de hepatite crônica. Esta afecção é uma doença insidiosa e sub-clínica, podendo progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular, sendo considerada um grave problema de saúde pública.

Atualmente o diagnóstico laboratorial é altamente sensível e específico e baseia-se em métodos sero-imunológicos para pesquisa de anticorpos, utilizando-se da técnica de ELISA, como triagem, e Imuno-blot (RIBA), como teste suplementar ou confirmatório da presença de anticorpos específicos do VHC. Porém esses métodos servem apenas como marcadores do contato com o vírus. Já os testes de biologia molecular, como o PCR qualitativo, que possibilita a detecção do RNA do vírus C presentes na infecção inicial ou nos casos de cronificação, é de grande utilidade para confirmar o diagnóstico e definir o tratamento, principalmente em situações específicas (fase inicial da doença ou em pacientes imunossuprimidos), assim como para acompanhamento da eficácia desse tratamento. Existem ainda o método de PCR quantitativo (carga viral) e o de genotipagem, cujas informações são fundamentais para orientação da terapêutica a ser instituída.

Palavras-chave: Vírus da hepatite C (VHC), PCR, carga viral, diagnóstico, genotipagem.

INTRODUÇÃO

As Hepatites causadas pelos vírus hepatotrópicos apresentam grande importância devido sua grande distribuição mundial, atingindo proporções de uma pandemia. Estes vírus apresentam uma característica em comum, o tropismo pelos hepatócitos, porém são vírus com características biológicas diversas e que foram sendo descobertos ao longo do tempo, recebendo denominação com letras do Alfabeto Latino - também conhecido como Alfabeto Romano - a saber: vírus da Hepatite A (VHA), vírus da Hepatite B (VHB), vírus da Hepatite C (VHC), vírus da Hepatite D (VHD), vírus da Hepatite E (VHE) e vírus da Hepatite G (GHV) (Focaccia, 2007).

A alta prevalência de indivíduos com infecção crônica pelo VHC é considerada um grave problema de saúde pública, tendo em vista que 85% das pessoas expostas a esse vírus tornam-se portador crônico. A infecção pelo VHC é assintomática na maioria dos casos e os pacientes permanecem virêmicos, ou seja, transmissores por um longo período de tempo.

O diagnóstico da exposição ao VHC é feito através de exames imunológicos de rotina, geralmente de forma incidental como na triagem de doadores de sangue, rotinas de pré-natal ou na avaliação das alamina aminotransferases (ALT) alteradas, com a detecção da presença de anticorpos produzidos contra o vírus, mas a confirmação da persistência de infecção é feita através de métodos de biologia molecular, que também podem ser de grande utilidade nas situações em que os testes sorológicos apresentam resultados indeterminados, confirmando assim a infecção. Os testes de biologia molecular além de serem imprescindíveis para confirmar a infecção persistente pelo VHC, são utilizados no acompanhamento do tratamento para verificar o sucesso terapêutico.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Histórico

A Hepatite C vem sendo estudada há algumas décadas, mesmo antes da descoberta do agente causador da doença, o vírus VHC. Em 1970, testes de triagem sorológica para investigação do vírus da Hepatite A (VHA) e B (VHB), revelaram que 25% dos casos de Hepatite, associados à transfusão sangüínea, estavam relacionados com o VHB. Os casos remanescentes, 75%, foram considerados como Hepatite não-A e não-B (NANB) e aproximadamente 10 a 12% dos indivíduos que haviam recebido múltiplas transfusões sangüíneas, desenvolveram Hepatite NANB com risco relativo de 0,45% por unidade transfundida (Focaccia, 2007).

Os sintomas da infecção aguda ocasionados pelo vírus da Hepatite NANB de origem pós-transfusional, nem sempre estavam presentes após episódios de transfusão. Este fato colaborou para que fossem pouco compreendidas as doenças, pois não havia o conhecimento necessário em biologia molecular para o aprofundamento da investigação laboratorial. Somente após a observância de alguns casos de Hepatite NANB que evoluíam com níveis elevados alamina aminotransferase (ALT) e progressão para cirrose, é que ocorreu um maior interesse em estudar um possível agente causador dessa “nova doença”.

Em 1989, Kuo e cols desenvolveram um teste de detecção para o causador da Hepatite NANB, também denominado vírus da Hepatite C (VHC), pelo método ELISA. O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) utilizou este teste para diagnosticar casos de icterícia aguda pós-transfusional e identificou cerca de 70 a 90% de positividade para Hepatite NANB.

A incidência da Hepatite C, na década de 1990, apresentou significativa redução, pelo menos nos países com estrutura de saúde pública mais desenvolvida e decorreu do controle rigoroso na seleção de doadores de sangue e, conseqüentemente, mudança nos padrões de transmissão. Porém a infecção, ainda atinge índices elevados de prevalência.

2. Epidemiologia

Estima-se que 170 milhões (3%) de pessoas no mundo estão infectadas pelo VHC, os índices variam em até 1% da população em países como Reino Unido, Escandinávia, Nova Zelândia e algumas áreas do Japão, ou chegam até a 26% no Egito (Focaccia, 2007). No Brasil, com base em doadores de sangue, a prevalência de anti-VHC nas diversas regiões foi de 0,62% no Norte; 0,55% no Nordeste; 0,43% no Sudeste; 0,28% no Centro-Oeste e 0,46% no Sul (Ministério da Saúde, 2006).

Em inquérito soro-epidemiológico de base populacional, estratificada por sexo, idade e local de moradia, realizada no Município de São Paulo, foi encontrada uma estimativa de prevalência geral de 1,42% e para população acima de 30 anos a estimativa foi de 2,7% (Ministério da Saúde, 2006).

3. O Agente

Diferentemente do que ocorreu com o VHB (vírus DNA, família *Hepadnaviridae*) e VHA (vírus RNA, família *Picornaviridae*), o agente etiológico da Hepatite C pertence a uma família de vírus que já era conhecida, *Flaviviridae*, porém com gênero próprio, *Hepacivirus*. O genoma do VHC consiste de uma fita RNA de polaridade positiva e aproximadamente 9,6 kilobases, que inclui uma região que codifica uma grande proteína precursora de aproximadamente 3.000 aminoácidos. Estes aminoácidos estão divididos em pelo menos dez proteínas: Core, Envelope 1 (E1), E2, p7, que compreendem o domínio estrutural do genoma; e NS2, NS3, NS4B, NS5A e NS5B, que caracterizam o domínio não-estrutural (Choo et al., 1989).

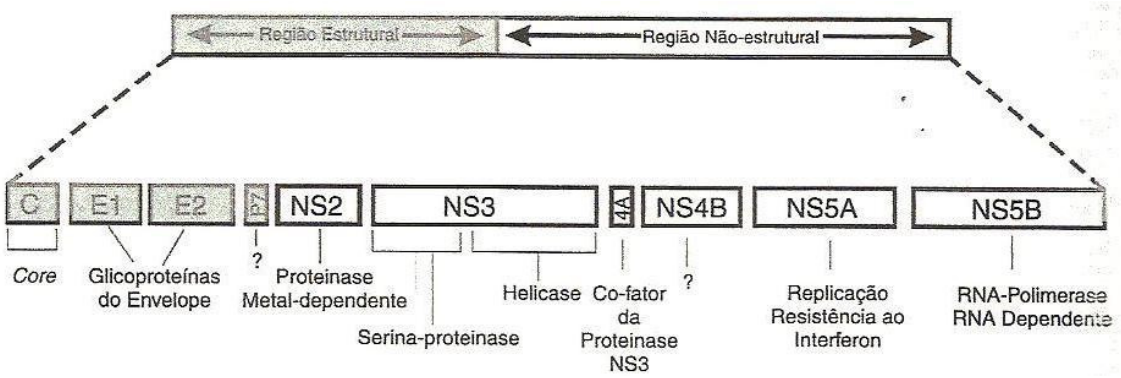

Figura 1 – Genoma do vírus da hepatite C. (Silva et al., 2006).

Desde o início da década de 1990, foi notada uma heterogeneidade do genoma do VHC, o que levou geneticamente à identificação de seis grandes grupos ou tipos virais e mais 70 subtipos diferentes em todo o mundo. O tipo viral VHC pode ser determinado em uma amostra clínica de diferentes formas e as regiões do genoma do VHC consideradas adequadas, citadas por inúmeras referências, incluem o Core, E1, NS4 e NS5 e 5'UTR (UTR=região não traduzida).

Avaliando a prevalência mundial dos genótipos do VHC, observamos que os tipos 1 a, 1 b, 2 a, 2 b e 3 a são encontrados no Brasil, na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, porém, 1 b, 2 a e 2 b são freqüentemente encontrados no Japão e em Taiwan. O tipo 3 é o mais prevalente na Índia, em Bangladesh e em outras partes da Ásia. O tipo 4 no Oriente Médio, o tipo 5 na África do Sul e o tipo 6 em Hong Kong e Macau (Focaccia, 2007).

No Brasil, temos dois estudos com base populacional, um na região Sudeste, que mostrou a prevalência do tipo 1, seguido pelo tipo 3, e outro na região Nordeste, onde o genótipo 3 se sobrepõe ao tipo 1 e, em menor porcentagem, para ambos os trabalhos, o genótipo 2 (Focaccia et al., 1998; Zarife et al., 2006).

4. Transmissão

Atualmente, ficou caracterizado que a transmissão ocorre principalmente por via parenteral. São consideradas populações de maior risco: indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993, pessoas que compartilham material para uso de drogas injetáveis, inaláveis e *crack*, pessoas com tatuagem, "*piercings*", ou que apresentam outras formas de exposição percutânea. A transmissão sexual pode ocorrer principalmente em pessoas com múltiplos parceiros e com pratica sexual sem uso de preservativo. A transmissão perinatal é possível e ocorre quase sempre no momento do parto ou logo após. A transmissão intra-uterina é incomum. A média de infecção em crianças nascidas de mães VHC positivas é de aproximadamente 6% - havendo co-infecção do HIV, sobe para 17% (Ministério da Saúde, 2006).

A transmissão pode estar associada ao genótipo e carga viral elevada do VHC. Apesar da possibilidade da transmissão pelo aleitamento materno (partículas virais foram demonstradas no colostro e leite materno), não há evidências conclusivas de aumento de risco à transmissão, exceto na ocorrência de fissuras ou sangramento nos mamilos (Ministério da Saúde, 2006).

5. Patogênese

Ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos responsáveis pelo dano da célula hepática e infecção crônica pelo VHC, mas observou-se que o grau de destruição varia entre os indivíduos e a infecção persistente pelo VHC no fígado dispara continuamente uma resposta ativa de células T, o que induz à destruição de hepatócitos-alvo.

A principal diferença clínica entre a infecção pelo VHC e pelo VHB é a persistência do VHC, que mesmo em indivíduos com imunidade normal, cerca de 85% desenvolvem infecção crônica. A Hepatite crônica causa cirrose hepática de longa duração, freqüentemente seguida pelo aparecimento de Carcinoma Hepatocelular.

Portanto, a real patogenicidade do VHC é principalmente decorrente de dois aspectos: dano à célula hepática e persistência viral. Os mecanismos da persistência do VHC podem envolver tanto modificações virais assim como fatores dependentes do hospedeiro, incluindo imunossupressão ao VHC, proteção de células infectadas pelo VHC da morte celular apoptótica ou mutação genética de domínios imunogênicos do HCV (Wang et al., 1992).

A explicação mais provável para a inefetividade das respostas de anticorpos contra o VHC é que a rápida ocorrência de mutações virais no interior de epitopos reconhecidos por anticorpos neutralizantes pode impedir o reconhecimento do novo vírus variante pelos anticorpos. A persistência do VHC poderia refletir o fracasso da resposta de anticorpos neutralizantes em acompanhar tais mutações virais (Weiner AJ, 1992). Conseqüentemente, em qualquer indivíduo infectado pelo VHC, a população viral consiste de uma mistura heterogênea de vírions estreitamente relacionados denominados quasispécies.

6. Diagnóstico Laboratorial

a. Sorológico/imunológico:

A técnica de ELISA, por ser um método de fácil execução é muito utilizada para detecção de anticorpos anti-VHC no plasma ou no soro como triagem em bancos de sangue e também em laboratório de análises clínicas. Este método chega a atingir uma sensibilidade de até 97%, porém serve apenas para indicar exposição prévia ao vírus e tem a desvantagem de resultados falso-positivos, devido a ligações inespecíficas entre imunoglobulinas presentes no soro ou plasma e contaminantes das preparações antigênicas dos kits ou regiões não-específicas dos antígenos recombinantes. Resultados falso-negativos também ocorrem quando o diagnóstico é realizado no período de janela imunológica ou em casos de imunossupressão e imunodeficiência.

Para complementar o diagnóstico sorológico e avaliar possíveis resultados falso-positivos do teste ELISA, pode ser utilizada modificações da técnica de Western Blot, como o RIBA (Imuno-blot recombinante) também para a detecção de anticorpos. Neste caso, a especificidade é alta, porém a sensibilidade é mais baixa que no teste ELISA. No entanto, com um teste RIBA positivo, é confirmada a reatividade anti-VHC específica. Porém sendo estes testes indeterminados ou negativos, com o teste ELISA inicialmente positivo, surge um problema, pois o paciente pode estar num período antes da soroconversão ou ainda, não possuir uma resposta suficiente de anticorpos, como por exemplo em pacientes transplantados. Por este motivo, estes testes têm tido indicações cada vez mais limitadas na prática clínica. Atualmente, frente a um resultado de anti-VHC positivo por ELISA, a avaliação custo-benefício do fluxograma sugere a realização da pesquisa do RNA-VHC qualitativa (PCR-HCV qualitativo), pois este comprova a presença de viremia atual, confirmando a infecção.

b. Métodos Moleculares:

O VHC foi um dos primeiros vírus descobertos por técnicas de biologia molecular e a detecção do RNA viral é aceita como “padrão ouro” entre os

métodos existentes de identificação do VHC. Além do teste qualitativo, a determinação da carga viral (teste quantitativo) e a determinação do genótipo, são ferramentas valiosas para o acompanhamento clínico do paciente.

As técnicas mais empregadas para esta finalidade são: reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (RT-PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA) e DNA ramificado (b-DNA). Além da detecção e da quantificação do genoma viral, pode-se realizar ainda a sua caracterização, o que permite a classificação dos diferentes genótipos e subtipos do VHC.

i. PCR Qualitativo

A reação de PCR que detecta o RNA do vírus VHC é de alta sensibilidade e especificidade, sendo possível a identificação do vírus 1 ou 2 semanas após a infecção e a positividade deste teste indica habitualmente doença ativa. A sua indicação é principalmente na diferenciação entre uma infecção crônica daquela com resolução espontânea em indivíduos soropositivos, acompanhamento de tratamento para avaliar eficácia, nos casos de hepatite aguda antes de soroconversão, diagnóstico em imunodeprimidos, resultados imunológicos indeterminados, e investigação em recém-nascidos (transferência passiva da mãe). Um dos problemas encontrados nesta reação de alta sensibilidade é a contaminação com produtos de PCR anteriormente obtidos em laboratório, gerando resultados falso-positivos, assim como resultados falso-negativos com procedimentos pré-analíticos inadequados, como, por exemplo, estocagem da amostra de forma errada. Porém, com a implantação de controles de qualidade no laboratório, é possível garantir resultados confiáveis.

ii. PCR Quantitativo

A presença de RNA do VHC em circulação é um marcador de replicação viral e este teste permite a quantificação das partículas virais no sangue tendo relevância na avaliação da eficácia do tratamento. Neste caso, as técnicas de RT-PCR e b-DNA, são as mais utilizadas,

partindo inicialmente da extração do RNA. Baseiam-se no teste de PCR envolvendo padrões com concentrações conhecidas do RNA-HCV que servem como parâmetro para determinar a quantificação de partículas virais na amostra em estudo. Os resultados são reportados em cópias de RNA-HCV/mL ou UI/mL, bem como em escala logarítmica. O teste quantitativo realizado antes do tratamento deve ser repetido após 12 semanas do início do tratamento para comparação de declínio da carga viral, sendo que uma redução de 2 ou mais log representa uma resposta viral satisfatória ao tratamento. Sequencialmente, são realizados testes de PCR qualitativo a cada 6 meses para verificação da resposta terapêutica sustentada.

iii. Genotipagem

Este teste envolve cinco etapas distintas em seqüência: Isolamento do RNA, síntese do cDNA, amplificação do DNA por PCR, hibridização reversa com sondas específicas para os 6 principais genótipos do VHC e seus subtipos e revelação por método cromogênico.

A grande heterogeneidade do genoma do VHC caracterizou a importância do seu seqüenciamento para definir o tempo de tratamento com anti-virais e auxiliar nos estudos epidemiológicos. Os genótipos 2 e 3 são os mais “favoráveis” ao tratamento, cujos pacientes podem ser tratados com terapia combinada (interferon e ribavirina) por seis meses, e o genótipo 1, mais refratário ao tratamento, indica um tratamento mais prolongado de 12 meses ou mais.

7. Aspectos clínicos e tratamento

A infecção aguda pelo VHC se apresenta de forma assintomática na maioria dos casos, porém pode manifestar os seguintes sintomas: mal-estar, cefaléia, febre baixa, anorexia, astenia, fadiga, artralgia, náuseas, vômitos, desconforto no hipocôndrio direito e aversão a alguns alimentos e cigarro. A icterícia é encontrada entre 18 a 26% dos casos de hepatite aguda e inicia-se quando a febre desaparece, podendo ser precedida por colúria e hipocolia

fecal. Pode também haver hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia. Na forma aguda, os sintomas vão desaparecendo paulatinamente. O período de incubação varia de 15 a 150 dias e o período de transmissibilidade inicia-se uma semana antes dos sintomas e mantém-se enquanto o paciente apresentar RNA-VHC reagente. As complicações observadas são cronificação da infecção, cirrose hepática e suas conseqüências (ascite, hemorragias digestivas, peritonite bacteriana espontânea, encefalopatia hepática) e carcinoma hepatocelular (Ministério da Saúde, 2006).

O tratamento para a fase aguda do VHC deverá ser feito com Interferon convencional, mas ainda não há consenso na literatura acerca da duração da terapia. Como norma geral, recomenda-se repouso até praticamente a normalização das aminotransferases e dieta pobre em gordura e rica em carboidratos (de uso popular). A única restrição é a ingestão de álcool por 6 meses a um ano. Na Hepatite Crônica, estima-se que um terço a um quarto dos casos necessitará de tratamento e sua indicação baseia-se no grau de acometimento hepático (exame anátomo-patológico de material de biópsia hepática). No tratamento da Hepatite Crônica pode-se administrar Interferon convencional ou peguilado associado à ribavirina, dependendo do genótipo infectante. De qualquer forma, trata-se ainda de doença de difícil tratamento: a taxa de resposta sustentada com os tratamentos atualmente disponíveis gira em torno de 50%. Novas alternativas vêm sendo estudadas, com intuito de descobrir novas medicações e adequação do tempo do tratamento, para melhorar ainda mais os resultados, na tentativa da eliminação do vírus VHC (Ministério da Saúde, 2006).

CONCLUSÕES

No final da década de 1970, quando se observava uma grande incidência de hepatites pós-transfusionais, foi descoberto o causador da maioria dessas infecções, o vírus da hepatite C (em 1989), e desenvolvidos os testes laboratoriais para triagem sorológica de doadores. Na década de 1990, ocorreu uma significativa redução destes casos, principalmente em países com estrutura mais desenvolvida em saúde pública, pois foi instituído um controle rigoroso na seleção de doadores de sangue, caracterizando a importância do papel dos testes imunológicos na prevenção da transmissão dessa infecção.

Acreditamos também que estes testes devem ser mais difundidos na população em geral para o reconhecimento do status sorológico, identificando portadores crônicos assintomáticos com o objetivo de instituir tratamento de forma precoce, reduzindo a evolução para formas mais avançadas - o que acarreta danos pessoais graves e alto custo ao sistema de saúde - prevenindo a transmissão para contactantes e minimizando a expansão dessa epidemia.

Já os testes de biologia molecular representam um segundo grande avanço no controle e tratamento da infecção pelo VHC, pois permitem não somente a confirmação diagnóstica como também a orientação da terapêutica a ser instituída, inclusive, considerando a alta prevalência de pacientes infectados, estes testes cada vez mais deveriam estar disponíveis nas diferentes regiões do país, com custo mais acessível e garantia da qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Focaccia R, Conceição OJG, Sette-Jr H, et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and resident-based population. Braz J. Infect. Dis. 1998; 2: 269-284.

Focaccia R, editor. Tratado de Hepatites Virais. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 2007.

Kuo G, Choo QL et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science 1989; 244: 362-363.

Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 6ª ed. Brasília, 2006; 161-179.

Silva CMD, Niel C. Hepatite C. In: Rossetti ML, Silva CMD, Rodrigues JJS. Doenças Infecciosas: Diagnóstico molecular. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006; 123-134.

Wang JT, Sheu JC et al. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. J. Infect. Dis. 1992; 166: 1167-1169.

Weiner AJ, Geysen HM, et al. Evidence of immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelop glycoprotein variant: potential role in chronic HCV infections. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992; 89: 3468-3472.

Zarife MAS, Silva LK, Silva MBS, et al. Prevalence of hepatitis C infection in north-eastern Brazil: a population-based study. Transation of the Society of Tropical Medicine and Hygiene 2006; 100: 663-668.

Endereço para correspondência:

Rua Brás Cubas, 642 – São Caetano do Sul – SP

CEP: 09581-670

T*elefone: (11) 4231-2081*

e-mail: clau_scavassa@yahoo.com.br