



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2014

Helena Isabel Santos Silva

**Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o
Douro e Vouga, E.P.E**



DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios electrónicos, quer de trabalhos académicos.



Helena Isabel Santos Silva

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob orientação científica da , Técnica Superior Dr^a Luísa Maria Rebelo de Almeida Espinhaço, Técnica Superior de Saúde do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Entre Douro e Vouga, E.P.E e da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, ao meu marido Renato e aos meus filhos Fábria e Ivo pelo carinho, amor e sorrisos com que me presenteiam todos os dias.

o júri

presidente	Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva, Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro
arguente	Dr ^a Liliana Tavares dos Santos, Bolseira de Pós-Doutoramento, Cesam- Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
orientador(a)	Dr ^a Luísa Maria Rebelo de Almeida Espinhaço Técnica Superior de Saúde do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Entre Douro e Vouga, E.P.E
coorientador(a)	Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida Professora Auxiliar no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Os dias prósperos não vêm por acaso, são granjeados, como as searas, com muita fadiga e muitos intervalos de desalento.

Camilo Castelo Branco (1825-1890)

agradecimentos

O único espaço reservado para agradecer a todos que me ajudaram ao longo destes 2 anos é demasiado reduzido para o fazer. Assim, deixo o meu sincero agradecimento a todos os que, direta ou indiretamente, me apoiaram nesta etapa da minha formação académica.

À Dr^a Luísa Espinhaço, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação científica e apoio incondicionais, os quais tanto contribuíram para o enriquecimento dos meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, estimularam o meu desejo de querer, sempre, fazer mais e melhor. Agradeço não só a confiança que depositou em mim desde o início, como também o sentido de responsabilidade que me inculuiu.

À Professora Doutora Adelaide Almeida, manifesto o meu sincero agradecimento pela co-orientação. Obrigada pelo profissionalismo e total disponibilidade.

A todos os meus colegas de trabalho, os quais sempre estiveram dispostos a ouvir-me e a apoiar-me e que, incansavelmente, colaboraram comigo para que fosse possível a realização deste trabalho. A todos o meu muito obrigado.

Aos meus amigos e familiares, em especial à minha prima Teresa, por todos os momentos partilhados e por todas as palavras de ânimo e de carinho que me transmitiram.

Aos meus pais, o meu MUITO obrigada por me terem ajudado a ultrapassar os momentos menos bons e por todas as manifestações de incentivo, afeto e carinho.

Ao meu marido Renato e aos meus filhos Fábria e Ivo por todo o carinho, amor e sorrisos num período em que o tempo para lhes dedicar foi reduzido.

palavras-chave

Hepatite C, VHC, Prevalência, Diagnóstico

resumo

O vírus da Hepatite C (VHC) é um importante agente etiológico de patologia hepática e constitui um problema de saúde pública mundial. A infeção por VHC, endémica em inúmeros países, é uma doença de elevado impacto na sociedade, nos cuidados de saúde e na vida do doente, pelo que é fundamental o diagnóstico e tratamento atempado da infeção.

Foi desenvolvido um estudo no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga E.P.E com o objetivo de caracterizar a problemática da infeção por VHC e, desta forma, contribuir para a revisão de protocolos laboratoriais estabelecidos.

Das 7938 amostras em estudo, confirmou-se o diagnóstico de infeção ativa por VHC em apenas 208 (2,6%) amostras. A prevalência da infeção ativa por VHC no CHEDV de 2010 a 2013 variou entre 2,1 e 3,4%. Verificou-se que a maioria dos indivíduos com infeção ativa por VHC tinha idade compreendida entre os 30 e os 50 anos (70,3%), sendo o sexo masculino o mais frequente (76,8%).

O presente estudo sustenta a necessidade de rever e sistematizar a árvore de procedimentos de diagnóstico/monitorização da infeção por VHC no CHEDV.

Keywords

Hepatitis C, HCV, Prevalence, Diagnosis

abstract

The Hepatitis C virus is an important agent of liver disease and it is a worldwide public health problem. The HCV infection, endemic in many countries, is a disease with high impact in patient's life, society and health care. Because of that the early diagnosis and treatment of infection is essential.

It was developed a study in the Clinical Pathology Service of Centro Hospitalar entre o Douro e Vouga, with the aim of characterizing the HCV infection and contribute to the review of established protocols. Of 7938 samples analyzed, it was confirmed the diagnosis of active HCV infection in only 208 (2.6%) samples. The prevalence of active HCV infection in CHEDV ranged between 2,1 e 3,4%. There was a high frequency of individuals with active HCV infection aged 30 to 50 years old (70.3%) and the majority were male (76.8%).

This study supports the need to review and systematize the procedures to diagnostic/monitoring of HCV infection.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	v
Lista de anexos	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C	2
3. VÍRUS DA HEPATITE C	4
3.1 Estrutura da partícula viral	4
3.2 Genoma viral	4
3.3 Variabilidade genética do VHC	5
3.3.1 Genótipos	5
3.3.2 Quasiespécies	6
3.4 Características e funções das proteínas do VHC	7
3.4.1 Proteína Core	7
3.4.2 Glicoproteínas E1 e E2	7
3.4.3 Proteína NS1	8
3.4.4 Proteína NS2	8
3.4.5 Proteínas NS3 e NS4A	8
3.4.6 Proteína NS4B	8
3.4.7 Proteína NS5A	9
3.4.8 Proteína NS5B	9
3.5 Ciclo de replicação viral	9
3.6 Transmissão	11
4. PATOFISIOLOGIA DA INFECÇÃO	12
4.1 Infecção aguda por VHC	12
4.2 Infecção crónica por VHC	13
5. DIAGNÓSTICO	14
5.1 Diagnóstico indireto/serológico	15
5.2 Diagnóstico direto	16
5.2.1 Detecção de antígenos virais	16
5.2.2 Diagnóstico molecular	17

6. TRATAMENTO	18
7. MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO/EFICÁCIA TERAPÊUTICA	20
8. OBJETIVOS DO ESTUDO	22
9. METODOLOGIAS DE ESTUDO	22
9.1 Caracterização do Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E	22
9.2 Desenho de estudo	22
9.3 Caracterização das amostras	24
9.4 Procedimentos e análise estatística	25
9.5 Questões éticas	25
10. RESULTADOS	26
10.1 Estudo da prevalência da infecção ativa por VHC	27
10.2 Caracterização demográfica e genotípica	28
10.3 Comparação das metodologias laboratoriais	29
11. DISCUSSÃO	31
12. CONCLUSÕES	34
Referências bibliográficas	35
Anexos	38

Lista de Abreviaturas

ALT	Aminotransferase da Alanina
AST	Aminotransferase do Aspartato
CHEDV	Centro Hospitalar Entre Douro e Vouga
CMIA	<i>Chemiluminescent Microparticle Immunoassay</i> , Ensaio de Quimioluminescência por Micropartículas
EASL	<i>European Association For the Study of the Liver</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EIA	<i>Enzymatic Immunoassay</i> , Imunoensaios enzimáticos
nm	Nanómetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , Sequência de Leitura Aberta
Peg IFN-α	Polietilenoglicol-Interferão alfa
RBV	Ribavirina
RIBA	<i>Recombinant Immunoblot assay</i>
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i> , Unidades de Luz Relativas
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite D
VHE	Vírus da Hepatite E
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

Índice de Figuras

Figura 1. Genoma do VHC.....	5
Figura 2. Ciclo de replicação viral	10
Figura 3. Marcadores serológicos, virológicos e bioquímicos durante a infecção aguda autolimitada	12
Figura 4. Marcadores serológicos, virológicos e bioquímicos na infecção crónica por VHC	13
Figura 5. Algoritmo de diagnóstico/monitorização da infecção por VHC no CHEDV ...	23
Figura 6. Desenho de estudo	24
Figura 7. Prevalência da infecção por VHC 2010-2013	28
Figura 8. Distribuição dos indivíduos com infecção por VHC por faixa etária.....	29
Figura 9. Distribuição dos genótipos VHC	29
Figura 10. Proposta de algoritmo de diagnóstico/monitorização da infecção por VHC..	33

Índice de Tabelas

Tabela 1. Proveniência das amostras	24
Tabela 2. Distribuição das inscrições por metodologia de diagnóstico/monitorização da infecção	25
Tabela 3. Diagnóstico serológico por CMIA.....	26
Tabela 4. Diagnóstico serológico por INNO-LIA	26
Tabela 5. Diagnóstico molecular por RT-PCR.....	27
Tabela 6. Diagnóstico/monitorização de infecção ativa por VHC 2010-2013.....	28
Tabela 7. Comparação de resultados das metodologias CMIA e RT-PCR	30
Tabela 8. Comparação dos resultados das metodologias CMIA e INNO-LIA	30
Tabela 9. Comparação das metodologias RT-PCR e INNO-LIA.....	30

Lista de anexos

Anexo 1. Distribuição mundial da infecção por VHC (2012)

Anexo 2. Prevalência da infecção por VHC na Europa (2012)

1. INTRODUÇÃO

As hepatites virais são infeções do fígado causadas por vírus hepatotrópicos, responsáveis por quadros clínicos semelhantes de hepatite aguda, mas com diferente potencial de induzir estados crónicos ou fulminantes (Mitchell *et al.*, 2006). Estes quadros clínicos podem ser causados pelos vírus A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) e E (VHE) (Mitchell *et al.*, 2006), sendo as infeções por VHB e VHC clinicamente mais relevantes, dada a elevada possibilidade de progressão para estados crónicos potencialmente fatais (Mitchell *et al.*, 2006). A doença hepática de etiologia viral pode também ser resultante da disseminação de infeções sistémicas virais, tais como infeções por Epstein-Barr, Citomegalovírus e outros herpesvírus (Mitchell *et al.*, 2006).

O vírus da Hepatite C (VHC) é um importante agente etiológico de patologia hepática e constitui um problema de saúde pública à escala mundial (Irshad *et al.*, 2013). Este agente etiológico foi caracterizado pela primeira vez por Qui-Lim Choo e George Kuo em 1989 (Choo & Kuo *et al.*, 1989) e, até 1990, foi reconhecido como o principal agente etiológico de hepatite pós-transfusional e adquirido na comunidade não-A e não-B (Irshad *et al.*, 2013). Com a introdução do *screening* pré-transfusional, a sua incidência reduziu substancialmente, no entanto permaneceu um grave problema nos indivíduos utilizadores de drogas por via parentérica (Irshad *et al.*, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 2,2 a 3% da população mundial tem vindo a ser infetada cronicamente pelo VHC (Irshad *et al.*, 2013).

Em Portugal, estima-se que a prevalência atual da infeção por VHC seja de 1-1,5%, pelo que existirão cerca de 100.000 a 150.000 infetados por VHC (Anjo *et al.*, 2014). Destes, assume-se que apenas 30% (37.500 doentes) estejam diagnosticados (Anjo *et al.*, 2014).

A infeção por VHC, endémica em inúmeros países, é uma doença de elevado impacto na sociedade, nos cuidados de saúde e na vida do doente, pelo que são fundamentais o diagnóstico e o tratamento atempados da infeção (Anjo *et al.*, 2014). Em Portugal, estima-se que os gastos anuais afetos à Hepatite C ascendam a 71 milhões de euros, dos quais aproximadamente 83% se devem a complicações da doença,

nomeadamente cirrose hepática descompensada, carcinoma hepatocelular e transplante hepático (Anjo *et al.*, 2014).

O rápido desenvolvimento de terapias antivirais de ação direta contra a infeção pelo VHC tem contribuído para um otimismo considerável entre os médicos que tratam pacientes com infeção por VHC e para uma esperança fundada de que, em breve, as intervenções terapêuticas serão mais eficazes, mais bem toleradas e de duração mais curta do que as atuais (Hajarizadeh *et al.*, 2013). Porém, o potencial efeito global dos avanços terapêuticos está condicionado pelo subdiagnóstico, pela falta de infra-estruturas de tratamento e pelos custos associados à terapêutica (Hajarizadeh *et al.*, 2013). Uma melhor compreensão da epidemiologia e da história natural da infeção pelo VHC é fundamental para orientar as estratégias de saúde pública, nomeadamente as estratégias de prevenção, bem como as estratégias baseadas na terapêutica (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

Considerando o impacto da infeção por VHC na sociedade, nos cuidados de saúde e na qualidade de vida do doente, bem como a importância dos dados epidemiológicos na definição de estratégias de saúde pública, foi desenvolvido um estudo no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga E.P.E (CHEDV), o qual teve por objetivo caracterizar a prevalência da infeção ativa por VHC e, desta forma, contribuir para a revisão dos protocolos laboratoriais estabelecidos.

2. EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

Recuperando a informação já veiculada na introdução do presente trabalho, a infeção pelo VHC constitui um grave problema de saúde pública mundial (Irshad *et al.*, 2013), com impacto crescente na sociedade e nos cuidados de saúde (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

Conforme referido acima, atualmente, cerca de 2,2 a 3% dos indivíduos são portadores crónicos de VHC e encontram-se em risco de desenvolver cirrose, falência hepática e/ou carcinoma hepatocelular, principais causas de morte por VHC (Anjo *et al.*, 2014; Barra *et al.*, 2013; Shrivastava *et al.*, 2013)

Globalmente, estima-se que 28% dos casos de cirrose hepática e 26% dos casos de carcinoma hepatocelular tenham sido causados pelo VHC, tendo resultado em

aproximadamente 499.000 mortes em todo o mundo, no ano de 2010 (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

A distribuição mundial da infeção por VHC (anexo 1) é variável, verificando-se tanto países com prevalência inferior a 2%, como países cuja prevalência é superior a 10% (Hajarizadeh *et al.*, 2013). As prevalências mais elevadas têm sido reportadas em países africanos, principalmente no Egito e nos Camarões (>10%) (Hajarizadeh *et al.*, 2013). Em contraste, no continente americano, no norte e ocidente da Europa e na Austrália, verificam-se as menores prevalências de infeção por VHC (Hajarizadeh *et al.*, 2013; Kretzer *et al.*, 2014).

A nível europeu, estima-se que sensivelmente 7,3 a 8,8 milhões de indivíduos (1,1 a 1,3%) se encontrem infetados por VHC (Hajarizadeh *et al.*, 2013). De acordo com os dados apresentados no relatório anual epidemiológico da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), em 2011 foram reportados 30.373 casos de infeção por VHC, correspondentes a 7,9 indivíduos *per* 100.000 habitantes (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013). A prevalência de infeção por VHC na Europa (anexo 2) apresenta um padrão heterogéneo, com taxas intermediárias e de elevada prevalência (> 2,5%) no Leste e Sul da Europa (Roménia, Rússia e Itália) e baixas prevalências (\leq 1%) no Oeste e Norte da Europa (Holanda, Reino Unido e Noruega) (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

Em Portugal, estima-se que a prevalência atual da infeção por VHC seja de 1-1,5%, aproximadamente 100.000 a 150.000 infetados (Barra *et al.*, 2013; Anjo *et al.*, 2014;). Destes assume-se que apenas 30% se encontrem diagnosticados, o que corresponde a cerca de 37.500 doentes (Anjo *et al.*, 2014). Embora desconhecida a verdadeira prevalência da infeção por VHC em Portugal, estima-se que a taxa de incidência anual seja 1 novo caso *per* 100.000 habitantes (Anjo *et al.*, 2014). Os dados estatísticos nacionais refletem ainda uma tendência decrescente da taxa de incidência entre 1998 (6,9 casos/100.000 habitantes) e 2010 (0,37 casos/100.000 habitantes) (Anjo *et al.*, 2014).

A infeção por VHC é a principal causa de transplante hepático em adultos (Irshad *et al.*, 2013). Em Portugal, calcula-se que cerca de 20% dos transplantes hepáticos sejam realizados como resposta a uma infeção por VHC (Anjo *et al.*, 2014). Os estudos portugueses indicam ainda que 50% dos casos de morte por carcinoma hepatocelular se associem com o VHC (Anjo *et al.*, 2014).

3. VÍRUS DA HEPATITE C

O VHC é um vírus envelopado, pertencente ao género *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* (Irshad *et al.*, 2013). Conforme referido anteriormente, este agente etiológico foi caracterizado primeiramente por Qui-Lim Choo e George Kuo em 1989 (Choo & Kuo *et al.*, 1989) e, até 1990, foi reconhecido como o principal agente etiológico de hepatite pós-transfusional e adquirida na comunidade não-A e não-B (Irshad *et al.*, 2013).

O VHC é caracterizado pelo seu tropismo hepatocelular e potencial oncogénico sendo, tal como mencionado anteriormente, associado ao desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Anjo *et al.*, 2014).

3.1 Estrutura da partícula viral

A partícula viral, com um diâmetro de 50-60 nm (Vispo, 2012), é constituída por um invólucro de natureza lipídica, o qual reveste a nucleocápside (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Ao invólucro viral estão ancoradas as proteínas estruturais E1 e E2 (Chevaliez & Pawlotsky, 2006), as quais desempenham um papel fundamental na entrada do vírus nas células hospedeiras (Irshad *et al.*, 2013). A nucleocápside é constituída pelas proteínas C e contém o genoma viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2006).

3.2 Genoma viral

O VHC possui uma cadeia simples de ácido ribonucleíco (RNA) (Anjo *et al.*, 2014) de polaridade positiva com aproximadamente 9600 nucleótidos (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Irshad *et al.*, 2013).

O genoma é constituído por uma sequência de leitura aberta (*open reading frame*, *ORF*), flanqueada nas extremidades 5' e 3' por regiões conservadas não codificantes (5'UTR e 3' UTR) (Irshad *et al.*, 2013). Na porção N-terminal da ORF são codificadas as proteínas estruturais Core (p22), E1 (gp35) e E2 (gp70), as quais constituem a partícula viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). As proteínas não estruturais NS1 (p7), NS2 (p23), NS3 (p70), NS4A (p6), NS4B (p27), NS5A (p56/p58) e NS5B (p68) são codificadas na extremidade 3' (Irshad *et al.*, 2013) da ORF, conforme ilustra a Figura 1. As regiões genómicas não codificantes (5' NTR e 3' NTR) contêm elementos reguladores da replicação viral e tradução do RNA (Chevaliez & Pawlotsky, 2006).

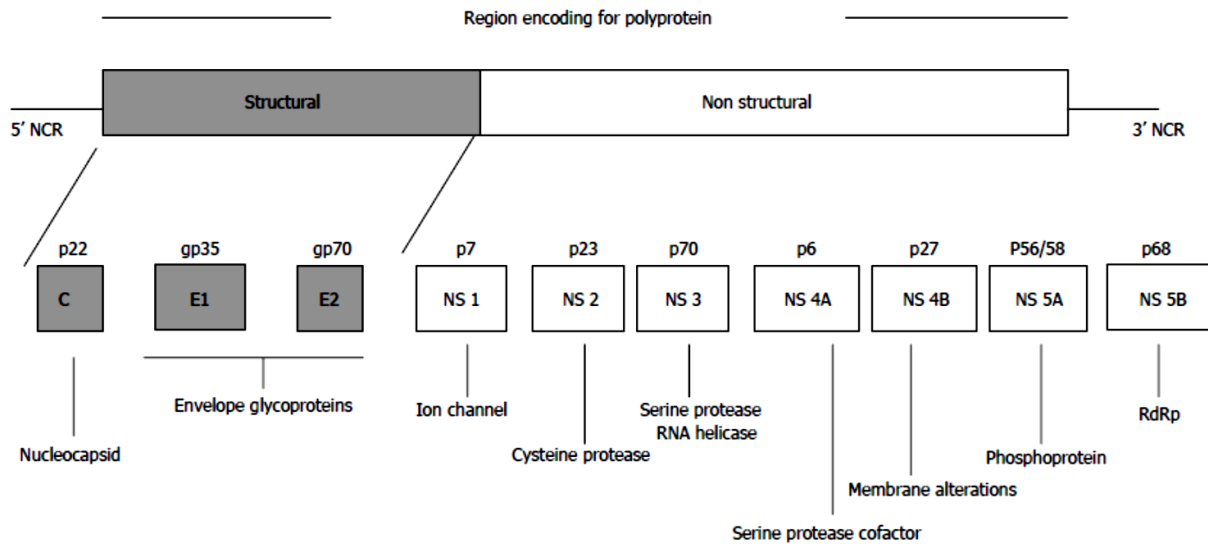


Figura 1. Genoma do VHC (adaptado de Irshad *et al.* 2013).

3.3 Variabilidade genética do VHC

À semelhança de outros vírus com genoma constituído por RNA, o VHC é caracterizado pela sua extensa variabilidade genética, alternando 30 a 50% os diversos génotipos (Irshad *et al.*, 2013; Anjo *et al.*, 2014). Esta diversidade genética deve-se não só à elevada taxa de produção diária de viriões, mas também à elevada taxa de erros/mutações que ocorrem no processo de transcrição do genoma viral por ausência da atividade *proofreading* da RNA polimerase (Vispo, 2012; Kim & Chang, 2013).

A ocorrência contínua de mutações genómicas e a seleção natural de estirpes com maior eficiência de replicação permitem uma rápida diversificação das populações virais e uma elevada capacidade de adaptação (Vispo, 2012). Esta variabilidade genética revela particular importância a nível clínico pela sua influência na evasão aos mecanismos de defesa imune e no desenvolvimento de mecanismos de resistência à antibioterapia (Vispo, 2012; Kim & Chang, 2013).

3.3.1 Genótipos

Atualmente, encontram-se caracterizados seis génotipos major, com homologia de 60-70%, e mais de 120 subtipos de VHC (Vispo, 2012; Irshad *et al.*, 2013).

A distribuição geográfica dos diferentes génotipos de VHC (Irshad *et al.*, 2013) reflete-se na epidemiologia, no modo de transmissão e na variabilidade étnica (Hajarizadeh

et al., 2013). Os genótipos 1, 2 e 3 são os mais frequentemente encontrados a nível mundial (Hajarizadeh *et al.*, 2013; Irshad *et al.*, 2013). Os genótipos 4, 5 e 6 estão geralmente restritos a regiões geográficas específicas (Hajarizadeh *et al.*, 2013). O genótipo 1 é o mais amplamente distribuído, sendo o genótipo mais comum na América do Norte e na Europa Ocidental e do Norte (Hajarizadeh *et al.*, 2013). O genótipo 4 é habitualmente encontrado em África e no Médio Oriente (Hajarizadeh *et al.*, 2013). O genótipo 5 surge, quase exclusivamente, na África do Sul, enquanto o genótipo 6 é endêmico no sudeste asiático (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

Em Portugal, o genótipo 1 é o mais prevalente, sendo identificado em 50- 60% dos doentes. A este segue-se o genótipo 3 com uma prevalência de 25% (Anjo *et al.*, 2014).

O genótipo viral não pode ser utilizado como marcador prognóstico da doença hepática por VHC, uma vez que não é possível estimar o risco de cronicidade, a gravidade da lesão hepática, nem o desenvolvimento de manifestações extrahepáticas (Vispo, 2012). No entanto, é um importante fator preditivo da resposta virológica mantida ao tratamento com Interferão e Ribavirina (Vispo, 2012).

O método de referência para genotipagem do VHC é a sequenciação das regiões genómicas Core, E1 ou NS5B e posterior análise filogenética, todavia têm sido desenvolvidos outros ensaios de genotipagem baseados na metodologia Real Time RT-PCR (Saludes *et al.*, 2014).

3.3.2 Quasiespécies

Num indivíduo infetado por VHC, não está presente RNA viral de sequência única, mas sim um conjunto de sequências muito semelhantes, as quais se denominam quasiespécies (Vispo, 2012). Estas variantes são geradas pela substituição de nucleótidos (mutações) em múltiplos ciclos de replicação (Vispo, 2012). A região mais característica do genoma do VHC com natureza quasiespécie é a região HVR-1, localizada na superfície da proteína E2 (Vispo, 2012).

A estrutura das quasiespécies apresenta relevância clínica por várias razões, nomeadamente a correlação entre o volume de inóculos e o resultado da infeção; a progressão da doença e a resistência à terapêutica (Vispo, 2012). A carga mutacional facilita a adaptação a um novo meio e a evasão aos mecanismos de resposta imune (Vispo,

2012). Além disso, a exposição a inóculos virais pouco complexos pode ser um determinante essencial para a resolução da infeção (Vispo, 2012).

3.4 Características e funções das proteínas do VHC

A ORF, que constitui o genoma viral, contém cerca de 9024 a 9111 nucleótidos, dependendo do genótipo, e codifica 10 proteínas (Chevaliez & Pawlotsky, 2006), das quais 3 são estruturais (Core, E1 e E2) e 7 não estruturais (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Kim & Chang, 2013). Estas proteínas resultam do processamento de uma poliproteína, com aproximadamente 3000 aminoácidos, pelas proteases virais e celulares (Vispo, 2012).

3.4.1 Proteína Core

A proteína Core, codificada na extremidade 5' da ORF, é uma RNA-*binding protein* sintetizada por clivagem do precursor P23, após tradução do RNA viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Para além do seu papel na formação da nucleocápside viral, esta proteína interage com inúmeras proteínas celulares e vias intracelulares intervenientes no ciclo de replicação viral, apresentando funções pro e anti- apoptóticas, bem como funções imunomoduladoras (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Kim & Chang, 2013). Esta proteína tem sido muitas vezes associada com a lesão tecidual, a progressão da fibrose hepática, esteatose e oncogénese (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Kim & Chang, 2013).

3.4.2 Glicoproteínas E1 e E2

As glicoproteínas E1 e E2, componentes essenciais do invólucro viral, são glicoproteínas transmembranares do tipo I (Chevaliez & Pawlotsky, 2006), fundamentais à entrada e fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A glicoproteína E2 tem um papel crucial nas fases iniciais da infeção, nomeadamente na adsorção à célula hospedeira por interação com os inúmeros recetores (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A glicoproteína E1, por sua vez, está envolvida no processo de fusão da partícula viral com a membrana celular (Chevaliez & Pawlotsky, 2006).

3.4.3 Proteína NS1

A proteína NS1 (p7), pertencente à família das viroporinas, é uma proteína integral da membrana que constitui canais iónicos de cálcio, envolvidos na formação de novas partículas virais (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Esta protease viral desempenha uma função essencial na montagem da partícula viral, mediando a clivagem entre a NS2 e a NS3 (Kim & Chang, 2013).

3.4.4 Proteína NS2

A proteína NS2 é uma proteína transmembranar não glicosilada, com atividade metaloprotease zinco-dependente quando associada ao domínio amino-terminal da proteína NS3 (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Para além da ação proteolítica, esta proteína interage com proteínas celulares como as proteínas pró-apoptóticas (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A proteína NS2 participa na montagem do virião e constitui o complexo de replicação juntamente com as proteínas NS5A e NS5B (Vispo, 2012).

3.4.5 Proteínas NS3 e NS4A

A proteína NS3 é uma proteína viral multifuncional, com função RNA-helicase, NTPase e protease serínica (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Esta protease representa um papel fundamental no processamento das proteínas virais, nomeadamente na clivagem das ligações NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A proteína NS4A é um cofator da ação proteolítica da NS3, fundamental para o ciclo de replicação viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A protease NS3-NS4A é uma antagonista da via RNA-dependente do fator regulador do interferão 3 (IRF-3), importante mediador da indução do interferão na resposta à infeção viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Dada a sua importância no ciclo de replicação viral, a proteína NS4A é um dos principais alvos para o desenvolvimento de terapêutica antivírica (Kim & Chang, 2013).

3.4.6 Proteína NS4B

A proteína NS4B é uma proteína de membrana intrínseca hidrofóbica que desempenha função de modulação da atividade da RNA polimerase-RNA dependente, participando na regulação do processo de tradução do genoma viral e celular (Sklan &

Glenn, 2006). Para além disso, vários estudos têm sugerido a relevância da NS4B na hepatocarcinogénese (Sklan & Glenn, 2006).

3.4.7 Proteína NS5A

A proteína NS5A é uma metaloproteína interveniente no ciclo de replicação viral, através da regulação de vias intracelulares (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A fosforilação desta proteína desempenha um papel central no ciclo viral, nomeadamente ao regular a replicação do genoma (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). A hiperfosforilação da proteína NS5A inibe a replicação do genoma viral, através da inibição do complexo de replicação (Chevaliez & Pawlotsky, 2006).

3.4.8 Proteína NS5B

A proteína NS5B é uma RNA polimerase - RNA dependente envolvida no processo de transcrição do genoma viral, etapa crucial para o ciclo de replicação viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Esta proteína, tal como a NS3, tem vindo a ser utilizada como alvo no desenvolvimento de terapêutica antiretrovívica (Kim & Chang, 2013).

3.4.9 Outras Proteínas

Para além das anteriores, estudos indicam a síntese de uma outra proteína, a proteína F (*Frameshift protein*), resultante de uma mutação *frameshift* na região codificante N-terminal da poliproteína VHC (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Os anticorpos anti- proteína F são detetados em pacientes cronicamente infetados, sugerindo que esta proteína possa ser produzida durante a infeção (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). No entanto, os mecanismos transduccionais e o seu papel no ciclo viral permanecem desconhecidos (Chevaliez & Pawlotsky, 2006).

3.5 Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação do VHC (Figura 2) é um processo dinâmico que envolve várias etapas mediadas por recetores, proteínas e complexos enzimáticos (Kim & Chang, 2013). Estas etapas incluem a adesão e fusão com a membrana da célula hospedeira, a transcrição e tradução do genoma viral, o processamento pós-tradução, a montagem, maturação e libertação das partículas virais (Kim & Chang, 2013).

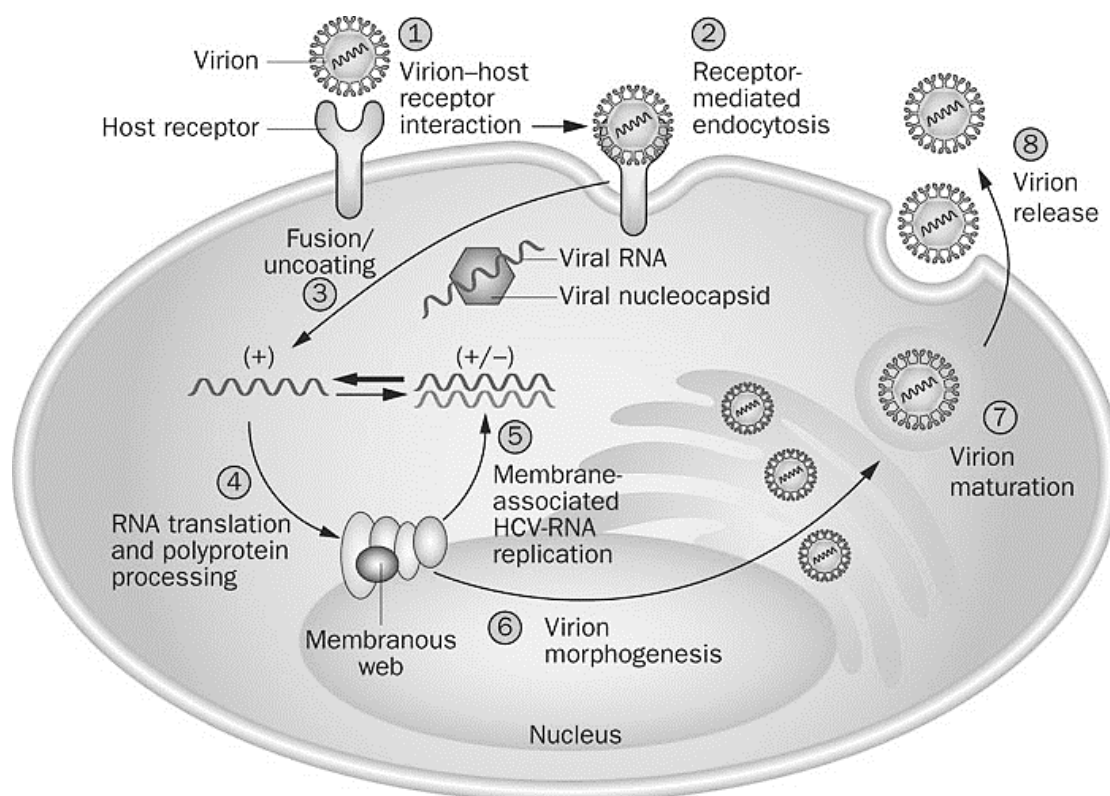


Figura 2. Ciclo de replicação viral (adaptado de Pereira *et al.* 2009).

O ciclo de replicação viral do VHC não é dependente da integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira pelo que se processa, em grande parte, no citoplasma dos hepatócitos (Vispo, 2012).

Apesar de todos os esforços realizados, o mecanismo de replicação viral do VHC ainda não é totalmente conhecido, principalmente devido à inexistência de um modelo de cultura *in vitro* que permita a sua replicação eficiente (Vispo, 2012)

Diversos estudos têm sugerido que o VHC infeta os hepatócitos através de mecanismos de endocitose mediada por moléculas de superfície (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Vispo, 2012), as quais interagem com as glicoproteínas E1 e E2 (Kim & Chang, 2013). Inúmeras moléculas de superfície têm sido sugeridas como mediadoras da adesão e internalização do VHC nas células hospedeiras, nomeadamente CD81, recetor *scavenger B* tipo I (SR-BI), recetor LDL, claudina-1, entre outras (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Kim & Chang, 2013; Park & Rehmann, 2014).

Após adesão à célula hospedeira, o invólucro viral funde-se com as membranas celulares e a nucleocápside é libertada no citoplasma celular (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). O RNA viral é replicado e traduzido, por interação das proteínas que constituem o

complexo de replicação, para síntese da poliproteína VHC precursora (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Esta poliproteína é posteriormente clivada, pelas proteases virais e celulares, em proteínas estruturais e não estruturais (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Kim & Chang, 2013).

Após montagem e maturação das partículas virais, os viriões são libertados através de vesículas citoplasmáticas (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Apesar de não se encontrarem totalmente esclarecidas, as etapas de montagem e libertação das partículas virais parecem estar associadas com o metabolismo lipídico, tendo em consideração as alterações na distribuição de gordura verificadas no tecido hepático infetado por VHC (Felmlee *et al.*, 2013; Kim & Chang, 2013).

3.6 Transmissão

O VHC é transmitido homem-homem, essencialmente por via parentérica, podendo ainda ser transmitido por via sexual ou vertical (Chevaliez & Pawlotsky, 2006; Vispo, 2012).

A transmissão por via parentérica pode ocorrer através da partilha de seringas entre utilizadores de drogas por via intravenosa, da contaminação acidental de profissionais de saúde, da transplantação de órgãos e da transfusão de componentes sanguíneos (Chevaliez & Pawlotsky, 2006). Nos países economicamente desenvolvidos, a generalização do *screening* de anticorpos anti-VHC permitiu reduzir significativamente a hepatite C pós-transfusional, pelo que o uso de drogas por via parentérica é o principal fator de risco para a infeção por VHC (Vispo, 2012).

Os consumidores de drogas intravenosas, ativos ou não, e os hemofílicos (sobretudo se foram recetores de hemoderivados antes de 1987), representam um grupo de elevado risco em contrair infeção por VHC (Mitchell *et al.*, 2006; Vispo, 2012). Os recetores de transplantes ou transfusões de sangue, antes de 1992, os pacientes em hemodiálise, os indivíduos VIH positivos, os filhos de mães VHC positivas e aqueles com elevação de transaminases de causa indeterminada constituem grupos de risco moderado (Mitchell *et al.*, 2006; Vispo, 2012). Finalmente e ainda nos países economicamente desenvolvidos, afiguram-se como grupos de baixo risco os parceiros sexuais de indivíduos VHC positivos e os indivíduos acidentalmente expostos a produtos biológicos contaminados (Vispo, 2012).

4. PATOFISIOLOGIA DA INFEÇÃO

As hepatites virais são, frequentemente, eventos subclínicos de evolução autolimitada (Mitchell *et al.*, 2006). A infecção por VHC destaca-se das demais pela elevada taxa de progressão para a cronicidade e desenvolvimento de complicações potencialmente fatais. (Mitchell *et al.*, 2006; Anjo *et al.*, 2014). A doença hepática por VHC desenvolve-se através de mecanismos complexos que incluem processos de interação direta entre as proteínas virais e os genes dos hepatócitos, bem como efeitos indiretos por mecanismos de resposta imune (Vispo, 2012). Um dos principais fatores envolvidos na doença hepática é o desenvolvimento de processos de stress oxidativo e, possivelmente, alterações mitocondriais induzidas pela proteína Core (Li *et al.*, 2014; Vispo, 2012).

4.1 Infecção aguda por VHC

A infecção aguda por VHC define-se pela deteção do vírus 2 a 14 dias após exposição, pela elevação dos níveis de aminotransferase da alanina (ALT) e de aminotransferase do aspartato (AST), pelo aumento gradual do título de anticorpos anti-VHC, bem como pela existência de sintomas clínicos (Hajarizadeh *et al.*, 2013; Irshad *et al.*, 2013; Rivilla & Moltó, 2013). Geralmente, os anticorpos anti-VHC surgem 2 a 8 semanas após infecção aguda e persistem durante toda a vida (figura 3) (Vispo, 2012).

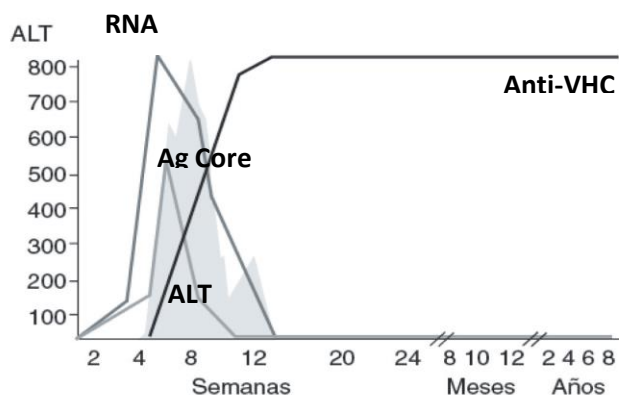


Figura 3. Marcadores serológicos, virológicos e bioquímicos durante a infecção aguda autolimitada (adaptado de Rivilla & Moltó, 2013).

Nos primeiros 6 meses após exposição, a maioria dos indivíduos permanece assintomático, o que se reflete na ausência de diagnóstico (Hajarizadeh *et al.*, 2013; Anjo *et al.*, 2014;). A fase aguda sintomática da infecção por VHC, observada em 15-30% dos

pacientes infetados, ocorre 5 a 12 semanas após a exposição ao vírus e é geralmente suave, observando-se sintomas não específicos tais como letargia e mialgia (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

Em aproximadamente 20 a 25% dos doentes com infeção aguda por VHC verifica-se resolução espontânea da infeção, definida por níveis de RNA viral indetetáveis (Hajarizadeh *et al.*, 2013; Rosen, 2013).

4.2 Infeção crónica por VHC

Apesar de autolimitada em alguns doentes, em 54 a 86% dos doentes a infeção por VHC evolui para cronicidade (Anjo *et al.*, 2014). Uma vez estabelecida a cronicidade da infeção, raramente ocorre resolução espontânea, pelo que a infeção pode progredir, causando lesão nos hepatócitos e cirrose hepática (15- 51%) (Anjo *et al.*, 2014). A progressão para este estado é influenciada por diversos cofactores, nomeadamente o consumo de álcool, diabetes, idade, coinfeção por VIH ou outros vírus hepatotrópicos (Vispo, 2012; Anjo *et al.*, 2014).

A Hepatite C crónica caracteriza-se pela evidência sintomática, bioquímica ou serológica de doença hepática continuada durante mais de 6 meses (Mitchell *et al.*, 2006). A positividade contínua dos anticorpos anti-VHC e RNA do VHC (figura 4), com transaminases elevadas ou normais, bem como a inflamação e fibrose hepática, são evidências clínicas do estado crónico de infeção por VHC (Velosa *et al.*, 2012).

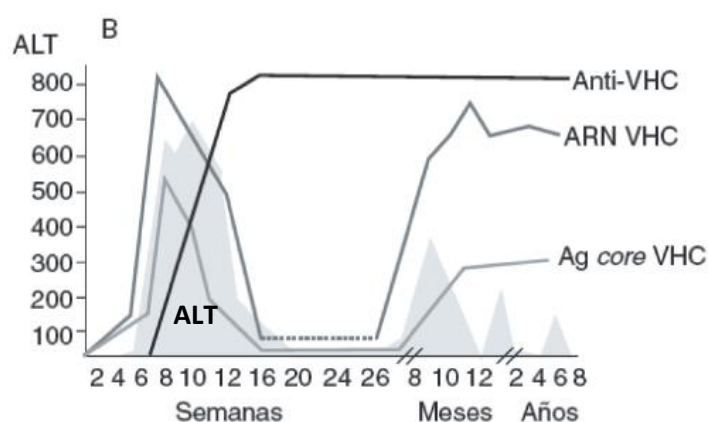


Figura 4. Marcadores serológicos, virológicos e bioquímicos na infeção crónica por VHC (adaptado de Rivilla & Moltó, 2013).

A cronicidade da infeção é caracterizada pela extensão da inflamação crónica do parênquima hepático, pela formação de septos afibrosos por necrose dos hepatócitos e pela progressão para cirrose em resultado da regeneração hepatocelular (Mitchell *et al.*, 2006).

A fibrose hepática, resultante da acumulação de uma matriz extracelular composta principalmente de colagénios, proteoglicanos, fibronectina e ácido hialurónico, evolui para cirrose hepática em 10 a 40% dos casos (Saludes *et al.*, 2014).

A cirrose hepática é caracterizada por uma fibrose progressiva e pela destruição da arquitetura parenquimatosa do fígado, acompanhada por uma reorganização vascular com formação de desvios venosos arterioportais, artério-hepáticos e portal-hepáticos (Mitchell *et al.*, 2006). A nível clínico, o quadro cirrótico traduz-se em sintomas como a anorexia, a letargia e a perda de peso, podendo evoluir para quadros potencialmente fatais, tais como encefalopatia hepática, complicações por hipertensão portal, carcinoma hepatocelular e, finalmente, insuficiência hepática (Mitchell *et al.*, 2006; Saludes *et al.*, 2014).

Dos pacientes com infeção crónica por VHC, cerca de 40 a 75% apresentam manifestações extra-hepáticas, nomeadamente metabólicas, hematológicas, vasculares e reumatológicas (Zhu & Chen, 2013).

5. DIAGNÓSTICO

A infeção aguda por VHC é tipicamente moderada e geralmente não é diagnosticada sendo, por vezes, identificada apenas na fase crónica (Irshad *et al.*, 2013). Assim, o rastreio e o diagnóstico precoce e eficaz da infeção por VHC assumem um papel primordial no controlo da transmissão, no tratamento dos doentes e, conseqüentemente, na prevenção da doença hepática crónica (Saludes *et al.*, 2014).

Para diagnosticar e controlar a infeção por VHC foram desenvolvidos 2 grupos de ensaios laboratoriais. Os diagnósticos indiretos, que estudam a resposta imune específica ao VHC através da deteção de anticorpos anti-VHC circulantes e os diagnósticos diretos, que detetam componentes virais, tais como o antigénio Core ou o genoma viral (Saludes *et al.*, 2014; Vispo, 2012).

A exposição ao VHC pode ser determinada com elevada sensibilidade e especificidade através de ensaios serológicos de terceira geração, nomeadamente deteção de anticorpos anti-VHC IgM e IgG no soro (Saludes *et al.*, 2014). No entanto, a infeção

por VHC deve ser confirmada por métodos de diagnóstico diretos, tais como a deteção de antígenos virais (antígeno Core) e deteção de ácido nucleico viral no soro ou nos hepatócitos (Irshad *et al.*, 2013; Saludes *et al.*, 2014).

5.1 Diagnóstico indireto/serológico

A partir de 1989, a infeção pelo VHC foi diagnosticada principalmente através da deteção de anticorpos anti-VHC através de imunoenaios enzimáticos (EIA) (Saludes *et al.*, 2014). Os ensaios de primeira geração baseavam-se na utilização de uma proteína recombinante, expressa na membrana de fungos leveduriformes, contendo um epítipo da região NS4 (C100-3) do genoma do VHC (Kamili *et al.*, 2012). Embora estes ensaios identificassem os anticorpos IgG anti-VHC em aproximadamente 80% dos pacientes com hepatite pós-transfusional, apresentavam reduzida sensibilidade e especificidade (Kamili *et al.*, 2012).

Os testes serológicos evoluíram e os ensaios de segunda geração já incluíam vários antígenos recombinantes das regiões Core, NS4 e NS3 (Kamili *et al.*, 2012).

Atualmente, os ensaios de terceira geração incluem, para além dos anteriores, antígenos recombinantes da região NS5 do VHC (Kamili *et al.*, 2012; Saludes *et al.*, 2014). Este avanço resultou na redução do período de janela para cerca de 10 dias e no aumento da sensibilidade dos métodos de diagnóstico indireto (Saludes *et al.*, 2014). No entanto, estas metodologias apresentam um elevado número de resultados falsos-positivos, reduzida sensibilidade durante o período de janela, podendo ainda verificar-se resultados falsos-negativos em indivíduos imunodeprimidos ou hemodialisados (Irshad *et al.*, 2013; Saludes *et al.*, 2014). A Direção-geral da Saúde recomenda a confirmação de um resultado positivo através de *Recombinant Immunoblot Assay* (RIBA) ou de ensaios moleculares para deteção do RNA viral (Direção-Geral da Saúde, 2011; Kamili *et al.*, 2012)

Para além dos ensaios imunoenzimáticos, a deteção de anticorpos específicos anti-VHC no soro pode ainda ser realizada através da técnica de quimioluminescência por micropartículas (CMIA) (Kamili *et al.*, 2012; Irshad *et al.*, 2013; Saludes *et al.*, 2014). Esta metodologia baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo entre os anticorpos anti-VHC e as moléculas de captura, que revestem micropartículas paramagnéticas (Saludes *et al.*, 2014). A presença dos anticorpos anti-VHC é detetada através de um anticorpo conjugado que catalisa a oxidação do marcador quimioluminescente, resultando

na emissão de um sinal medido em Unidades de Luz Relativas (RLU's) (Saludes *et al.*, 2014).

Os ensaios Immunoblot recombinantes, tais como CHIRON® RIBA™ 3.0 e INNO-LIA™ HCV Ab III (Innogenetics®), são frequentemente utilizados como testes confirmatórios da presença de anticorpos anti-VHC específicos, realizados através de imunoenaios enzimáticos ou CMIA (Kamili *et al.*, 2012; Saludes *et al.*, 2014). Estes ensaios baseiam-se na deteção de anticorpos específicos para as proteínas virais recombinantes e péptidos sintéticos (E2, NS3, NS4A, NS4B e NS5A), adsorvidos em bandas individuais numa membrana (Kamili *et al.*, 2012; Saludes *et al.*, 2014). A positividade em duas ou mais bandas é indicativa de um resultado positivo (Kamili *et al.*, 2012). O resultado é considerado indeterminado caso seja detetada reatividade em apenas uma banda (Kamili *et al.*, 2012).

Apesar de altamente sensível e específica, a deteção de anticorpos anti-VHC no soro não permite distinguir a fase aguda da fase crónica de infeção, bem como a infeção ativa da infeção resolvida (Irshad *et al.*, 2013; Saludes *et al.*, 2014).

5.2 Diagnóstico direto

Conforme referido anteriormente, para o diagnóstico da infeção ativa por VHC é fundamental a deteção dos antígenos virais, através de metodologias imunoenzimáticas, e/ou do material genómico, através de metodologias de diagnóstico molecular (Saludes *et al.*, 2014).

5.2.1 Deteção de antígenos virais

O antígeno Core do VHC pode ser detetado no soro após 1 a 2 semanas da exposição ao VHC e pode ser utilizado em alternativa ao diagnóstico molecular nas seguintes situações: durante o período de janela, em pacientes seronegativos com elevado risco de infeção e na distinção da infeção ativa da infeção resolvida (Saludes *et al.*, 2014).

Neste momento, a deteção do antígeno Core pode ser totalmente automatizada através do *Architect HCV Core antigen test*® (Abbott Laboratories) (Saludes *et al.*, 2014). Embora este ensaio não seja suficientemente sensível para substituir a deteção do RNA viral na monitorização da terapêutica, vários estudos têm sugerido que a quantificação do antígeno Core pode ser utilizada na monitorização da terapêutica com o interferão-alfa (Saludes *et al.*, 2014).

Têm ainda vindo a ser desenvolvidos vários ensaios que permitem detetar simultaneamente os anticorpos anti-VHC e o antigénio Core. Embora não tão sensíveis quanto os anteriores, estes testes aumentam a probabilidade de diagnosticar a infeção no período de janela, ou seja, no intervalo de tempo entre a infeção pelo vírus e a produção de anticorpos anti-VHC no sangue (Saludes *et al.*, 2014).

5.2.2 Diagnóstico molecular

As metodologias de diagnóstico molecular da infeção por VHC são frequentemente utilizadas para diversas finalidades de uso clínico (Saludes *et al.*, 2014). Em primeiro lugar, a presença de RNA viral em circulação reflete a replicação viral, razão pela qual os ensaios moleculares de elevada sensibilidade (limite de deteção ≤ 50 IU / mL) são utilizados para o diagnóstico de infeção ativa por VHC em pacientes com pesquisa de anticorpos positiva (Saludes *et al.*, 2014). Em segundo lugar, os ensaios moleculares são úteis para o diagnóstico precoce da infeção aguda, uma vez que o RNA viral é um marcador precoce da infeção aguda por VHC, detetando-se semanas antes da seropositividade (dentro de uma a três semanas após a exposição) (Kamili *et al.*, 2012; Saludes *et al.*, 2014). Para além disso, o diagnóstico de uma infeção crónica por VHC é confirmado através da deteção dos anticorpos anti-VHC (à exceção de pacientes gravemente imunocomprometidos) e do RNA viral ao longo de 6 meses (Saludes *et al.*, 2014).

A região 5'UTR do RNA viral, altamente conservada, é com frequência o alvo para a deteção do genoma do VHC (Saludes *et al.*, 2014). Para a deteção do genoma viral são necessários vários processos laboratoriais, nomeadamente a extração de ácidos nucleicos a partir das amostras clínicas (soro ou plasma), a amplificação dos ácidos nucleicos e a deteção do sinal (Saludes *et al.*, 2014).

Na atualidade, a deteção/quantificação do RNA viral é realizada através da metodologia *Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (Real Time RT-PCR) (Saludes *et al.*, 2014). De acordo com as orientações europeias e norte-americanas, esta técnica é o método de referência para a quantificação do RNA do VHC na prática clínica, dada a sua elevada sensibilidade e amplitude dos intervalos de quantificação (Saludes *et al.*, 2014). A metodologia RT-PCR baseia-se na utilização de moléculas *reporter* fluorescentes para monitorização dos produtos de amplificação de

DNA complementar (cDNA) produzidos durante os ciclos da Polymerase Chain Reaction (Bustin, 2005). A transcrição reversa do RNA, a sua amplificação por PCR, bem como a sua deteção em tempo real são realizadas num sistema fechado, evitando assim a contaminação com produtos amplificados (Saludes *et al.*, 2014)

Apesar das inúmeras vantagens clínicas, estes ensaios requerem equipamento e técnicas sofisticadas, equipas experientes, áreas laboratoriais exclusivas e reagentes dispendiosos, razões pelas quais nem sempre são adotados pelas instituições prestadoras de cuidados de saúde (Kamili *et al.*, 2012; Saludes *et al.*, 2014).

6. TRATAMENTO

Apesar dos esforços realizados, presentemente não se encontra disponível nenhuma vacina eficaz para prevenção da infeção por VHC, pelo que se torna fundamental a adoção de estratégias de saúde pública baseadas no diagnóstico precoce e na eficácia da terapêutica (Zhu & Chen, 2013).

O principal objetivo da terapêutica da infeção por VHC é a cura ou resolução da infeção, definida pela ausência de RNA detetável, após cessação do tratamento (Vispo, 2012; Anjo *et al.*, 2014). Nos dias de hoje, estima-se que 35% dos doentes com diagnóstico de infeção por VHC já tenham efetuado tratamento. Destes 55% com resolução da infeção (Anjo *et al.*, 2014).

A cura ou resolução da infeção é avaliada pela resposta virológica mantida ao tratamento, a qual corresponde ao nível detetável de RNA viral (< 50 UI/mL) no sangue 24 semanas após a cessação do tratamento (Anjo *et al.*, 2014). A resposta virológica mantida associa-se com a resolução da doença em pacientes sem cirrose e à diminuição significativa do risco de descompensação hepática, carcinoma hepatocelular e morte por doença hepática em pacientes com quadros cirróticos (Anjo *et al.*, 2014).

A decisão de iniciar a terapêutica antivirica é influenciada por inúmeros fatores, nomeadamente a história natural da doença, o quadro clínico-histológico, os efeitos secundários e a previsão de resposta à terapêutica (Zhu & Chen, 2013).

Antes de iniciar a terapêutica é necessário realizar a determinação do genótipo e da carga viral através de metodologias moleculares (Rivilla & Moltó, 2013). Estas

determinações contribuirão para a definição do plano terapêutico, nomeadamente a sua duração, bem como para a previsão da resposta à terapêutica (Rivilla & Moltó, 2013).

Em Portugal, a combinação de polietilenoglicol-interferão alfa (PegIFN- α) e ribavirina (RBV) é a terapêutica aprovada para o tratamento da infeção crónica pelo VHC em indivíduos com infeção por VHC dos genótipos não-1 (Anjo *et al.*, 2014; Saludes *et al.*, 2014). Esta combinação terapêutica proporciona a cura a aproximadamente 60% dos doentes (Velosa *et al.*, 2012). No entanto, apresenta vários efeitos secundários graves, tais como anemia, granulocitopenia e depressão, e encontra-se associada a um tratamento de longa duração e com custos elevados (Zhu & Chen, 2013).

A eficácia da terapêutica antivírica baseada na utilização do PegIFN- α é afetada por diversos fatores, nomeadamente o genótipo, a carga viral, a resposta virológica, a existência de polimorfismos do gene IL28B e a esteatose hepática (Zhu & Chen, 2013). De acordo com as orientações nacionais e internacionais, estes fatores devem ser utilizados como preditivos da resposta terapêutica (Velosa *et al.*, 2012; Zhu & Chen, 2013). A menor eficácia da terapêutica pode estar ainda associada à síndrome metabólica, resistência à insulina, cirrose hepática, entre outros (Zhu & Chen, 2013).

A eficácia da terapêutica combinada PegIFN- α e RBV é de 45% para genótipo 1 e 4 do VHC e de 80% para os genótipos 2 e 3 (Rivilla & Moltó, 2013; Zhu & Chen, 2013). A associação de fármacos com ação antivírica direta no VHC, nomeadamente os inibidores da protease NS3, aumenta em cerca de 25-30% a taxa de resposta virológica mantida em doentes portadores de genótipo 1, com ou sem histórico de tratamento prévio (Velosa *et al.*, 2012). Razão pelo qual, a genotipagem se torna fundamental na decisão clínica sobre a adoção de terapêutica tripla em pacientes com infeção por VHC do genótipo 1 (Saludes *et al.*, 2014). Os inibidores da protease NS3, nomeadamente Boceprevir e Telaprevir, impedem o ciclo de replicação viral através da inibição da clivagem da poliproteína (Zhu & Chen, 2013). Mais ainda, estes agentes antivíricos atuam como antagonistas da resposta imune clivando moléculas de sinalização que medeiam a resposta celular, resultando na supressão da produção do interferão (Zhu & Chen, 2013).

Novos fármacos antivíricos têm vindo a ser desenvolvidos, nomeadamente inibidores da polimerase NS5B (Feeney & Chung, 2014), no entanto a terapêutica combinada do PegIFN- α e RBV permanece a terapêutica de referência para o tratamento da infeção crónica por VHC (Velosa *et al.*, 2012; Zhu & Chen, 2013).

Nos doentes com Hepatite C aguda, o tratamento deve ser precoce, mas não existe consenso em relação ao início da terapêutica, pelo que tem sido sugerido o seu começo após 12 semanas de persistência do RNA do VHC sem declínio (Velosa *et al.*, 2012). Nos pacientes com doença crónica ligeira, a indicação para tratamento deve ser individualizada (Velosa *et al.*, 2012). Por exemplo, têm indicação para tratamento imediato os doentes com cirrose descompensada e está fortemente indicado o tratamento em doentes com fibrose moderada ou avançada (Velosa *et al.*, 2012).

Atualmente, não se encontra disponível terapia específica para a fibrogénese hepática uma vez que, entre outras razões, os mecanismos exatos envolvidos nesse processo não estão completamente esclarecidos (Saludes *et al.*, 2014). Esta situação é especialmente problemática para os pacientes que não respondem à terapêutica antivírica vigente (Saludes *et al.*, 2014).

O rápido desenvolvimento de terapias antivirais de ação direta para a infeção pelo VHC suscita um otimismo considerável entre os médicos que tratam pacientes com infeção por VHC, e uma esperança de que, em breve, as intervenções terapêuticas serão mais eficazes, mais bem toleradas e de duração mais curta do que as atuais (Hajarizadeh *et al.*, 2013). No entanto, o potencial efeito global dos avanços terapêuticos está presentemente limitado em consequência do subdiagnóstico, da falta de infra-estruturas de tratamento e dos custos associados à terapêutica (Hajarizadeh *et al.*, 2013). Uma melhor compreensão da epidemiologia e da história natural da infeção pelo VHC é necessária para orientar as estratégias de saúde pública, nomeadamente as estratégias de prevenção, mas também as estratégias baseadas na terapêutica (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

7. MONITORIZAÇÃO DA INFEÇÃO/EFICÁCIA TERAPÊUTICA

Durante a infeção por VHC, é fundamental a distinção entre infeção hepática aguda e crónica (Irshad *et al.*, 2013). Tal como já foi referido, a deteção de anticorpos anti-VHC no soro não permite esta distinção, uma vez que o anticorpo anti-VHC IgM pode surgir em níveis elevados em ambas as fases da infeção (Irshad *et al.*, 2013). Na tentativa de solucionar esta questão, têm sido exploradas várias abordagens alternativas, nomeadamente a monitorização da carga viral, das flutuações dos títulos de anticorpos anti-VHC, bem como a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-VHC (Kamili *et*

al., 2012). A avaliação do desempenho dos ensaios de avidéz através da utilização de painéis de seroconversão sugere que estes permitam, potencialmente, distinguir com fiabilidade a infeção aguda da infeção crónica por VHC (Kamili *et al.*, 2012).

O doseamento de marcadores bioquímicos da função hepática, tais como a ALT e a AST, é extremamente útil na avaliação da progressão da infeção, assim como na monitorização da eficácia terapêutica (Saludes *et al.*, 2014). O doseamento de outros marcadores bioquímicos, tais como haptoglobina, apolipoproteína A1, bilirrubinas, entre outros, permite avaliar a função hepática e prever complicações associadas à progressão do grau de fibrose hepática (Saludes *et al.*, 2014).

No que respeita à quantificação do RNA viral (carga viral), esta revela-se útil não só no diagnóstico da infeção por VHC, mas principalmente na monitorização da resposta virológica à terapêutica (Saludes *et al.*, 2014; Zhu & Chen, 2013).

Para além da deteção/quantificação do RNA viral, a determinação do genótipo viral é determinante na seleção da terapêutica, previsão da resposta, definição da duração do tratamento e ajuste da dosagem dos fármacos antivíricos (Anjo *et al.*, 2014; Scott & Gretch, 2007).

Conforme já foi mencionado, a hepatite C crónica é caracterizada por um processo contínuo de inflamação do fígado, que progride para a fibrose hepática (Saludes *et al.*, 2014). A fibrose hepática evolui, ao longo dos anos, para um estado de cirrose em 10 a 40% dos casos (Saludes *et al.*, 2014). As complicações do estágio final da cirrose hepática compreendem ascite, encefalopatia hepática, varizes esofágicas, carcinoma hepatocelular e, finalmente, insuficiência hepática (Saludes *et al.*, 2014).

A avaliação do grau de fibrose hepática utiliza-se também na monitorização da infeção crónica por VHC, dada a sua importância na decisão terapêutica e na avaliação da progressão da doença (Saludes *et al.*, 2014). O grau de fibrose hepática permite prever o risco de progressão da doença, detetar precocemente a cirrose hepática e outras complicações, tais como a descompensação hepática e o carcinoma hepatocelular (Saludes *et al.*, 2014). Nos últimos anos, têm sido verificados avanços significativos na avaliação do grau de fibrose com o desenvolvimento de métodos não-invasivos, tais como técnicas de imagiologia e de determinação de marcadores serológicos, tais como colagénio tipo IV, glicoproteínas e proteoglicanos (Saludes *et al.*, 2014). Ainda assim, nenhum dos métodos disponíveis, neste momento, é capaz de substituir completamente a biópsia hepática,

método de referência para o estadiamento da fibrose hepática (Saludes *et al.*, 2014). A biópsia é, contudo, um método dispendioso, demorado e invasivo, com possíveis complicações, e a sua interpretação está associada a um erro de amostragem e a uma variabilidade intra e inter-observador (Saludes *et al.*, 2014). Em consequência, muitas vezes, a biópsia hepática não permite avaliar com precisão a fase fibrose, não se demonstrando útil para a monitorização da progressão da doença (Saludes *et al.*, 2014).

8. OBJETIVOS DO ESTUDO

A infeção por VHC, endémica em inúmeros países, é uma doença de elevado impacto na sociedade, nos cuidados de saúde e na perspetiva do doente (Anjo *et al.*, 2014). Considerando o impacto da infeção por VHC a nível nacional, foi desenvolvido um estudo no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E com o intuito de contribuir para a revisão dos protocolos laboratoriais estabelecidos. Para o presente estudo foram definidos os seguintes objetivos:

- estudar a prevalência da infeção por VHC no CHEDV entre 2010 e 2013;
- caracterizar demograficamente os indivíduos com diagnóstico de infeção por VHC;
- reavaliar as metodologias de diagnóstico/monitorização da infeção por VHC utilizadas no CHEDV.

9. METODOLOGIAS DE ESTUDO

9.1 Caracterização do Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

O Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, E.P.E., com sede em Santa Maria da Feira, foi criado na sequência da publicação do Decreto-Lei n.º 27/2009, de 27 de Janeiro, com efeitos a partir de 1 de fevereiro de 2009. Este Centro Hospitalar agrupa o Hospital de São Sebastião (Santa Maria da Feira), o Hospital Distrital de São João da Madeira e o Hospital São Miguel (Oliveira de Azeméis) e é responsável pela prestação de cuidados de saúde a uma população de aproximadamente 340.000 habitantes, residentes nos concelhos de Santa Maria da Feira, Arouca, São João da Madeira, Oliveira de Azeméis, Vale de Cambra, Ovar e algumas freguesias de Castelo de Paiva.

9.2 Desenho de estudo

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

Com o intuito de caracterizar a prevalência da infeção por VHC e contribuir para a revisão dos protocolos laboratoriais estabelecidos no Centro Hospitalar entre o Douro e Vouga, foi desenvolvido um estudo observacional descritivo transversal.

A população em estudo foi constituída pelo total de inscrições no serviço de Patologia Clínica da Unidade de Santa Maria da Feira entre 2010 e 2013 (N= 643 926), tendo sido estudadas todas as inscrições para realização de um ou mais testes de diagnóstico/monitorização da infeção por VHC, nomeadamente *screening* serológico por CMIA no serviço de Patologia Clínica do Hospital São Sebastião, serologia confirmatória por INNO-LIA, diagnóstico molecular por RT-PCR e genotipagem no Centro Hospitalar de São João, E.P.E.

Estes testes constituem o fluxograma de diagnóstico/monitorização da infeção por VHC aplicado no CHEDV, conforme o apresentado na figura 5.

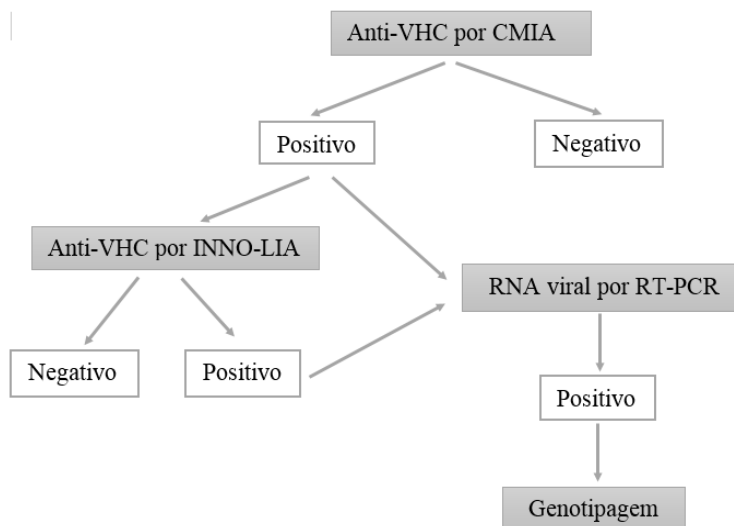


Figura 5. Fluxograma de diagnóstico/monitorização da infeção por VHC no CHEDV.

Para o estudo da prevalência da infeção por VHC, foi incluída uma amostra por cada indivíduo em cada ano, tendo sido utilizado como critério de diagnóstico de infeção ativa por VHC a presença de RNA viral, quantificado por RT-PCR. Caracterizou-se demograficamente os indivíduos com diagnóstico confirmado de infeção ativa por VHC. Foram ainda avaliados os resultados obtidos através das diferentes metodologias de diagnóstico laboratorial utilizadas, tendo sido selecionadas as inscrições para pesquisa de VHC por dois ou três métodos diferentes. Na figura 6 encontra-se representado o desenho de estudo.

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

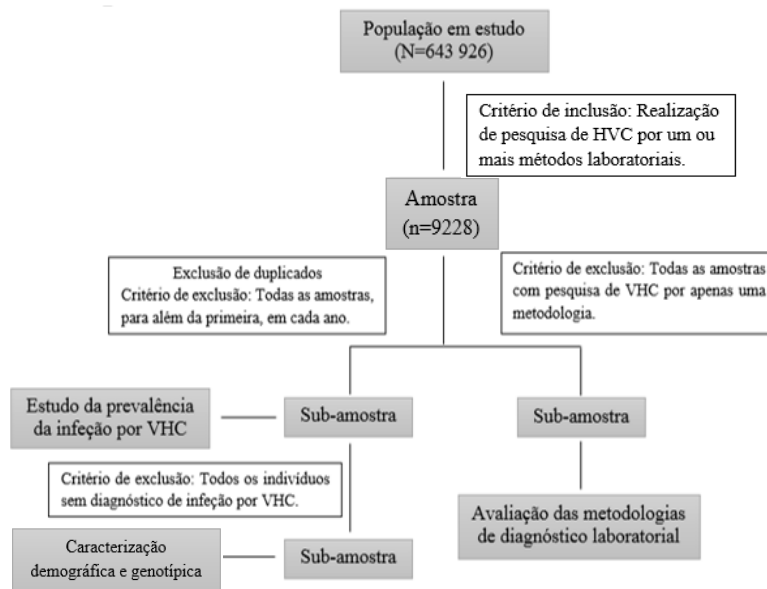


Figura 6. Desenho de estudo.

9.3 Caracterização das amostras

As inscrições em estudo corresponderam a amostras biológicas provenientes da Consulta Externa, Internamento, Urgência, Hospital de Dia, Bloco Operatório e Laboratório das 3 unidades de saúde que constituem o Centro Hospitalar entre Douro e Vouga, E.P.E, conforme o apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Proveniência das amostras.

	Hospital São Sebastião	Hospital São Miguel	Hospital Distrital de São João da Madeira	Total
Urgência	904	27	3	934
Internamento	1120	84	1	1205
Consulta externa	6245	170	202	6617
Bloco Operatório	5	--	1	6
Laboratório	393	10	18	421
Hospital de Dia	37	--	8	45
Total	8704	291	233	9228

O número total de inscrições para a realização de testes de diagnóstico/monitorização da infecção por VHC nos anos 2010, 2011, 2012 e 2013 foram, respetivamente, 3181, 2976, 1662 e 1409.

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

Das 9228 amostras inscritas entre 2010 e 2013, foi realizado screening serológico por CMIA em 8813, serologia por INNO-LIA em 115 e diagnóstico molecular por RT-PCR em 486 amostras (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das inscrições por metodologia de diagnóstico/monitorização da infeção.

	Nº de inscrições
<i>Screening serológico por CMIA</i>	8813
<i>Serologia por INNO-LIA</i>	115
<i>Diagnóstico molecular por RT-PCR</i>	486
<i>Total de inscrições</i>	9228

A idade dos indivíduos inscritos variou entre 0 e 92 anos de idade e cerca de 70% das inscrições diziam respeito a indivíduos do sexo feminino. O número de inscrições variou entre uma a sete inscrições por indivíduo.

9.4 Procedimentos e análise estatística

Procedeu-se à recolha dos dados laboratoriais referentes às inscrições para diagnóstico/monitorização da infeção por VHC entre 2010 e 2013, nomeadamente os resultados obtidos nos diferentes procedimentos de diagnóstico laboratorial, serviço de proveniência das amostras, idade e sexo dos indivíduos inscritos. A recolha de dados foi efetuada através do sistema informático de gestão laboratorial do serviço de Patologia Clínica do CHEDV (Appolo®, da Confidentia, Tecnologias Informáticas aplicadas, Lda.).

Os dados obtidos para as variáveis em estudo foram exportados para uma base de dados e procedeu-se à exclusão dos duplicados e aplicação dos critérios definidos para a amostra. Os dados estatísticos foram sujeitos a análise descritiva através do *software Statistical Package for the Social Sciences 21.0 (IBM SPSS 21.0 Statistics)*.

9.5 Questões éticas

A realização do estudo foi aprovada pela comissão de ética do Centro Hospitalar entre o Douro e Vouga, E.P.E, garantindo-se a confidencialidade da identidade e dados dos indivíduos em estudo e o cumprimento dos requisitos da legislação em vigor relativa à proteção dos mesmos.

10. RESULTADOS

Da totalidade das inscrições em estudo (n=9228) foram selecionadas 7938 (86%) amostras, tendo em consideração os critérios definidos para exclusão de duplicados.

Das 7938 amostras em estudo, 7646 (96%) tinham sido inscritas para realização de diagnóstico serológico por CMIA, 111 (1%) inscritas para realização de diagnóstico serológico por método confirmatório INNO-LIA e 389 (5%) inscritas para realização de diagnóstico molecular por RT-PCR. Os resultados obtidos, para os diferentes métodos de diagnóstico laboratorial encontram-se descritos nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Diagnóstico serológico por CMIA.

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Negativo	7408	93,3%
Positivo	238	3,0%
Não realizado	292	3,7%
Total	7938	100,0%

Das 7646 amostras inscritas para realização de testes serológicos através da metodologia CMIA, verificou-se serologia positiva em 238 amostras (3%). Destas, 33,2% (n=79) foram positivas em 2010, 27,3% (n=65) em 2011, 23,5% (n=56) em 2012 e 15,9% (n=38) em 2013.

Das 238 amostras positivas por CMIA, 108 (45%) realizaram serologia por método INNO-LIA e 87 (37%) efetuaram pesquisa de RNA viral por RT-PCR. A positividade da serologia nas restantes amostras (n=43) não foi confirmada por nenhuma destas metodologias.

Tabela 4. Diagnóstico serológico por INNO-LIA.

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Indeterminado	9	0,1%
Negativo	32	0,4%
Positivo	70	0,9%
Não realizado	7827	98,6%
Total	7938	100,0%

Da totalidade das amostras inscritas para realização de serologia por INNO-LIA (n=111), 62,2% (n=69) confirmaram o resultado positivo previamente obtido por CMIA. Verificou-se que as restantes amostras positivas por CMIA obtiveram serologias negativas ou indeterminadas pelo INNO-LIA. Uma das amostras positivas apenas foi inscrita para a realização de serologia por INNO-LIA, razão pelo qual não foi possível comparar o resultado obtido.

Tabela 5. Diagnóstico molecular por RT-PCR.

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Não detetado	181	2,3%
Positivo	208	2,6%
Não realizado	7549	95,1%
Total	7938	100,0%

Das 389 amostras inscritas para realização de diagnóstico molecular por RT-PCR, apenas 100 (26%) realizaram testes serológicos por CMIA anteriormente. Destas, apenas 64 confirmaram o diagnóstico de infeção ativa (64%). As restantes 289 amostras realizaram apenas a diagnóstico molecular por RT-PCR, das quais 144 obtiveram resultado positivo (49,8%).

10.1 Estudo da prevalência da infeção ativa por VHC

Das 7938 amostras em estudo, confirmou-se o diagnóstico de infeção ativa por VHC em apenas 208 (2,6 %) amostras. Em 172 (2,2%) verificou-se serologia positivo, no entanto sem confirmação através de diagnóstico molecular por RT-PCR.

A prevalência da infeção por VHC no Centro Hospitalar entre Douro e Vouga variou entre 2,1 e 3,4% no período compreendido entre 2010 e 2013, tendo-se verificado maior prevalência em 2012 (3,4%), de acordo com o apresentado na figura 7.

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

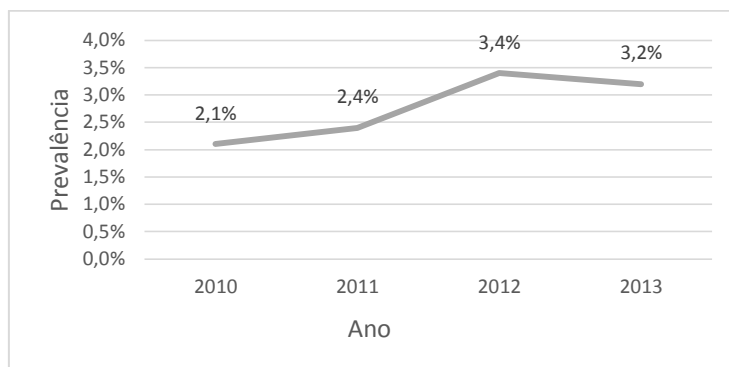


Figura 7. Prevalência da infecção por VHC 2010-2013.

Na tabela 6 encontram-se descritos os dados obtidos relativamente ao diagnóstico/monitorização de infecção ativa por VHC em 2010, 2011, 2012 e 2013.

Tabela 6. Diagnóstico/monitorização de infecção ativa por VHC 2010-2013.

	2010	2011	2012	2013	Total
<i>Negativo</i>	2519 (95,6%)	2403 (96%)	1422 (93,7%)	1214 (94,8%)	7558
<i>Positivo</i>	55 (2,1%)	61 (2,4%)	51 (3,4%)	41 (3,2%)	208
<i>Não realizado RT-PCR</i>	62 (2,4%)	40 (1,6%)	44 (2,9 %)	26 (2,0%)	172
<i>Total</i>	2636	2504	1517	1281	7938

No ano 2011, 45 das amostras positivas corresponderam a novos casos de infecção. As restantes (n=16) já haviam sido positivas no ano anterior. Em 2012, verificaram-se 31 novos casos de infecção. No ano 2013, 22 das 41 amostras positivas corresponderam a novos casos de infecção. As restantes já haviam sido positivas anteriormente.

10.2 Caracterização demográfica e genotípica

As 208 amostras com diagnóstico positivo de infecção ativa por VHC, correspondem a um total de 155 (75%) indivíduos. Sendo que destes, 59 (38%) apresentaram resultado positivo para pesquisa de VHC em mais do que um ano em estudo.

Da totalidade dos indivíduos com diagnóstico de infecção ativa por VHC, 23,2% (n=36) tratavam-se de indivíduos do sexo feminino e 76,8% (n=119) do sexo masculino.

A idade variou entre 8 e os 75 anos de idade, sendo a média de idades de 43,67. Aproximadamente 41% dos casos positivos (n=63) enquadravam-se na faixa etária dos 40

aos 50 anos e 30% (n=46) na faixa etária dos 30 aos 40 anos de idade. A distribuição dos indivíduos por faixa etária encontra-se representada na figura 8.

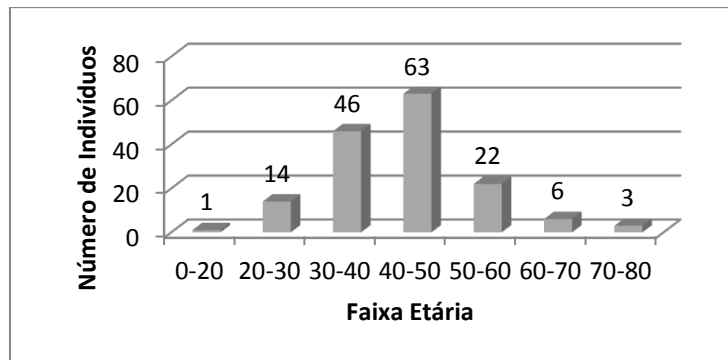


Figura 8.Distribuição dos indivíduos com infeção por VHC por faixa etária.

Da totalidade dos indivíduos com diagnóstico infeção ativa por VHC (n=155), foi efetuada genotipagem do vírus em 87 (56%) indivíduos. Na figura 9 encontra-se representada a distribuição dos genótipos VHC.

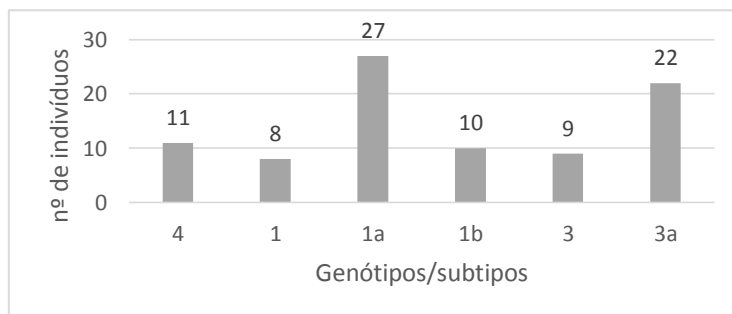


Figura 9.Distribuição dos genótipos VHC.

Verificou-se que o genótipo mais frequente é o genótipo 1 (n=45), sendo o subtipo 1a o mais frequente. Relativamente ao genótipo 3, é possível observar elevada frequência do subtipo 3a (n=22) nos indivíduos com genotipagem de VHC. Nas amostras analisadas apenas se encontraram os genótipos 1, 3 e 4.

10.3 Comparação das metodologias laboratoriais

Da totalidade das amostras em estudo, foram comparados os resultados obtidos pelas diferentes metodologias laboratoriais em 196 amostras, de acordo com os critérios anteriormente referidos. Destas, 88 com pesquisa de VHC por CMIA e confirmação por RT-PCR, 96 com pesquisa de VHC por CMIA e confirmação por INNO-LIA e 12 com resultados para pesquisa de VHC pelas 3 metodologias em estudo. Nas tabelas 7,8 e 9 é

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

possível observar os resultados obtidos para pesquisa de VHC através das diferentes metodologias.

Tabela 7. Comparação de resultados das metodologias CMIA e RT-PCR.

		RT-PCR			
		Não detetado	Positivo	Não realizado	Total
CMIA	Negativo	13	0	41	54
	Positivo	23	64	55	142
	Total	36	64	96	196

Da totalidade das amostras com serologia positiva por CMIA, 23 apresentaram resultado negativo para pesquisa de RNA viral, pelo que não podem ser consideradas infeções ativas. Em oposição, as restantes 64 amostras apresentaram um resultado positivo, indicativo de infeção ativa por VHC.

Tabela 8. Comparação dos resultados das metodologias CMIA e INNO-LIA.

		INNO-LIA				
		Indeterminado	Negativo	Positivo	Não realizado	Total
CMIA	Negativo	0	0	0	20	20
	Positivo	9	30	69	68	176
	Total	9	30	69	88	196

Da totalidade das amostras positivas por CMIA, verificou-se 30 resultados negativos e 9 resultados indeterminados por INNO-LIA, pelo que não se confirma o contato com o VHC.

Tabela 9. Comparação das metodologias RT-PCR e INNO-LIA.

		INNO-LIA				
		Indeterminado	Negativo	Positivo	Não realizado	Total
RT-PCR	Não detetado	1	0	3	30	34
	Positivo	0	0	8	56	64
	Não realizado	8	32	58	0	98
	Total	9	32	69	86	196

Das 196 amostras em estudo, apenas 12 realizaram serologia por INNO-LIA e diagnóstico molecular, tendo-se verificado em 3 amostras serologia positiva e pesquisa de RNA viral negativa, razão pelo que não se confirma o diagnóstico de infeção ativa.

11. DISCUSSÃO

Verificou-se que das 238 amostras positivas para pesquisa de anticorpos, apenas 37% (n=87) foram complementadas pela pesquisa e quantificação do ácido nucleico viral por RT-PCR e aproximadamente 18,1% (n=43) não foram confirmadas por nenhum dos métodos utilizados. De acordo com Norma 059/2011 da Direção-Geral da Saúde os testes moleculares para a pesquisa e quantificação de RNA do VHC devem ser realizados, em doentes com resultado positivo para a pesquisa de anticorpos anti-vírus da Hepatite C (Direção-Geral da Saúde, 2011) uma vez que se trata de um marcador de infeção ativa que reflete a replicação viral (Saludes *et al.*, 2014).

Da totalidade das amostras inscritas para realização de serologia por método confirmatório, 62,2% (n=69) confirmaram o resultado positivo previamente obtido por CMIA. Verificou-se que as restantes amostras positivas por CMIA obtiveram serologias negativas ou indeterminadas pelo método INNO-LIA, podendo considerar-se falsos-positivos. Este facto pode relacionar-se com a maior especificidade da técnica INNO-LIA, razão pelo qual é utilizado como método confirmatório da pesquisa de anticorpos anti-VHC (Kamili *et al.*, 2012).

Em 208 amostras (2,6%) confirmou-se diagnóstico de infeção ativa através da positividade da pesquisa de RNA viral por RT-PCR. No entanto, 172 das amostras com serologia positiva não realizaram pesquisa de RNA viral por RT-PCR, pelo que a percentagem de infeções ativas entre 2010 e 2013 poderá ter sido subestimada.

A prevalência da infeção ativa por VHC no CHEDV variou entre 2,1 e 3,4% no período compreendido entre 2010 e 2013, revelando-se superior à verificada a nível nacional (1-1,5%) (Anjo *et al.*, 2014). Apesar de elevada, a prevalência no CHEDV poderá apresentar-se subestimada uma vez que, tal como referido anteriormente, estima-se que em Portugal apenas 30% dos indivíduos infetados por VHC se encontrem diagnosticados (Anjo *et al.*, 2014). Por outro lado, a amostra em estudo foi constituída apenas pelos pacientes inscritos para realização de testes de diagnóstico/monitorização da infeção por

VHC, pelo que não é representativa de toda a população que acedeu ao CHEDV no período de estudo.

No que respeita a caracterização demográfica dos pacientes em estudo, verificou-se elevada frequência de indivíduos com infeção ativa por VHC com idade compreendida entre os 30 e os 50 anos (70,3%), sendo que o sexo masculino foi o mais afetado (76,8%). Os resultados obtidos vão de encontro ao observado num estudo de caracterização da população infetada por VHC, realizado em Portugal (Barra *et al.*, 2013). Este estudo, relata que 63% dos indivíduos em estudo apresentavam idade entre 30 e os 49 anos e que aproximadamente 65% pertenciam ao sexo masculino (Barra *et al.*, 2013).

O genótipo do VHC foi confirmado em 87 dos indivíduos com diagnóstico de infeção ativa por VHC. De acordo com a norma anteriormente referida, a genotipagem do VHC deve ser realizada, previamente à terapêutica baseada no interferão, em todos os doentes infetados por VHC (Direção-Geral da Saúde, 2011). A determinação do genótipo revela-se útil na adequação da dose e duração do tratamento e na previsão da probabilidade de resposta ao mesmo (Direção-Geral da Saúde, 2011). Verificou-se maior número de indivíduos infetados com o genótipo 1 (n= 45), sendo o subtipo 1a (n=27) o mais frequente. Foi possível observar uma elevada frequência (n=22) de utentes infetados com o subtipo 3a. De acordo com *European Association For the Study of the Liver* (EASL) o genótipo 1 é o genótipo mais prevalente em todo o mundo, mas os resultados observados não refletem o subtipo mais prevalente na Europa (1b) (EASL, 2013). O genótipo 3a é muito prevalente na população de indivíduos toxicodependentes na Europa, contudo este grupo está atualmente a sofrer um aumento da prevalência de infeções com o genótipo 4 (EASL, 2013). Os resultados obtidos são concordantes com o estudo anteriormente referido, que revela elevada frequência do genótipo 1 (65%) na população infetada por VHC e 25% de indivíduos infetados com genótipo 3 (Barra *et al.*, 2013).

A comparação dos resultados obtidos para a pesquisa de VHC através das 3 metodologias em estudo, permitiu verificar que em 23 amostras com serologia positiva por método CMIA se obteve resultado negativo para pesquisa de RNA do VHC por RT-PCR. Estes resultados podem indicar infeções prévias por VHC resolvidas/curadas, caracterizadas por níveis de RNA viral indetetáveis (Hajarizadeh *et al.*, 2013). A realização do teste molecular poderia ser substituída pela pesquisa do antigénio Core ou pelo teste de pesquisa simultânea de antigénio Core e anticorpo anti-VHC (Kamili *et al.*, 2012;

Tillmann, 2014). O teste do antígeno Core, dada a sua elevada especificidade, sensibilidade, facilidade de execução e menor custo, poderia ser útil na confirmação de infecção ativa e motorização da terapêutica sem necessidade de realizar o teste molecular (Tillmann, 2014), que apresenta inúmeras restrições técnicas e elevado custo (Kamili *et al.*, 2012; Saludes *et al.*, 2014).

Verificou-se ainda 30 resultados falsos positivos para a serologia por método de CMIA quando confirmada por INNO-LIA, devendo-se estes resultados à maior especificidade da técnica INNO-LIA (Kamili *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos sustentam a alteração à árvore de procedimentos de diagnóstico/monitorização da infecção por VHC aplicada no CHEDV, para o qual se propõe o seguinte algoritmo de diagnóstico (Figura 10).

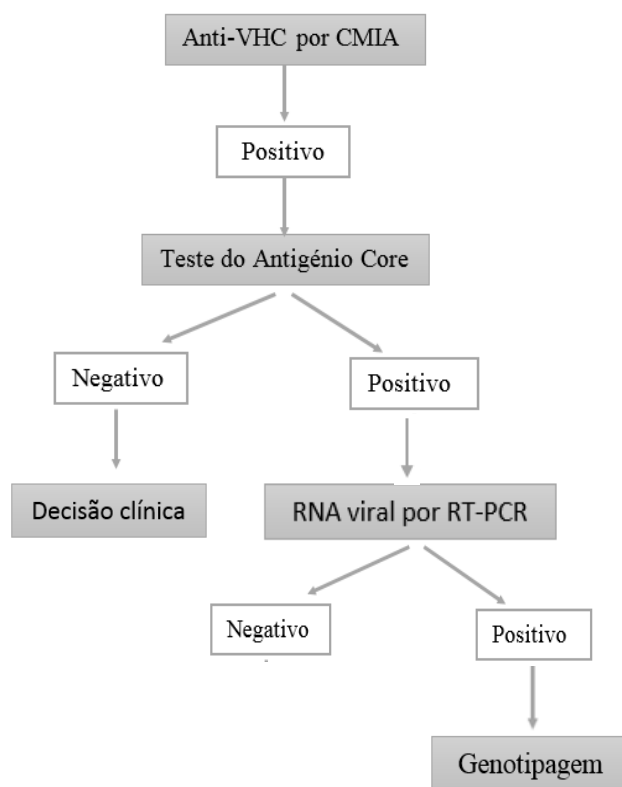


Figura 10. Proposta de algoritmo de diagnóstico/monitorização da infecção por VHC

Os resultados obtidos neste estudo no que respeita à prevalência da infecção ativa por VHC, apresentam algumas limitações tais como o facto de se tratar um estudo retrospectivo de amostras não aleatórias. Para além disso, este estudo não permite fazer inferências para a população das localidades servidas pelas unidades de saúde que

constituem o CHEDV, uma vez que a população que acede ao CHEDV é essencialmente constituída por indivíduos doentes. Por outro lado, a prevalência da infeção ativa por VHC no CHEDV é influenciada pela não realização da pesquisa de RNA viral em todas as amostras.

12.CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que a prevalência da infeção ativa por VHC no CHEDV de 2010 e 2013 variou entre 2,1 e 3,4%.

Observou-se uma elevada frequência de indivíduos com infeção ativa por VHC com idade compreendida entre os 30 e os 50 anos (70,3%), sendo o sexo masculino o mais frequente (76,8%).

Os resultados obtidos para a pesquisa de VHC pelas 3 metodologias em estudo sustentam a necessidade de rever e sistematizar a árvore de procedimentos de diagnóstico/monitorização da infeção por VHC no CHEDV, com intuito de reduzir o número de falsos-positivos. Estudos futuros devem incidir na avaliação do custo e impacto da implementação da pesquisa do antigénio Core e do teste de pesquisa simultânea de antigénio e anticorpo anti-VHC. A implementação destes testes permitiria ao clínico obter resultado por método direto em simultâneo com o resultado do teste serológico, sem necessidade de recorrer à serologia por método confirmatório e com tempo de resposta superior. Para além disso, a sua implementação contribuiria para redução do número de testes moleculares realizados em consequência de serologias positivas em indivíduos sem infeção ativa. Os testes serológicos devem continuar a ser utilizados no rastreio, diagnóstico e monitorização da infeção, contudo a sua positividade deve ser confirmada por métodos diretos com maior sensibilidade e especificidade.

Referências bibliográficas

- Anjo, J., Café, A., Carvalho, A., & Doroana, M. (2014). O impacto da hepatite C em Portugal. *GE Jornal Português de ...*, 21(2), 44–54. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0872817814000277>
- Barra, A., Barroso, H., Proença, L., & Barradas, A. (2013). Caracterização de uma população infectada com o Vírus da Hepatite C. *Revista Clínica Do ...*, 1(1), 11–18. Retrieved from <http://revistaclinica.hff.min-saude.pt/index.php/rhff/article/view/6>
- Bustin, S. (2005). Real-time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, 1117–1125.
- Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. (2006). HCV genome and life cycle. In T. SL (Ed.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (pp. 5–47). Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=zf4C0V_7Lu4C&oi=fnd&pg=PA5&dq=HCV+Genome+and+Life+Cycle&ots=7snLx5inDn&sig=ecgMOqwcwnaAFFBQ8qoGTUk9gsA
- Choo, Q., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., Bradley, D., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983439>
- Direção-Geral da Saúde. (2011). Norma da Direção-Geral da Saúde 059/2011: Prescrição para Estudo Laboratorial da infeção pelo Vírus da Hepatite C, 1–9.
- EASL. (2013). Normas de Orientação Clínica da EASL : Abordagem da Infeção pelo Vírus da Hepatite C Normas de Orientação Clínica, xxx.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). *Annual epidemiological report Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data 2013* (pp. 48–50).
- Feeney, E. R., & Chung, R. T. (2014). Antiviral treatment of hepatitis C, (April 2013).
- Felmlee, D. J., Hafirassou, M. L., Lefevre, M., Baumert, T. F., & Schuster, C. (2013). Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses*, 5(5), 1292–324. doi:10.3390/v5051292
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(9), 553–62. doi:10.1038/nrgastro.2013.107
- Irshad, M., Mankotia, D. S., & Irshad, K. (2013). An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(44), 7896–909.

- Kamili, S., Drobeniuc, J., Araujo, A., & Hayden, T. (2012). Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55 Suppl 1(Suppl 1), S43–8.
- Kim, C. W., & Chang, K.-M. (2013). Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical and Molecular Hepatology*, 19(1), 17–25.
- Kretzer, I. F., do Livramento, A., da Cunha, J., Gonçalves, S., Tosin, I., Spada, C., & Treitinger, A. (2014). Hepatitis C Worldwide and in Brazil: Silent Epidemic-Data on Disease including Incidence, Transmission, Prevention, and Treatment. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 827849.
- Li, H.-C., Ma, H.-C., Yang, C.-H., & Lo, S.-Y. (2014). Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(23), 7104–7122.
- Mitchell, R., Kumar, V., Abbas, A., & Fausto, N. (2006). Fígado e trato biliar. In *Robbins & Cotran Fundamentos de Patologia* (pp. 463–493).
- Park, S.-H., & Rehermann, B. (2014). Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*, 40(1), 13–24.
- Rivilla, A. P., & Moltó, M. A. (2013). *Pruebas serológicas y moleculares utilizadas en el diagnóstico y seguimiento de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC)* (pp. 1–19).
- Rosen, H. R. (2013). Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection, 123(10). doi:10.1172/JCI67714.In
- Saludes, V., González, V., Planas, R., Matas, L., Ausina, V., & Martró, E. (2014). Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(13), 3431–42.
- Scott, J. D., & Gretch, D. R. (2007). Molecular diagnosis of hepatitis C viral infection. *Clinician's Corner*, 297(7). Retrieved from <http://www.karger.com/Article/Abstract/150489>
- Shrivastava, S., Mukherjee, A., & Ray, R. B. (2013). Hepatitis C virus infection, microRNA and liver disease progression. *World Journal of Hepatology*, 5(9), 479–86.
- Sklan, E., & Glenn, J. (2006). HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (pp. 245–266).
- Tillmann, H. L. (2014). Hepatitis C virus core antigen testing: Role in diagnosis, disease monitoring and treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(22), 6701–6706. doi:10.3748/wjg.v20.i22.6701
- Velosa, J., Caldeira, L., Lopes, A., Guerreiro, L., & Marinho, R. (2012). Recomendações para a terapêutica da hepatite C. *Jornal Português de Gastreenterologia*, 19(3), 4–10.

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

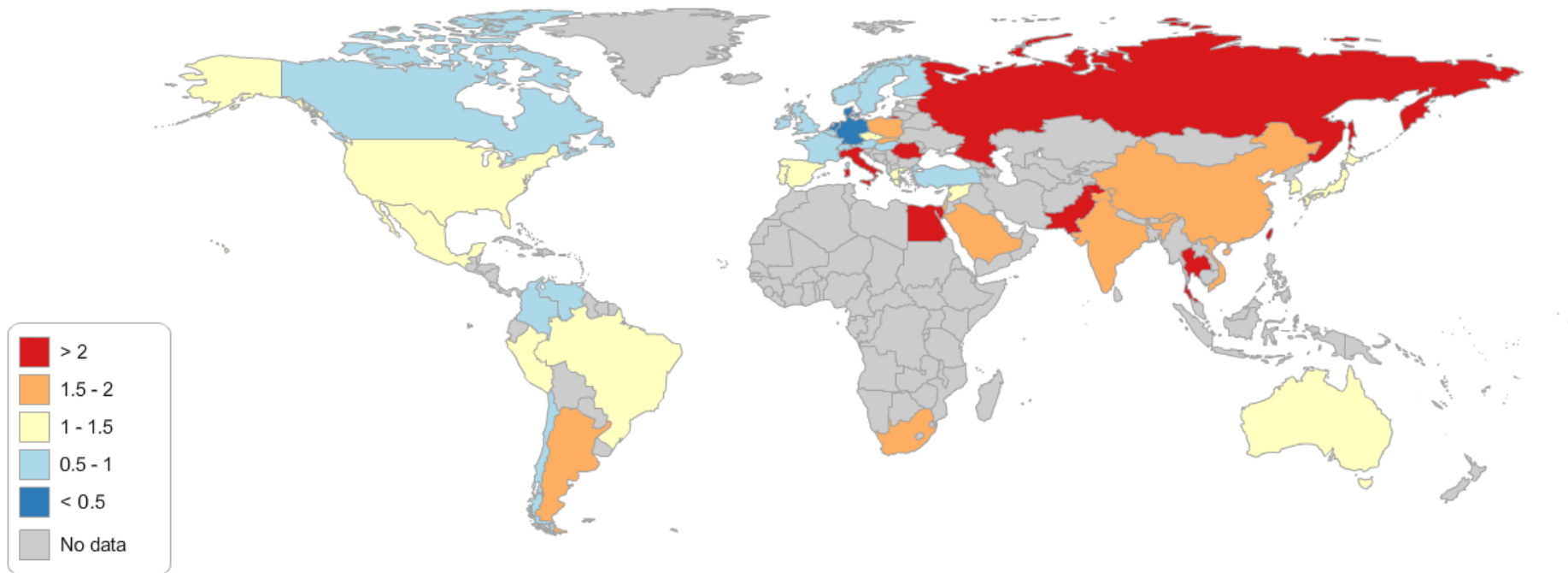
Vispo, E. (2012). Hepatitis C. In V. Soriano & J. González-Lahoz (Eds.), *XIII Curso de Biología Molecular para Clínicos* (pp. 122–134). Publicaciones Permanyer.

Zhu, Y., & Chen, S. (2013). Antiviral treatment of hepatitis C virus infection and factors affecting efficacy. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19(47), 8963–73.

Anexos

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

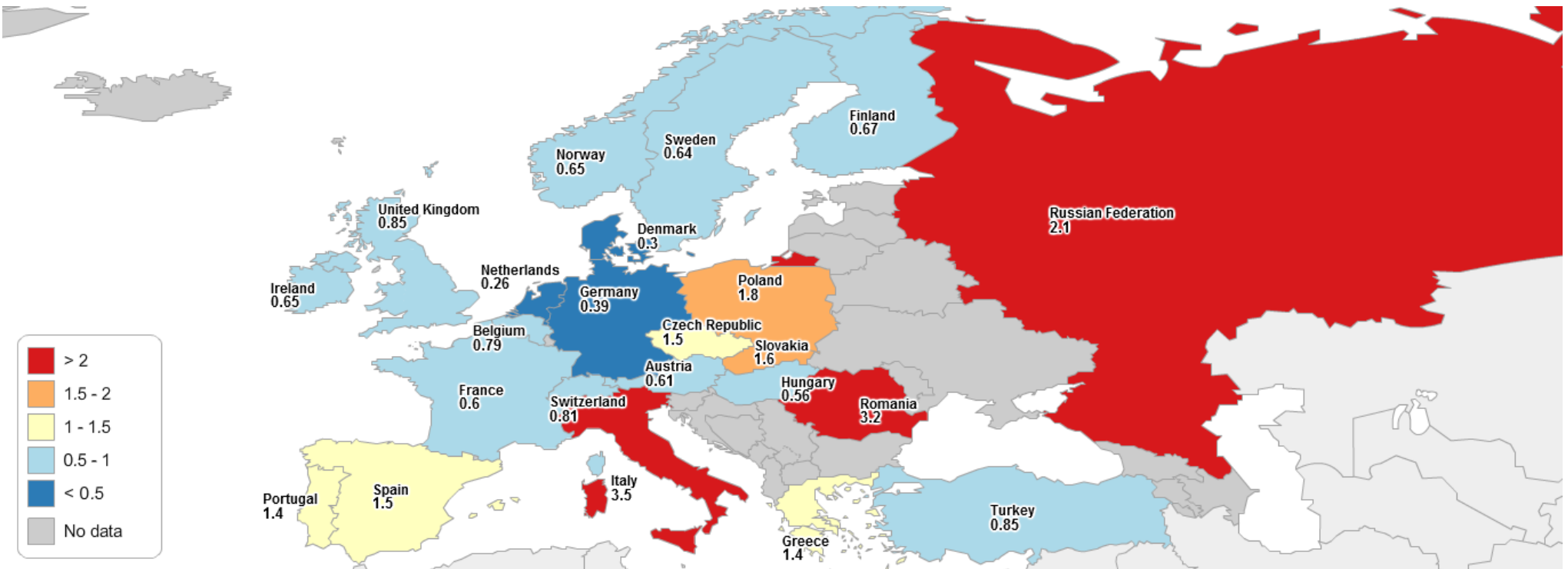
Anexo 1. Distribuição mundial da infeção por VHC (2012)



Fonte: Center for Disease Analysis. <http://www.centerforda.com/HepC/HepMap.html>

Hepatite C no Centro Hospitalar Entre o Douro e Vouga, E.P.E

Anexo 2. Prevalência da infeção por VHC na Europa (2012)



Fonte: Center for Disease Analysis. <http://www.centerforda.com/HepC/HepMap.html>