

Vanessa Cristina Martins Silva

**Estudo da infecção do vírus da Hepatite C em pacientes
infectados pelo HIV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Regina Célia Moreira

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Vanessa Cristina Martins.

Estudo da infecção do vírus da Hepatite C em pacientes infectados pelo HIV / Vanessa Cristina Martins Silva. – 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Regina Célia Moreira.

1. Coinfecção. 2. Vírus da Imunodeficiência Humana. 3. Hepatite C.

SES/CCD/CD-330/2016

Aos meus pais, avós, e toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu companheiro, Thiago, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz em todos os momentos.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Agradecimentos

À família e amigos. Todos serão responsáveis por cada sucesso obtido e cada degrau avançado da minha vida. Durante todos esses anos vocês foram pra mim um grande exemplo de força, de coragem, perseverança e energia infinita para nunca desistir diante do primeiro obstáculo encontrado. Vocês são e sempre serão meu maior porto seguro, meu maior exemplo de vitória, meus heróis e simplesmente aqueles que mais amo. Obrigada por estarem sempre comigo. Obrigada por participarem comigo durante essa caminhada.

À Prof. Dr. Regina Célia Moreira, minha orientadora e amiga, obrigada por compartilhar seu conhecimento, pela dedicação e confiança.

Ao SEAP, em especial à Dr. Maria Cássia Mendes Corrêa, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Às enfermeiras Camila e Ana Paula, e às auxiliares Marisa, Magali, Sandra e Val, pelo excelente trabalho realizado no SEAP e todo auxílio em sua execução.

Aos colegas de trabalho e amigos, Marcilio Lemos, Adriana Parise, Isabel Oba, Clóvis Constantino e Samira Calux, pela paciência, ensinamentos e orientação durante a realização do trabalho.

Ao programa de pós Graduação em ciências da Coordenadoria de controle de doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – PPG-CCD-SES-SP. Aos professores pela boa instrução fornecida, contribuindo para a obtenção desse título.

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido para a execução do trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram em cada etapa dessa conquista. Muito obrigada.

RESUMO

O vírus da hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana partilham a mesma forma de transmissão e, esse fato, explica a alta frequência de coinfeções. Os objetivos do presente estudo foram: determinar a frequência da infecção pelo HCV em um serviço de saúde de São Paulo; caracterizar os genótipos das cepas virais detectadas; monitorar episódios de flutuação de marcadores sorológicos e moleculares na população estudada e detectar possíveis casos de infecção oculta do HCV nos pacientes HIV positivos. Para isso, foi realizado um estudo com o envolvimento de 147 pacientes infectados pelo HIV atendidos no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS do Departamento de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SEAP), com amostras colhidas periodicamente. As amostras foram, inicialmente, triadas por sorologia baseada na detecção de anticorpos anti-HCV utilizando-se kits comerciais. As amostras foram, posteriormente, analisadas pelo teste de PCR em tempo real para a quantificação viral e sequenciamento para identificação genotípica, importante para a caracterização de cepas circulantes em nosso meio. Foram analisados prontuários para complementação dos dados obtidos. Foi observada frequência de exposição ao vírus HCV em 13,6% (20/147) da população de estudo, e 9,5% (14/147) possuíam carga viral detectada em pelo menos uma das coletas realizadas. Do total, 87,1% (128/147) mantiveram resultado negativo em ambos os testes e nas duas coletas. O genótipo predominante foi o 1, 69% (9/13), seguido pelo genótipo 3, 23% (3/13) e genótipo 2, 8% (1/13). Observou-se flutuação nos resultados dos testes sorológicos em 20% (4/20) dos pacientes. O presente trabalho forneceu dados epidemiológicos e clínicos importantes à saúde pública, alertando, principalmente, sobre a importância do monitoramento periódico de pacientes coinfectados.

Palavras chave: coinfeção, Hepatite C, vírus da imunodeficiência humana.

ABSTRACT

The hepatitis C virus and human immunodeficiency virus share the same transmission route and this fact explains the high frequency of coinfections. The objectives of this study were to determine the frequency of HCV infection in a health service in São Paulo; characterize the genotypes of the detected virus strains; monitor serologic and molecular floating episodes in the study population and detect possible cases of HCV infection hidden in HIV-positive patients. For this, we conducted a study involving 147 HIV patients attended at the Extension Service to Support Patients HIV / AIDS Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of São Paulo (SEAP), with samples taken periodically. The samples were initially screened by serology based on the detection of anti-HCV antibodies using commercial kits. Samples were subsequently analyzed by real time PCR test for viral quantification and sequencing for genotypic identification, important for the characterization of circulating strains in our environment. Records were analyzed to complement the data obtained. A frequency of 13.6% of the studied population was exposed to the HCV virus (20/147) and 9.5% (14/147) had viral load detected in at least one of the samples collected. Of the total, 87.1% (128/147) remained negative in both tests and both samples. The predominant genotype was 1, 69% (9/13), followed by genotype 3, 23% (3/13) and genotype 2, 8% (1/13). Fluctuation was observed in the results of serological tests in 20% (4/20) of patients. This work provided important epidemiological and clinical data to public health alerting mainly on the importance of periodic monitoring of coinfecting patients.

Keywords: coinfection, Hepatitis C, human immunodeficiency virus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
CDC: Centers For Disease Control and Prevention
cDNA: DNA complementar
CTA: Centros de Testagem e Aconselhamento
DAA: drogas de ação direta
DDAHV: Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais
DDT: dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA: ácido desoxiribonucléico
DNTPs: desoxiribonucleotídeo trifosfato
DO/CO: Relação densidade óptica/*cut off*
DST: doenças sexualmente transmissíveis
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
HBV: vírus da hepatite B
HCV: vírus da hepatite C
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HSH: homens que fazem sexo com homens
IB: immunoblot recombinante
IC: Intervalo de confiança
MgCl₂: cloreto de magnésio
mL: mililitros
mm³: milímetros cúbicos
N: normal
NCBI: National Center for Biotechnology Information
Ng: nanogramas
Nm: nanômetros
PCR: reação em cadeia da polimerase
Peg-IFN: Intérferon peguilado
Ph: potencial hidrogeniônico
Pmol/ µL: picomol por microlitro

qPCR: PCR em tempo real

RBV: ribavirina

RIBA: ensaio de Immunoblot recombinante

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: reação da transcriptase reversa

RVS: Resposta virológica sustentada

SEAP: Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS

SUS: Sistema Único de Saúde

TAE: Tris/Acetate/EDTA

TARV: tratamento antirretroviral

TCD4: linfócitos T CD4

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TMB: tetrametilbenzidina

UDI: usuários de drogas injetáveis

UI/mL: unidades internacionais por mililitro

°C: graus célsius

μL: microlitro

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Representação da estrutura do vírus da hepatite C

Figura 2: Representação esquemática do genoma do vírus da Hepatite C.

Figura 3: Instruções do fabricante (Life Technologies®) para análise da quantificação de fragmentos de DNA.

Figura 4: Apresentação das características dos pacientes por faixa etária por gênero. Acima, faixa geral, à esquerda, grupo de pacientes do sexo masculino e a direita, sexo feminino. Abaixo divisão do grupo apenas pelo gênero (F: feminino; M: masculino).

Figura 5: Resultado final dos ensaios de sorologia e qPCR realizados em ambas as amostras.

Figura 6: Distribuição de genótipos encontrados na população de estudo.

Figura 7: Relação entre os resultados de exames do paciente CO-52 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

Figura 8: Relação entre os resultados de exames do paciente CO-88 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

Figura 9: Relação entre os resultados de exames do paciente CO-137 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

Figura 10: Relação entre os resultados de exames do paciente CO-213 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

Quadro 1: Sequência correspondente de cada um dos “primers”, utilizados na reação de PCR (Life Technologies®).

Quadro 2: Sequência de ciclagem para processamento da amplificação do material genético.

Tabela 1: Interpretações dos resultados de sorologia obtidos pelo ensaio murex anti-HCV-*version 4.0*[®].

Tabela 2: Interpretações dos resultados da qPCR obtidos pelo equipamento *m2000rt*.

Tabela 3: Resultados dos casos discordantes entre os ensaios das amostras da primeira e segunda coleta.

Tabela 4: Comparação dos ensaios de sorologia, qPCR e contagem de linfócitos T CD4 entre as amostras positivas da primeira e segunda coleta.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	12
1.1.Vírus da hepatite C.....	15
1.1.1.Características estruturais e moleculares.....	15
1.1.2.Replicação do HCV.....	17
1.1.3.História natural da doença.....	18
1.1.4.Definições da infecção pelo HCV	19
1.2.Coinfecção (HIV/HCV).....	19
1.3.Métodos laboratoriais.....	21
1.4.Tratamento da coinfeção.....	23
2.OBJETIVOS.....	24
3.JUSTIFICATIVA.....	25
4.CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	26
4.1.Aspectos éticos.....	26
4.2.Pacientes e amostras clínicas.....	26
4.2.1.Critérios de seleção de pacientes.....	27
4.2.1.1.Critérios de inclusão.....	27
4.2.1.2.Critérios de exclusão.....	27
4.3.Diagnóstico sorológico.....	28
4.3.1.Princípio do ensaio.....	28
4.3.2.Procedimento.....	28
4.4.PCR em tempo real quantitativo.....	29
4.4.1.Princípio do ensaio.....	29

4.4.2.Procedimento.....	30
4.4.2.1.Preparação das amostras.....	30
4.4.2.2.Reação de amplificação.....	31
4.4.2.3.Interpretação de resultados.....	31
4.5.RT PCR “in house” e sequenciamento viral para genotipagem do HCV.....	32
4.5.1.Extração do RNA viral.....	32
4.5.2.Síntese do DNA complementar – cDNA.....	32
4.5.3.”Nested” PCR “in house”.....	33
4.5.4.Identificação e quantificação dos fragmentos (5’NCR)	34
4.5.5.Sequenciamento viral.....	35
4.5.5.1.Reação de sequenciamento por “cycle sequencing”.....	35
4.5.5.2.Precipitação das amostras após “cycle sequencing”, desnaturação e aplicação no gel, das amostras amplificadas para a região 5’NCR.....	36
4.5.6.Análise das Sequências para Genotipagem.....	36
4.6 Análise de prontuários.....	37
5.RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

As células hepáticas podem sofrer processo inflamatório devido a diversos fatores, como alterações genéticas, disfunções metabólicas, exposição a agentes infecciosos, medicamentos ou substâncias tóxicas, ocasionando hepatite. Esta doença está relacionada à perda de função do tecido hepático, levando a graves complicações na saúde do indivíduo (Pannain, 2001).

Dentre os fatores descritos, a causa mais comum é a infecção viral, que pode ser assintomática ou decorrer desde manifestações clínicas inespecíficas e doença hepática aguda autolimitada, a infecções crônicas. Até o momento, cinco tipos de vírus foram descritos na literatura, sendo os vírus das hepatites A, B, C, D e E (Ferreira & Silveira., 2004).

O carcinoma hepatocelular está associado com a cirrose hepática em mais de 80% dos casos de infecção, relacionada principalmente às infecções crônicas por vírus da hepatite B (HBV) e/ou vírus da hepatite C (HCV) (Guyot et al., 2006).

A principal via de transmissão do HCV é a sanguínea e, sendo assim, estudos apontam para alta frequência de pacientes infectados pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) também coinfectedos pelo HCV (Lacombe & Rockstroh, 2012).

Tendo em vista o aumento na expectativa de vida dos pacientes infectados pelo HIV resultante da terapia antirretroviral, as pesquisas de coinfeções, estudos epidemiológicos, monitoramento do padrão das infecções e pesquisa de resistência viral são importantes para diminuir a transmissão e garantir o diagnóstico mais rápido e eficaz (Dore & Cooper, 2001).

A hepatite C é uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo. Existe grande variação na prevalência da infecção pelo vírus de acordo com a região geográfica estudada, refletindo não só características epidemiológicas distintas entre as populações, mas

diferenças nas metodologias utilizadas para a realização das estimativas (Martins et al., 2011).

Estima-se que 130 a 150 milhões de indivíduos possuem infecção crônica pelo HCV, com risco de desenvolver as complicações da doença. O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10% (WHO, 2015).

O HCV é transmitido fundamentalmente por vias parenterais. Transfusões de sangue com triagem e coleta inadequadas são as vias mais documentadas de transmissão parenteral (Oliveira-Filho et al., 2010). Outras formas de infecção assim como sexual e vertical foram reportadas, porém de forma esporádica e em grupos específicos. (Terrault et al., 2012; Sereno et al., 2012). O compartilhamento de acessórios utilizados no uso de drogas é a forma mais comum de transmissão do HCV mundialmente. Estima-se que 60% dos novos casos da infecção registrados anualmente estão relacionados com o uso de drogas ilícitas, principalmente drogas injetáveis (Oliveira-Filho et al., 2013).

O Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde (DDAHV) estima aproximadamente 734 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil no ano de 2014, correspondendo à prevalência de 0,4%. Entre os indivíduos com 13 anos ou mais de idade, a principal via de transmissão é a sexual. Entre os homens, observa-se um predomínio da categoria de exposição heterossexual; porém, há uma tendência de aumento na proporção de casos em homens que fazem sexo com homens (HSH) nos últimos dez anos, passando de 34,6% em 2004 para 43,2% em 2013. A proporção de usuários de drogas injetáveis (UDI) vem diminuindo ao longo dos anos em todo o Brasil, com tendência significativa de queda.

Estima-se que a taxa de prevalência da infecção pelo HIV, na população de 15 a 49 anos mantém-se estável em 0,6% desde 2004, sendo 0,4% entre as mulheres e 0,8% entre os homens. Em relação aos grupos populacionais em situação de maior vulnerabilidade, com mais de 18 anos, estudos realizados em 10 municípios brasileiros, entre 2008 e 2009, estimaram taxas de prevalências de HIV de 5,9% entre usuários de drogas

ilícitas, de 10,5% entre homens que fazem sexo com homens, e de 4,9% entre mulheres profissionais do sexo (Ministério da Saúde, 2011).

O Brasil tem como característica uma epidemia estável e concentrada em alguns subgrupos populacionais em situação de vulnerabilidade. Foram notificados 608.230 casos de AIDS, acumulados de 1980 a junho de 2011, sendo 397.662 (65,4%) no gênero masculino e 210.538 (34,6%) no gênero feminino. A diferença da porcentagem entre os gêneros vem diminuindo ao longo dos anos. Em 1985, para cada 26 casos entre homens havia um caso entre mulheres. Em 2010, essa relação foi de 1,7 homens para cada mulher (Ministério da Saúde, 2011).

A primeira definição de caso de AIDS adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil foi em 1987, utilizando como referência a definição elaborada em 1985 pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Essa definição, denominada de Critério CDC modificado, era fundamentada em evidências laboratoriais de infecção pelo HIV e pela presença de doenças indicativas de imunodeficiência utilizando-se métodos diagnósticos definitivos (Ministério da Saúde, 2004).

Desde então, houve sucessivas revisões com o objetivo de adequar os critérios às condições diagnósticas laboratoriais e ao perfil de morbidade do País.

Um grande avanço na definição brasileira para aumentar a sensibilidade, foi a inclusão de um marcador laboratorial de imunossupressão, baseado na contagem de linfócitos T CD4 (menor do que 350 células/mm³), conferindo maior sensibilidade aos critérios brasileiros (Ministério da Saúde, 2004).

Ressalta-se que o CDC estabelece como critério para definição de caso um ponto de corte na contagem de linfócitos T CD4 em 200 células/mm³ (Ministério da Saúde, 2004).

O presente estudo discorre sobre o diagnóstico das infecções pelo vírus da hepatite C em indivíduos infectados pelo HIV devido à importância epidemiológica dos casos de coinfeção HIV/HCV.

1.1. Vírus da hepatite C

A hepatite C é uma doença viral infecciosa, contagiosa, causada pelo HCV, conhecido anteriormente como agente da “hepatite não A não B”, caracterizado em 1989 por Choo e colaboradores.

1.1.1. Características estruturais e moleculares

O HCV é um vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, podendo apresentar-se como uma infecção oligo/assintomática ou sintomática. É uma partícula esférica, com um diâmetro entre 55 e 65 nm, revestida externamente por um invólucro lipídico de origem celular, no qual estão ancoradas as glicoproteínas virais. No interior, o nucleocapsídeo constituído pela proteína do core protege o RNA genômico viral (Lindenbach & Rice, 2005).

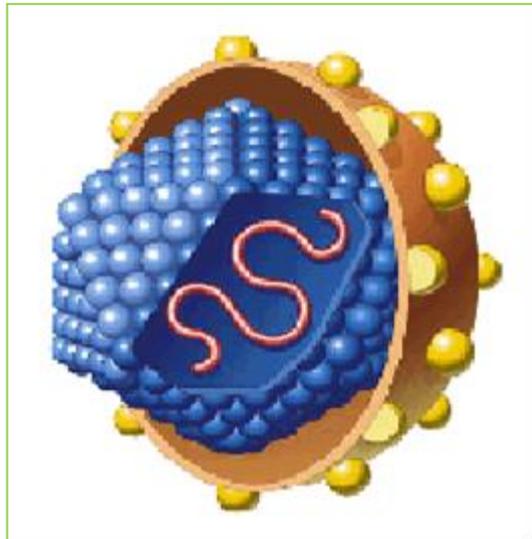


Figura 1: Representação da estrutura do vírus da hepatite C

Fonte: Jorge, 2003.

O genoma do HCV é constituído de fita simples de RNA (ácido ribonucléico) de polaridade positiva, e de 9.600 nucleotídeos com regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3'. Possui um único código aberto de leitura que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.000

aminoácidos, que será clivada com o auxílio de proteases virais e do hospedeiro (Suzuki et al., 2007).

Os genótipos do HCV são classificados de 1 a 7, sendo ainda divididos em ao menos 67 subtipos identificados por letras (Smith et al., 2014).

Apresentam cerca de 30% da diversidade de sequências de nucleotídeos dos seus genomas. Como a resposta ao tratamento é dependente do genótipo, este se mostra de extrema relevância na predição da resposta virológica sustentada (RVS) (Ullah et al., 2012).

Em média, 80% das pessoas que se infectam não conseguem eliminar o vírus, evoluindo para formas crônicas. (Ministério da saúde, 2005).

As partículas do HCV são constituídas pelas proteínas do envelope E1 e E2, proteínas que apresentam regiões hipervariáveis; as proteínas do nucleocapsídeo “c”, que é uma proteína super conservada e altamente imunogênica e a proteína “p7” cuja função é conhecida por formar canais iônicos em membranas celulares (Griffin et al., 2003)

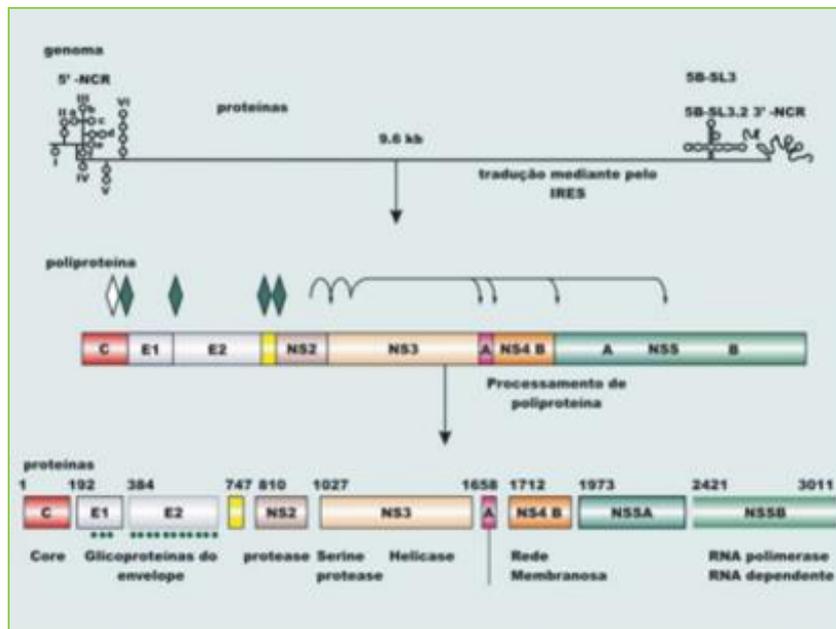


Figura 2 - Representação esquemática genoma do vírus da Hepatite C.

Fonte: Moradpour et al., 2007.

Por ser um vírus RNA pode sofrer várias mutações importantes de resistência, seja por falta do sistema de correção durante o processo de replicação do genoma, por pressão do sistema imune do hospedeiro, ou por fatores do próprio vírus. Essas mutações recorrentes dificultam a elaboração de vacinas eficazes para a prevenção da infecção e interferem na eficácia das novas drogas utilizadas, as chamadas drogas de ação direta (DAA). A ocorrência das mutações virais deve ser identificada por estudos moleculares fornecendo assim, informações epidemiológicas e principalmente, alternativas de novos tratamentos (Choo & Pinho, 2003).

1.1.2. Replicação do HCV

O período de incubação do HCV apresenta média de 5 a 10 semanas, podendo haver uma variação de 2 semanas a até 4 meses (Pybus et al., 2001).

Como o HCV possui tropismo pelas células hepáticas (hepatócitos), a infecção de células distantes desse sítio depende de receptores específicos ou de enzimas tecidos-específicas que influenciam nesse tropismo (Filho, 2006).

O vírus penetra na célula por endocitose, onde o RNA viral é liberado, entrando em replicação e passando a comandar os principais mecanismos celulares do hospedeiro. Ocorre a síntese da fita negativa do RNA, com posterior síntese da nova fita positiva para que a replicação possa prosseguir. A tradução do genoma viral ocorre dentro dos ribossomos e as proteínas são processadas no retículo endoplasmático. Em seguida, a montagem do vírus ocorre no citoplasma, onde as proteínas do *core* envolvem o ácido nucléico e o reúnem às proteínas do envoltório, formando os vírions. A saída desse vírion ocorre com a morte celular ou por exocitose (Filho, 2006).

Os vírus são liberados na circulação, disseminados portanto, por via sanguínea, onde são envoltos por um complexo lipoprotéico. Ocorre uma infecção persistente, com síntese e eliminação contínua de vírus, produzindo

lesões celulares cumulativas que demoram a ter expressão clínica (Filho, 2006).

Geralmente os pacientes continuam com viremia alta por um longo período, desta forma seguem com uma infecção assintomática evoluindo a formas crônicas (Levinson & Jawetz, 2005).

1.1.3. História natural da doença

O vírus da hepatite C raramente causa infecção aguda sintomática. Devido a uma série de fatores, o delineamento da história natural a longo prazo torna-se difícil (Davis, 1997). Os sintomas são geralmente inespecíficos e autolimitados, portanto, dificilmente a infecção é diagnosticada na fase inicial (Chen & Morgan, 2006; Focaccia, 2013).

Dessa forma, a história natural do HCV é marcada por uma evolução silenciosa; geralmente a doença é diagnosticada após anos de infecção. Os sinais e sintomas são comuns a outras doenças crônicas do fígado e costumam manifestar-se apenas em fases muito avançadas (Mandell, et. al., 2010). Essas características contribuem para os altos números de pacientes assintomáticos em todo o mundo, afetando negativamente o diagnóstico da infecção (Ministério da Saúde, 2015).

A agressão hepatocelular causada pelo vírus C desencadeia um processo degenerativo discreto e progressivo, levando a fibrose hepática, a cirrose e câncer hepático após anos de infecção (Barone & Araújo, 2010). Em fases mais avançadas, pode evoluir a óbito (Mandell, et. al., 2010). Estima-se que aproximadamente 350.000 mortes por ano são reportadas em decorrência da infecção pelo HCV (Centers for Disease Control and Prevention, 2014).

1.1.4. Definições da infecção pelo HCV

A infecção aguda por HCV é determinada nos seis primeiros meses, pela presença de HCV-RNA no soro do paciente. Após seis meses de replicação viral, por definição, o paciente entra na fase crônica da infecção. Como a fase aguda é comumente assintomática, dificilmente o diagnóstico é concluído (Vogel et al., 2011).

Já a infecção oculta por HCV tem sido identificada pela presença do HCV-RNA no soro de pacientes com resultados negativos para anticorpos anti-HCV, após a fase aguda. Entretanto, outra forma de se caracterizar esse tipo de infecção, é pela ausência de anticorpos em indivíduos sabidamente infectados cronicamente sem presença do HCV-RNA no soro. Seja qual for o tipo de caracterização de infecção oculta pelo HCV, esses pacientes poderão transmitir a doença aos seus contatos e o diagnóstico tardio poderá dificultar o tratamento (Quiroga, 2009).

O indivíduo infectado pelo vírus C apresenta sorologia anti-HCV reagente por um período indefinido, porém, esse padrão não distingue as fases da doença, sendo necessária a realização dos testes moleculares para a definição de hepatite aguda, crônica, ou até a resolução do quadro (Ministério da saúde, 2009).

Alguns estudos demonstram que uma considerável porcentagem de pacientes que sofriam de doença hepática de etiologia desconhecida possuía infecção oculta por HCV (Bokharaei-Salim et al., 2011).

1.2. Coinfecção (HIV/HCV)

Sendo o sangue a principal via de transmissão do HCV, importante via também para o HIV, estudos mostram que um entre quatro pacientes portadores do HIV está também, coinfectedo pelo HCV (Lacombe K & Rockstroh, 2012).

Estima-se que 38 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo HIV, e dessas, de 4 a 5 milhões são portadoras também do

HCV. (Wolff et al., 2010).

Estudos mostram que a prevalência do anti-HCV entre HSH varia entre 0 e 23%, mostrando-se maior do que entre doadores de sangue. Entretanto, muitos desses estudos não incluem informações de usuários de drogas injetáveis (Van de Laar et al., 2010). Entre HSH não usuários de drogas a prevalência varia entre 1 e 7 % enquanto que, entre os HSH que já tiveram histórico de uso, varia de 25 a 50%. Além disso, a prevalência do anti-HCV em indivíduos HIV reagente é consideravelmente maior, variando de 3 a 39%, quando comparados com indivíduos HIV não reagente, que pode variar entre 0 a 19% (Van de Laar et al., 2010).

No Brasil, aproximadamente 0,5% da população adulta está infectada pelo HIV e, entre aqueles que compareceram aos serviços públicos de saúde para atendimento ambulatorial, 16% estão também coinfectados com o HCV. Dos indivíduos atendidos nos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) 42% apresentavam-se coinfectados, assim como 54% dos atendidos em clínicas de doenças infecciosas (Wolff et al., 2010).

O HCV é detectado entre 4 e 8% em crianças nascidas de mães infectadas e a coinfeção HIV/HCV aumenta o risco de infecção da criança por ambos os vírus e está relacionado com elevada carga viral materna. (Lacombe & Rockstroh, 2012)

Estudos têm demonstrado que a infecção pelo HIV em pessoas também infectadas por HCV resulta em uma progressão mais rápida para doença hepática, se comparados com aquelas infectadas apenas por um agente etiológico (Mendes-Corrêa, 2000). Como resultado, o HCV pode ser considerado uma infecção oportunista em pessoas infectadas pelo HIV, embora não seja considerada uma doença definidora de AIDS (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Ao longo dos últimos anos, um grande número de casos de hepatite C aguda tem sido reportado mundialmente entre indivíduos infectados pelo HIV (Vogel et al., 2011).

Estudos observacionais demonstram o alto índice de pacientes infectados pelos vírus HIV e HCV e evidenciam a dificuldade no diagnóstico

sorológico, já que os indivíduos infectados pelo HIV podem ter uma redução significativa nos anticorpos, os quais são alvos desses ensaios (Mendes-Corrêa, 2000).

Considerando os pacientes imunossuprimidos, a utilização de testes sorológicos é considerada um método diagnóstico, porém, como a resposta imunológica pode ser alterada, a PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real é um importante método para confirmação do diagnóstico (Carvalho et al., 2009).

1.3. Métodos laboratoriais

Para o diagnóstico laboratorial do vírus HCV é comumente realizado o teste de sorologia, o qual detecta anticorpos anti-HCV, porém, os anticorpos específicos contra o vírus podem demorar até 6 semanas para serem detectados no sangue dos pacientes. A investigação inicial da infecção pelo HCV consiste na realização desses exames imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos específicos contra proteínas virais, sendo de 3ª geração o teste de triagem sorológica, com alta sensibilidade e especificidade. Embora esse teste seja muito sensível para rastreamento do HCV, seu resultado ainda pode mostrar-se falso negativo no período de “janela imunológica” (National Institutes of Health, 2002).

Os resultados falsos negativos também podem ocorrer em indivíduos com algum tipo de comprometimento do sistema imunológico, o que inclui pacientes infectados pelo HIV, já que nesses pacientes pode ocorrer uma queda dos anticorpos totais, impedindo que estes sejam detectados nos exames sorológicos (Moreira, 2003; Mendes-Corrêa, 2000).

Estudo de Shah e colaboradores (2003) desenvolveu um teste imunoenzimático que além de detectar anticorpos, também detectam os antígenos virais circulantes, os quais aparecem em grande número na fase aguda da doença, diminuindo o período de janela imunológica e também reduzindo o número de resultados indeterminados.

As reações falsas positivas também podem ocorrer, embora com

menor frequência, devido à alta sensibilidade dos ensaios disponíveis. A confirmação de um resultado positivo para ELISA é realizada por testes complementares como o Immunoblot recombinante (IB), mais específicos e geralmente empregados para verificar falso positivo em indivíduos com baixo risco de infecção (Kim et al., 1999). Porém, o teste do IB não tem sido mais utilizado, devido ao seu alto custo e à baixa utilidade na prática clínica.

Para o diagnóstico laboratorial, além dos métodos sorológicos, é necessária também a realização de métodos moleculares. A PCR em tempo real (qPCR) constitui um método o qual detecta casos em que ainda não houve a soroconversão, mas pode haver o vírus circulante, como também é útil no monitoramento da resposta ao tratamento através da quantificação da carga viral (Zein, 2000).

A PCR é uma das técnicas de biologia molecular mais utilizada, que amplifica parte do genoma do vírus sendo extremamente sensível. Este teste, uma vez que detecta o genoma viral, permite confirmar a infecção pelo HCV, podendo ser qualitativo para detecção do vírus ou quantitativo para quantificação da carga viral circulante (Germer & Zein, 2001).

Os testes moleculares qualitativos eram utilizados principalmente para indivíduos com sorologia positiva para confirmação de diagnóstico. As técnicas quantitativas eram utilizadas posteriormente para predição do prognóstico e evolução clínica da doença, considerando a terapia (Ballardini et al., 1997). Atualmente, novas diretrizes orientam a utilização dos testes quantitativos. A PCR em tempo real é utilizada não só para detecção, mas também para a quantificação viral, otimizando os resultados, já que promovem o fechamento do diagnóstico e acompanhamento da evolução do paciente (European Association For The Study Of The Liver, 2011).

Outro método molecular importante é a genotipagem, capaz de identificar diversos genótipos, subtipos e populações mistas do HCV. Essa caracterização apenas complementa a avaliação clínico-laboratorial em relação à estratégia para o tratamento da infecção (Ministério da saúde, 2015).

Em relação ao HIV, devido à diversidade genética e à frequência de mutações, o padrão de resistência aos antirretrovirais pode ser determinado através de testes de resistência, especialmente o sequenciamento, o qual permite a detecção de mutações pontuais do genoma viral, sendo um grande aliado na resposta ao tratamento e monitoramento das combinações entre as drogas administradas (Ferreira, 2011).

1.4. Tratamento da coinfeção

Antes do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas vigente, o tratamento da hepatite C baseava-se no uso de interferon peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV) (Ministério da Saúde, 2011). Após revisão, disponibilizou-se a adição dos inibidores de protease de primeira geração (boceprevir e telaprevir) para pacientes infectados apenas pelo HCV e com genótipo 1 do vírus (Ministério da saúde, 2013). Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos e do longo tempo de experiência com estes tratamentos, os resultados não são considerados totalmente satisfatórios, pois ainda ocorre o uso de medicamentos injetáveis, com um longo período de terapia e baixo índice de resposta virológica sustentada (RVS) (Ministério da Saúde, 2015).

O Ministério da Saúde publicou em 2015 o novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Hepatite C e coinfeções, elaborado pelo Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. O protocolo clínico proposto pelo DDAHV prevê a utilização de uma combinação de antivirais de última geração (sofosbuvir, daclatasvir e simeprevir) para o tratamento da hepatite C crônica, priorizado para pacientes em fases mais avançadas da doença ou condição que demande assistência imediata como coinfeção HCV/HIV, manifestações extra-hepáticas, insuficiência hepática, pré e pós-transplante de fígado. Com isso, alguns segmentos que não eram beneficiados poderão ser tratados, como é o caso dos indivíduos coinfectados (Ministério da Saúde, 2015).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Conhecer a frequência da infecção pelo HCV em pessoas infectadas pelo HIV em um serviço de saúde na cidade de São Paulo.
- 2) Caracterizar os genótipos das cepas de HCV detectadas.
- 3) Monitorar episódios de flutuação dos marcadores sorológicos e moleculares na população estudada.
- 4) Detectar possíveis casos de infecção oculta do HCV nos pacientes HIV positivos.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos demonstram que a coinfeção HCV/HIV é bastante frequente em pacientes portadores do HIV em todo mundo, e essa situação pode contribuir para a progressão da doença hepática crônica, o que leva à necessidade do rastreamento desses casos. Além disso, a infecção pelo HIV pode ocultar casos de infecção pelo HCV, devido à queda na concentração dos anticorpos totais, quando o marcador analisado for apenas os anticorpos. Dessa forma, os pacientes infectados pelo HIV tornam-se potenciais transmissores do vírus HCV, com a possibilidade de ocorrer viremia mesmo na ausência de anticorpos.

Além disso, os pacientes infectados pelo HCV, quando identificados e tratados na fase aguda da infecção, têm menor chance de progressão da doença, podendo-se avaliar a melhor opção de tratamento e seguimento nos pacientes coinfectados.

Consideramos, assim, esse estudo de grande importância epidemiológica e para a saúde pública, fornecendo dados de prevalência da coinfeção em um serviço de saúde especializado no atendimento aos pacientes HIV positivos, apresentando medidas de prevenção; disponibilizando o diagnóstico precoce da Hepatite C, favorecendo o tratamento na fase inicial da infecção e caracterizando os genótipos presentes nesses casos.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos descritos nesse estudo foram iniciados após a aprovação do comitê de ética das Instituições participantes. Foram tomadas todas as providências para garantir a integridade física e moral de todos os pacientes envolvidos.

Também foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aos pacientes que participaram do estudo, aprovado previamente pelo comitê. O termo foi elaborado de forma clara e sucinta com a preocupação com o bem estar dos pacientes, assim como a garantia de confidencialidade dos resultados, sem causar prejuízo a nenhum dos participantes (Anexo 1).

4.2. Pacientes e amostras clínicas

O Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS (SEAP) é um ambulatório e hospital dia, o qual promove assistência multidisciplinar a pacientes adultos vivendo com HIV, que podem ter acesso às áreas de infectologia, psicologia, ginecologia, proctologia, oftalmologia, nutrição e saúde bucal.

Inicialmente os pacientes foram recrutados, de um estudo anterior composto por 169 amostras aleatórias de pacientes infectados pelo HIV em atendimento no SEAP, durante o período de junho de 2013 a maio de 2014.

Após aprovação do comitê de ética em pesquisa para a realização da segunda etapa das coletas de sangue, foi realizado um levantamento dos agendamentos de consulta dos pacientes envolvidos, e um novo TCLE foi apresentado na data de consulta e, aqueles que concordaram, fizeram parte de nossa casuística. O período de realização das entrevistas e novas coletas de sangue foi de novembro de 2014 a junho de 2015.

Dos 169 pacientes, cinco não possuíam agendamento de consulta, oito não possuíam mais registro no serviço. Foram entrevistados 156 pacientes, sendo que oito deles não concordaram em participar do estudo e, de um paciente, não foi possível realizar a punção, incluindo-se, assim, 147 pacientes que foram acompanhados durante o estudo.

Durante esse período, cinco pacientes obtiveram resultados discordantes e foram submetidos a mais uma coleta de sangue para complementação de dados. Essa nova coleta aconteceu de novembro de 2015 a março de 2016.

Foram colhidos 8 mL de sangue por punção venosa de cada um dos 147 pacientes, em dois tubos com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Os materiais foram enviados imediatamente após a coleta ao Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz, em caixas térmicas apropriadas.

As amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos. Posteriormente, foram separadas 3 alíquotas de plasma, com 1mL cada, em tubos cônicos, sendo, então, armazenadas em congeladores distintos, a - 20° C.

4.2.1. Critérios de seleção de pacientes.

4.2.1.1. Critérios de inclusão

Pacientes acima de 18 anos, infectados pelo HIV em qualquer estágio da infecção em acompanhamento no SEAP que concordassem em assinar o TCLE e que tivessem participado do estudo anterior.

4.2.1.2. Critérios de exclusão

Pacientes em tratamento para HCV durante o período das coletas, ou que não concordassem em assinar o TCLE.

4.3. Diagnóstico Sorológico

Inicialmente, foi realizada uma triagem sorológica das amostras obtidas, utilizando-se kit comercial Murex anti-HCV-*version 4.0*[®], registrado e liberado pelo Ministério da Saúde.

4.3.1. Princípio do ensaio

A triagem sorológica é baseada na detecção de anticorpos anti-HCV em soro ou plasma humano. Trata-se de um ensaio imunoenzimático onde a placa está sensibilizada com antígenos purificados contendo sequências da região *core* do HCV (NS3, NS4 e NS5), portanto, na presença de anticorpos anti-HCV ocorre reação com o substrato, promovendo cor.

4.3.2. Procedimento

No ensaio, 20µL da amostra diluída em 180µL de diluente (tampão contendo proteínas bovinas e conservantes) foram incubados nos micropoços revestidos com o antígeno purificado. Nessa primeira incubação (37°C por 1 hora), quaisquer anticorpos anti-HCV ligam-se ao antígeno imobilizado. Após lavagem para remoção do material não ligado, foi adicionado à placa o conjugado (peroxidase/anticorpo monoclonal anti-IgG humano), seguido de incubação (37°C por 1 hora), o qual promove ligação com o anticorpo fixado na primeira etapa. Após a remoção do excesso de conjugado, foi adicionado o substrato contendo TMB (tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogênio. A cor roxa se desenvolve nos poços contendo anticorpos anti-HCV, ou seja, nas amostras positivas. A reação enzimática foi interrompida com solução de ácido sulfúrico na concentração 1N, a qual promove cor alaranjada nos poços, que foram lidos no espectrofotômetro. A quantidade de conjugado ligado à placa está diretamente relacionada com a concentração de anticorpos presentes na amostra. A tabela 1 apresenta as interpretações dos resultados do ensaio.

Tabela 1: Interpretações dos resultados de sorologia obtidos pelo ensaio murex anti-HCV-*version 4.0*[®].

Validação do teste	Resultados
NC \leq 0,25	R: > da faixa do <i>Cut off</i>
PC = NC + 0,8 ou mais	NR: < da faixa do <i>Cut off</i>
<i>Cut off</i> = média NC + 0,600	IND: 10% < ou > do valor de <i>Cut off</i>

*NC: controle negativo; PC: controle positivo; IND: indeterminado; R: reagente; NR: não reagente; *Cut off*: valor de corte

4.4. PCR em Tempo Real Quantitativo

Todas as amostras foram, também, analisadas pelo teste PCR em tempo real, utilizando-se o ensaio Abbott *Real Time HCV*[®], independentemente dos resultados obtidos na sorologia, para que pudesse ser observada a soroconversão ou infecção oculta nesses pacientes.

4.4.1. Princípio do ensaio

O ensaio utiliza a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa para gerar produto amplificado a partir do genoma do RNA do HCV em amostras clínicas. Após extração do material genético, a quantificação da sequência alvo presente em cada ciclo de amplificação é medida através do uso de sondas de oligonucleotídeos, marcadas por fluorescência no equipamento *m2000rt*. Os “primers” *Real Time HCV* são direcionados à região 5'NCR do genoma do HCV. As sondas somente irão gerar o sinal se estiverem ligadas ao produto amplificado específico. O ciclo de amplificação, ao qual o sinal fluorescente é detectado, é proporcional ao log da concentração de RNA viral presente na amostra original.

4.4.2. Procedimento

O ensaio Abbott *Real Time* HCV consiste nos seguintes kits de reagentes: Abbott *m sample preparation system*^{RNA}®, Abbott *Real Time* HCV® kit reagente de amplificação, Abbott *Real Time* HCV® kit de calibradores, Abbott *Real Time* HCV® kit de controles.

4.4.2.1. Preparação das amostras

A preparação de amostras foi realizada de acordo com instruções do fabricante, sendo necessário 1 mL de plasma de cada amostra (sendo 500 µL utilizados na reação e 500 µL de volume de segurança). Os reagentes incluídos no sistema de preparo Abbott *m sample preparation system*^{RNA}® são:

- *m*Whash 1 ^{RNA}
- *m*Whash 2 ^{RNA}
- *m*Microparticles ^{RNA}
- *m*Lysis
- Controle Interno

O propósito da preparação foi extrair e concentrar o RNA alvo para torná-lo acessível à amplificação. Este processo foi realizado no equipamento *m2000sp*, um sistema automatizado de processamento de amostras.

Os reagentes do sistema rompem as partículas virais e expõem seu material genético, que é capturado e lavado para remoção de componentes não ligados da amostra.

Os ácidos nucleicos ligados foram eluídos e transferidos para uma placa de 96 orifícios profundos. O controle interno foi introduzido no procedimento de preparação das amostras e processado também junto aos calibradores e controles.

4.4.2.2. Reação de amplificação

Após o equipamento *m2000sp* completar a extração, os reagentes de amplificação e o frasco da mistura principal foram carregados na área de trabalho conforme instruções do fabricante. Após o preparo, a placa foi lacrada e direcionada à área de amplificação, a qual foi inserida no equipamento *m2000rt* e iniciada a operação. Após o término do processamento os resultados foram impressos e realizada a manutenção dos equipamentos e descarte dos consumíveis.

4.4.2.3. Interpretação de resultados

A concentração de RNA do HCV em uma amostra ou controle é calculada a partir de uma curva de calibração armazenada. O instrumento Abbott *m2000rt* informa automaticamente os resultados, em UI/mL. A Tabela 1 apresenta os possíveis resultados e as interpretações do ensaio.

Tabela 2: Interpretações dos resultados da qPCR obtidos pelo equipamento *m2000rt*.

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO	DESCRIÇÃO
Targed not detected	Alvo não detectado	RNA do HCV não detectado na amostra
< 12 UI/mL	Alvo detectado	RNA detectado, porém abaixo do limite linear de quantificação.
Entre 12 e 10⁸ UI/mL	Alvo detectado	RNA detectado, dentro do limite linear de quantificação.
> 10⁸ UI/mL	Alvo detectado	RNA detectado, porém acima do limite linear de quantificação.

4.5. RT-PCR “in house” e sequenciamento viral para genotipagem do HCV

As amostras positivas no ensaio quantitativo foram também submetidas à RT-PCR “in house”, para a caracterização dos genótipos virais.

4.5.1. Extração do RNA viral

As amostras de plasma foram extraídas empregando-se o kit comercial *QIAamp Viral RNA Kit*[®], da Qiagen, utilizando-se soro ou plasma para esse procedimento.

À 140µL de plasma/soro, foram adicionados 560µL de tampão AVL, contendo *RNA Carrier*. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a amostra é lisada sob altas condições de desnaturação para inativação de RNases e assegurando o isolamento intacto do RNA viral. Ao lisado, 560µL de etanol 96% foi acrescentado, ajustando condições tamponantes e proporcionando ligação ótima do RNA à membrana de sílica. Após a ligação, foram realizadas duas lavagens com diferentes tampões, garantindo a retirada dos contaminantes. Após esse procedimento foi realizada a eluição com 80µL de tampão AVE, livre de RNase, obtendo-se o eluído livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes e inibidores. As amostras extraídas foram armazenadas em congeladores a -70C.

4.5.2. Síntese do DNA complementar – cDNA

A partir do produto da extração, o processo da transcrição reversa a 37°C por 1 hora, seguindo de inativação da enzima a 95°C por 15 minutos, foi realizado utilizando dNTPs (Life Technologies[®]), DDT (Life Technologies[®]), inibidor de RNases (RNAsin – Life Technologies[®]), *primer* NCR2, específico para a região 5’NCR do genoma do HCV, e a enzima transcriptase reversa (MMLV RT - Life Technologies[®]) em quantidades e concentrações pré estabelecidas (Moreira RC et al., 2003).

4.5.3. “Nested” PCR “in house”

Após o processo de síntese do DNA complementar foi procedida a PCR, utilizando-se “primers” específicos da região 5´NCR – PTC1, dNTPs (Life Technologies[®]), MgCl₂ (Life Technologies[®]), enzima TaqDNA polimerase (Life Technologies[®]), em quantidades e concentrações pré estabelecidas (quadro 1). Realizou-se a primeira amplificação através do termociclador (Eppendorf[®]), utilizando programa de ciclos de temperaturas no qual amplifica-se o material genético (quadro 2). A “nested” PCR foi realizada a partir do produto amplificado na primeira reação, utilizando-se dois “primers” internos da região 5´NCR - PTC3 e NCR4, dNTPs (Life Technologies[®]), MgCl₂ (Life Technologies[®]), enzima TaqDNA polimerase (Life Technologies[®]), em quantidades e concentrações pré estabelecidas (quadro 1). Realizou-se a amplificação no mesmo programa de ciclagem anterior (Moreira RC et al., 2003).

Uma amostra de plasma sabidamente positiva pela técnica de PCR foi utilizada como controle da amplificação e, para cada três amostras analisadas, alíquotas de água foram intercaladas como controles negativos e controles de possíveis contaminações nas reações.

“primers”	Sequência	Posição no genoma
PTC1	CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC	89 - 108
NCR2	ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT	349 – 321
PTC3	AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG	99 - 118
NCR4	CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT	313 - 288

Quadro 1: Sequência correspondente de cada um dos “primers” utilizados na reação de PCR.

Ciclos	Temperatura	Tempo
25	94°C	55 segundos
	55°C	40 segundos
	72°C	40 segundos
1	72°C	7 minutos

Quadro 2: Sequência de ciclagem para processamento da amplificação do material genético.

4.5.4. Identificação e quantificação dos fragmentos (5'NCR)

Para a identificação e quantificação do fragmento genômico amplificado, foram realizadas corridas eletroforéticas, onde 8µL do produto final da “nested” PCR foram misturados com 1µL de solução tampão de amostra (1% de azul de bromofenol e 40% de glicerol - Life Technologies®) e aplicados em gel de agarose (Life Technologies®), em concentração de 2,0% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA – 50X - Life Technologies®) diluído cinquenta vezes com 6 µL de *Sybr Safe*, para cada 100mL de gel. Realizou-se a corrida por 30 minutos, sob voltagem de 115V. Como controle da eficiência da corrida eletroforética e para a avaliação do tamanho do fragmento amplificado e quantificação do produto obtido, 8 µL de *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies®), foi aplicado junto com as amostras. A quantificação se dá comparando a intensidade das bandas obtidas com o padrão de massa, de acordo com as instruções do fabricante (figura 3).

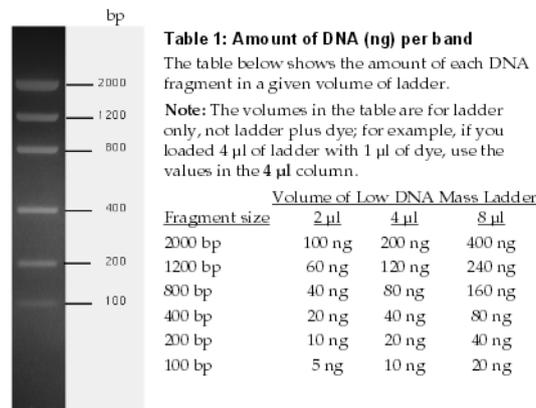


Figura 3: Instruções do fabricante (Life Technologies®) para análise da quantificação de fragmentos de DNA.

4.5.5. Sequenciamento viral

4.5.5.1. Reação de sequenciamento por “cycle sequencing”

À 2µL do DNA quantificado em comparação às bandas do *Low DNA Mass Ladder*, seguindo as instruções do fabricante (3ng), foram adicionados 2µL de primer PTC3 e NCR4 para a região 5’NCR em concentração de 2 pmol/uL cada, 5µL da mistura de reação do “Kit” de sequenciamento (Big Dye®) que contém ddNTPs marcados e as enzimas *AmpliTaq* DNA Polimerase FS e *rTth* pirofosfatase, 3µL de tampão Tris-HCl (pH 9,0) e MgCl₂ 5 X e 8,0µL de água ultrapura (MilliQ) para um volume final de 20µL. Em seguida, as amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura, em termociclador, com programa específico para a síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados (25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos).

4.5.5.2. Precipitação das amostras após “cycle sequencing”, desnaturação e aplicação no gel, das amostras amplificadas para a região 5’NCR.

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada dos ddNTPs marcados não incorporados.

Aos 20µL de reação, foram adicionados 80µL de isopropanol 70%. Os microtubos foram submetidos a forte agitação por 10 segundos e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 13.200 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, foi removido o isopropanol e adicionado 1000µL de etanol 70% ao precipitado. Realizou-se novamente a centrifugação por 15 minutos a 13.200 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o etanol foi retirado e as amostras incubadas a 60⁰C por 3 minutos para a evaporação total do etanol.

À cada tubo contendo as amostras, foram adicionados 10µL de formamida HIDI (Life Technologies®), homogeneizadas várias vezes, submetidas a forte agitação por 10 segundos, centrifugadas a 13.200 rpm por 15 segundos e incubadas a 95⁰C por 5 minutos para desnaturação e submetidas a resfriamento por mais 5 minutos. Imediatamente submeteu-se as amostras a eletroforese em Sequenciador Automático ABI 3130XL (Life Technologies®).

4.5.6. Análise das Sequências para Genotipagem

Realizou-se a classificação dos genótipos pela comparação do alinhamento das sequências de aminoácidos obtidas com sequências já conhecidas dos diferentes genótipos do HCV depositadas no *Genbank*. Para estas análises foram utilizados os programas *Sequence Scanner Software* (Life Technologies®).

A classificação dos genótipos foi confirmada pela ferramenta *Genotyping* disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>.

4.6 Análise de prontuários

Foram avaliados os prontuários dos pacientes para complementação dos dados, observando-se os resultados de carga viral do HIV, valores de linfócitos T CD4, carga viral do HCV e os resultados das sorologias para HCV, dos pacientes durante todo o período de seguimento no SEAP.

5. RESULTADOS

Foram acompanhados 147 pacientes, recrutados na data de atendimento no SEAP.

Participaram 95 pacientes (65%) do gênero masculino e 52 (35%) do gênero feminino.

A média de idade de todo o grupo foi de 53 anos, com idade mínima de 32 e máxima de 75 anos.

A faixa etária predominante foi de 50-59 anos (46%), sendo que, no grupo de pacientes do gênero feminino esse valor representa 42% e do gênero masculino 47% (Figura 4).

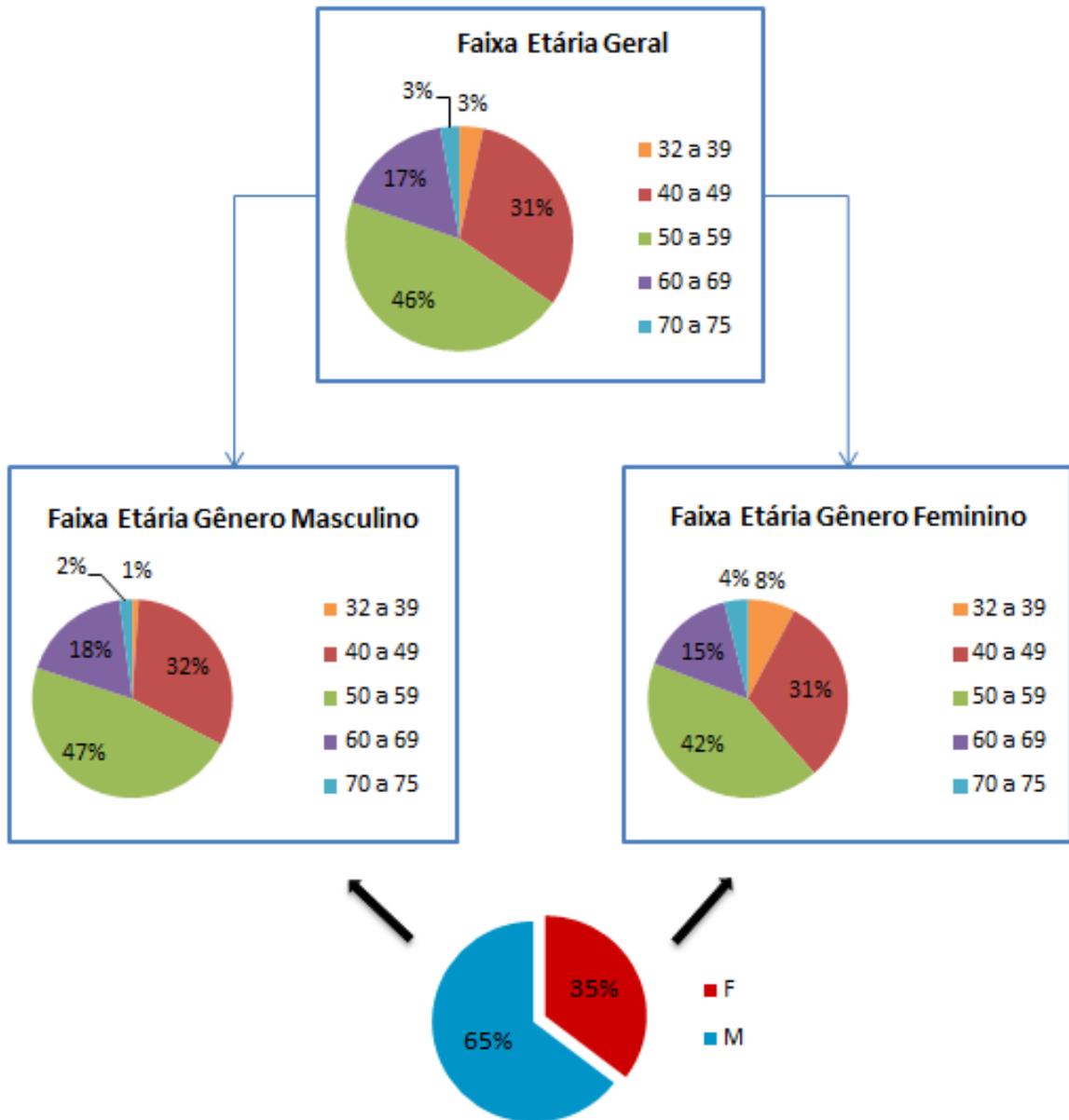


Figura 4: Apresentação das características dos pacientes por faixa etária e por gênero. Acima, faixa geral, à esquerda, grupo de pacientes do sexo masculino e à direita, sexo feminino. Abaixo divisão do grupo apenas pelo gênero (F: feminino; M: masculino).

Dos 147 pacientes observou-se frequência de exposição ao vírus HCV em 13,6% (20/147) dos pacientes e 9,5% (14/147) possuíam carga viral detectada em, pelo menos, uma das coletas realizadas.

A figura 5 representa os resultados de sorologia e PCR em tempo real realizadas.

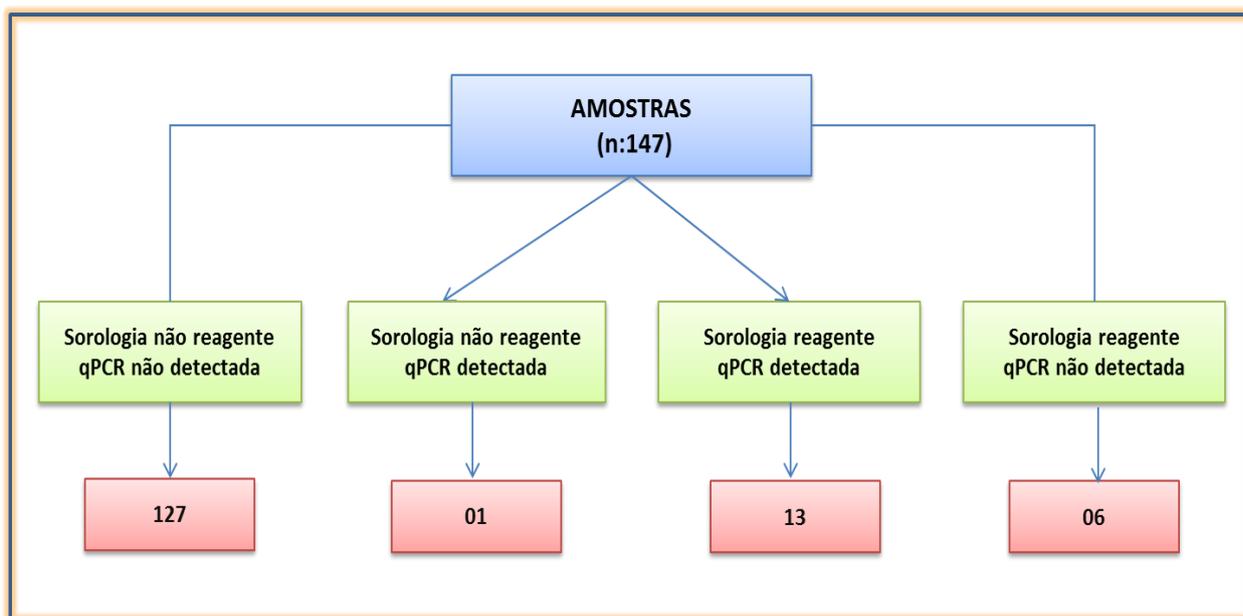


Figura 5: Resultado final dos ensaios de sorologia e qPCR realizados em ambas as amostras.

Das 14 amostras com carga viral positiva, foi possível realizar a genotipagem de 13 delas por sequenciamento. O genótipo predominante foi o 1, 69% (9/13), seguido pelo genótipo 3, 23% (3/13), e o genótipo 2, 8% (1/13). (Figura 6).

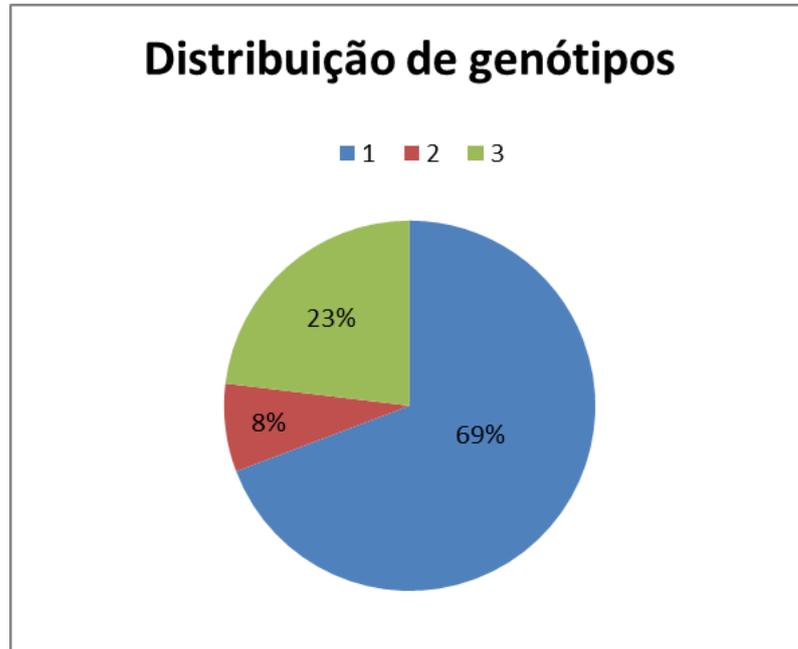


Figura 6: Distribuição de genótipos encontrados na população de estudo.

Resultados discordantes foram observados, por exemplo: o paciente 41 apresentou resultado não reagente na sorologia, nas duas amostras analisadas, porém, foi detectada carga viral de 177 UI/mL (Log 2,25) na primeira amostra.

Além deste, o paciente 52 apresentou resultado indeterminado para sorologia na primeira coleta e positivo na segunda, mantendo carga viral não detectada em ambas as amostras. O paciente 88, o qual teve resultado não reagente na sorologia da primeira amostra, apresentou resultado reagente na segunda, mantendo o resultado de carga viral não detectada.

A tabela 3 apresenta o perfil discordante dos três pacientes descritos acima.

Tabela 3: Resultados dos casos discordantes entre os ensaios das amostras da primeira e segunda coleta.

PACIENTE	SOROLOGIA 1	SOROLOGIA 2	qPCR 1	qPCR 2
CO-41	NR	NR	D (Log 2,25)	ND
CO-52	IND	R	ND	ND
CO-88	NR	R	ND	ND

*D: detectado, ND: não detectado, R: reagente, NR: não reagente, IND: indeterminado. (Limites de detecção descritos em casuística e métodos)

A tabela 4 mostra os resultados dos 20 pacientes expostos ao HCV. Os 14 pacientes com carga viral detectada em pelo menos uma coleta; os valores de linfócitos TCD4 e os resultados da sorologia para o HCV dos 6 pacientes, na primeira e na segunda amostra, dos pacientes estudados.

Tabela 4: Comparação dos ensaios de sorologia, qPCR e contagem de linfócitos T CD4 entre as amostras positivas da primeira e segunda coleta.

Número	qPCR 1 (Log)	TCD4 1	Sorologia 1	qPCR 2 (Log)	TCD4 2	Sorologia 2
CO-1	5,46	138	R	6,01	128	R
CO-31	6,26	984	R	6,03	1001	R
CO-38	6,22	794	R	6,40	117	R
CO-41	2,25	661	NR	ND	625	NR
CO-42	6,74	588	R	6,50	611	R
CO-52	ND	487	IND	ND	309	R
CO-58	ND	528	R	ND	652	R
CO-64	6,80	768	R	6,66	978	R
CO-72	6,48	1057	R	6,28	300	R
CO-76	5,78	1038	R	4,90	906	R
CO-88	ND	608	NR	ND	1040	R
CO-96	5,76	585	R	5,96	320	R
CO-100	ND	818	R	ND	565	R
CO-103	6,01	573	R	5,94	575	R
CO-104	5,82	721	R	6,09	808	R
CO-137	ND	229	R	ND	351	R
CO-139	6,92	673	R	6,35	529	R
CO-140	6,33	732	R	6,68	915	R
CO-213	ND	503	R	ND	633	R
CO-224	6,16	536	R	6,56	640	R

*ND: não detectado, R: reagente, NR: não reagente, IND: indeterminado. (Limites de detecção descritos em casuística e métodos)

O valor em Log da média da carga viral das amostras da primeira coleta foi de 5,92, enquanto a média dos valores da segunda coleta foi de 5,74. No período do estudo, não foram observadas alterações significativas nos valores de carga viral dos pacientes analisados, ou seja, não detectamos pacientes com variação acima de 1 Log na quantificação.

Foram encontrados quatro pacientes (20%) com flutuação na sorologia, intercalando resultados reagentes e não reagentes ou indeterminados durante o acompanhamento no serviço. Foi realizada uma terceira coleta desses pacientes para complementação de dados.

Esses pacientes não possuem genotipagem do HCV, pois não apresentaram carga viral em nenhuma das coletas ou em exames realizados anteriormente.

A figura 7 apresenta a relação entre os resultados dos exames do paciente 52. Esse paciente manteve contagem de linfócitos T CD4 acima de 350 células/mm³ em quase todo o período e apresentou carga viral do HIV detectada em amostras de 1995, 2014 e 2015.

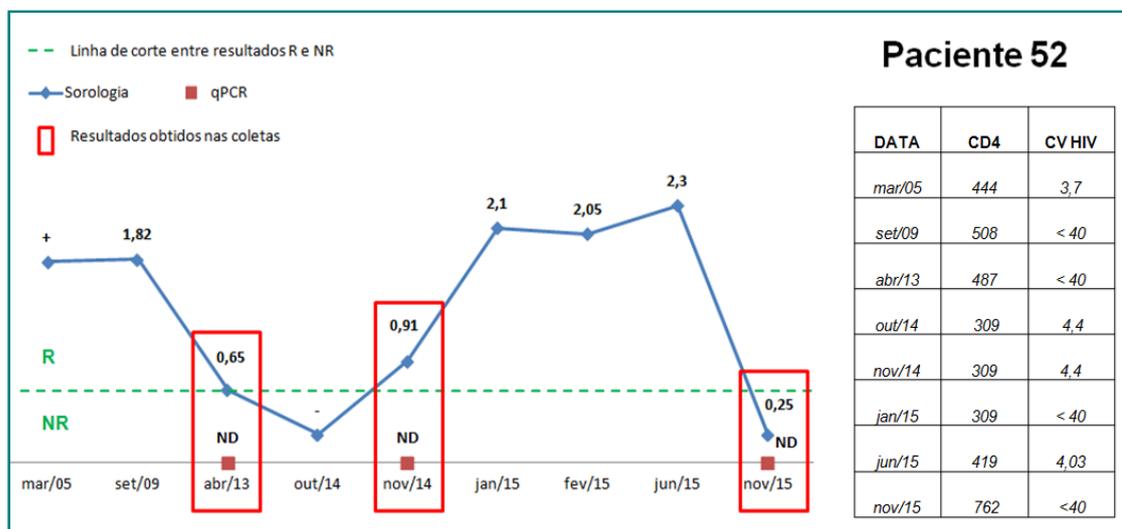


Figura 7: Relação entre os resultados de exames do paciente CO- 52 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

O paciente 88 apresentou resultados não reagentes desde 2006 até abril de 2014 para sorologia do HCV, com aumento da relação DO/CO (densidade óptica/cut off) em outubro de 2013, e apresentando resultado reagente na segunda coleta, em novembro de 2014. Em duas análises realizadas em 2015 e 2016, voltou a apresentar resultado não reagente (Figura 8).

O paciente manteve contagem de linfócitos T CD4 acima de 350 células/mm³ em todas as análises e carga viral do HIV detectada apenas em 2006 e 2008.

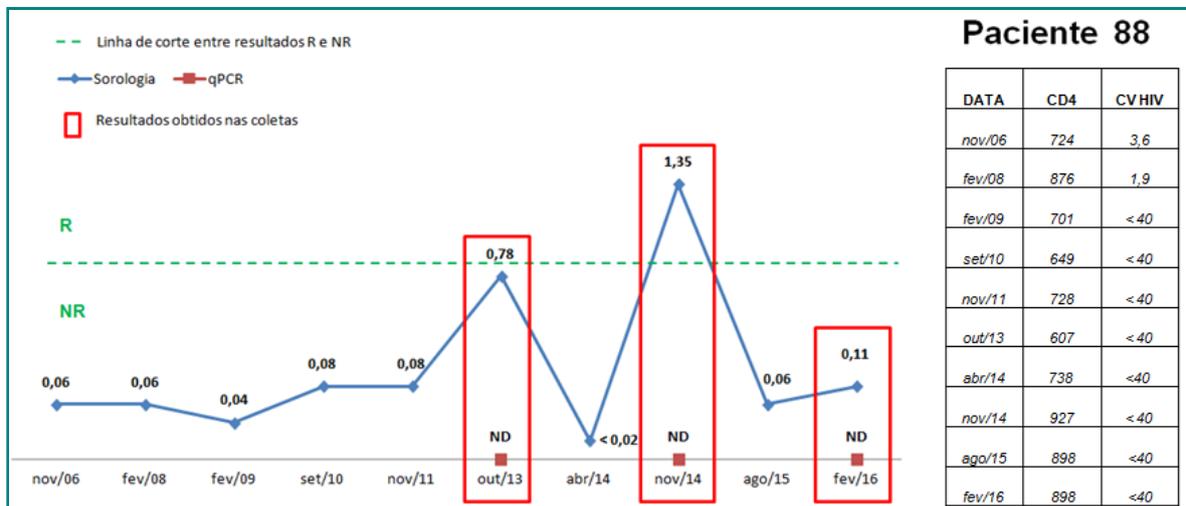


Figura 8: Relação entre os resultados de exames do paciente CO- 88 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

O paciente 137 apresentou resultado reagente em três análises de 2006 a 2012, dois resultados não reagentes em 2013 (março e novembro), voltando a apresentar resultado reagente ainda em dezembro de 2013 e em janeiro de 2015. Ainda em 2015 (junho) apresentou resultado não reagente. Em outubro e dezembro de 2015, voltou a apresentar resultado reagente, conforme figura 9

Esse paciente não apresentou carga viral do HIV detectada em nenhuma análise, porém, em alguns períodos apresentou contagem de linfócitos T CD4 abaixo de 350 células/mm³.

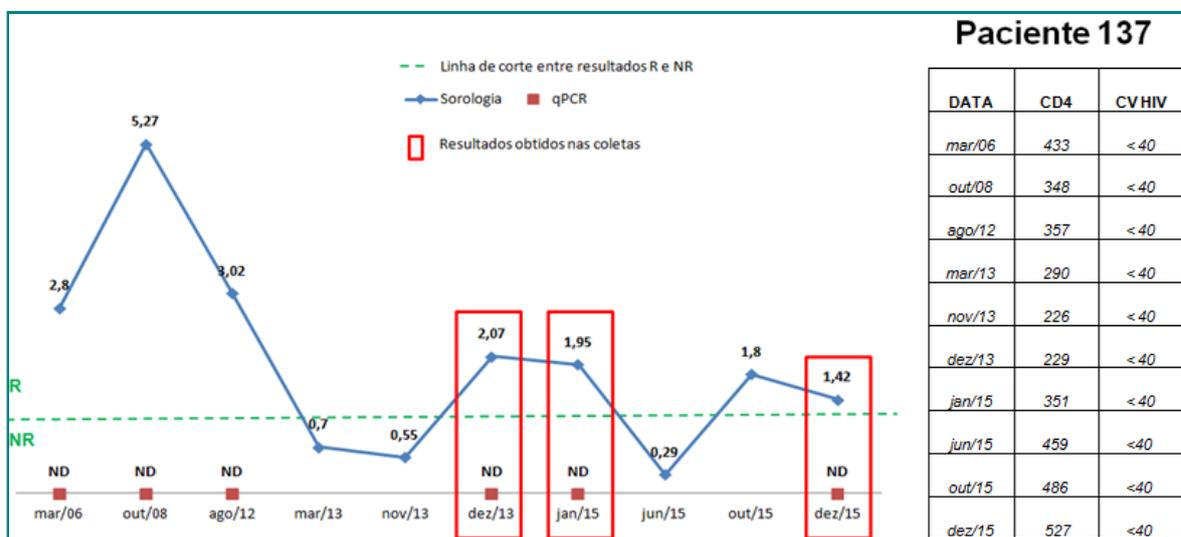


Figura 9: Relação entre os resultados de exames do paciente CO-137 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

O paciente 213 apresentou resultados reagentes em quatro análises e cinco resultados não reagentes, em períodos distintos.

Apresentou dois resultados reagentes em 2005, manteve resultados não reagentes de 2006 a 2013, apresentou novamente resultado reagente em 2014 e obteve uma amostra não reagente em março de 2015, outra reagente em seguida (abril de 2015), voltando a apresentar resultado não reagente em dezembro de 2015, conforme figura 10.

Os resultados de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV nos períodos analisados também são demonstrados de acordo com as datas de análise, apresentando carga viral detectada em 2005 e mantendo resultado não detectado até 2014, onde apresentou novamente carga viral com Log de 2,05. Em 2015 obteve resultado não detectado em todas as análises.

Na maioria das análises o paciente manteve contagem de linfócitos T CD4 acima de 350 células/mm³, apresentando menor contagem apenas em 2005.

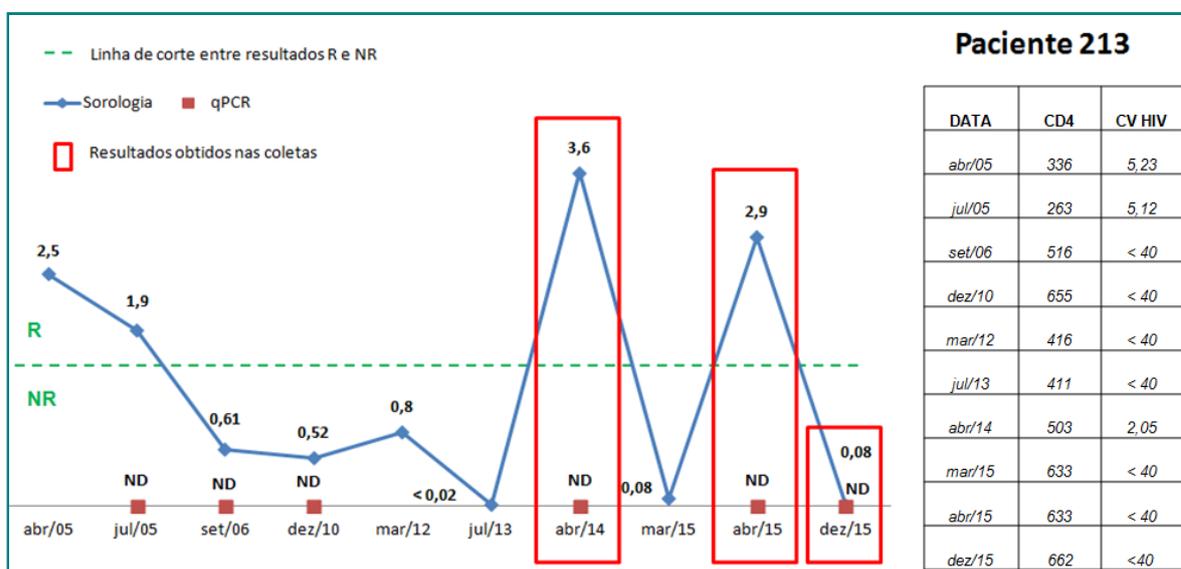


Figura 10: Relação entre os resultados de exames do paciente CO-213 (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

O paciente 41 apresentou carga viral detectada apenas na primeira coleta, porém manteve resultado não reagente na sorologia, inclusive em exames realizados anteriormente, nos anos de 2006 até 2015.

Na terceira coleta realizada em março de 2016 apresentou resultado não reagente para sorologia e carga viral não detectada para o HCV.

Durante esse período, o paciente manteve a contagem de linfócitos T CD4 acima de 350 células/mm³ em todas as análises e carga viral do HIV detectada apenas no período de 2006 a 2009. Não havia nenhum resultado anterior de exame de quantificação da carga viral do HCV no prontuário.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, recentemente foi realizado um estudo de base populacional entre os residentes das capitais dos estados brasileiros e do distrito federal, pelo Ministério da Saúde, onde foi detectada a prevalência do HCV de 1,38% (Pereira, 2013).

No Brasil, aproximadamente 0,5% da população adulta está infectada pelo HIV, sendo que, destas, 16% estão também coinfectedados pelo HCV. Dos indivíduos atendidos nos CTA 42% apresentavam-se coinfectedados, assim como 54% dos atendidos em clínicas de doenças infecciosas (Wolff et al., 2010).

Importante ressaltar que a coinfeção HIV/HCV colabora para pior progressão de doença hepática, além de ser considerada uma das maiores causas de morte em pacientes infectados pelo HIV. Do mesmo modo, pode aumentar o risco de transmissão da doença, sendo necessário acompanhamento e monitoramento desses pacientes, com o objetivo de diminuir os riscos citados (Mendes-Corrêa, 2000).

No presente trabalho, foi observada frequência de exposição ao HCV, na população estudada, de 13,6%. Observa-se que esse índice é de 10 vezes maior quando comparados com os dados populacionais em população mono infectada pelo HCV. Van de Laar (2010) e Carvalho (2006) também observaram dados semelhantes aos desse estudo.

A casuística desse estudo foi baseada na obtenção aleatória de amostras de pacientes do serviço estudado, para que não houvesse viés de seleção. Os resultados indicam que a estimativa de prevalência foi bastante adequada, uma vez que o resultado obtido na análise dos 147 casos mostrou prevalência de 13,6% (20/147), dentro de um IC 95% tem-se uma prevalência entre 8,5% e 20,3%, um erro amostral estimado em aproximadamente 6%. Isso significa que a amostragem foi suficientemente grande para estimar uma prevalência esperada de, no mínimo, 8,5%. Dessa forma, a amostra foi suficiente para estimar a prevalência esperada dentro

de um erro aleatório admissível, considerando o não cometimento de viés de seleção.

Mendes-Corrêa (2001) observou prevalência de 17,7% ao estudar 155 pacientes coinfectados. Admitindo-se um erro amostral de 5% (prevalência mínima de 12,7%), levaria a uma amostra estimada de 224 indivíduos e, considerando um erro de 6% o número de amostras pesquisadas foi suficiente para determinar a prevalência com segurança, uma vez que a prevalência mínima seria de 12,7%. Esses dados corroboram com a amostragem e com os resultados obtidos em nosso estudo.

A maior frequência do HCV foi observada entre os indivíduos do gênero masculino e faixa etária de 50-59 anos, corroborando com dados encontrados na literatura. Em relação aos dados de coinfeções HIV/HCV, o Boletim Epidemiológico de DST/AIDS e Hepatites virais do Ministério da Saúde de 2012, relatou prevalência da coinfeção em pacientes com faixa etária entre 40-49 anos no ano de 2010. A ocorrência da hepatite crônica nessa faixa etária pode ser explicada pela falta de monitoramento anterior, como esterilização de materiais, falta da triagem do vírus HCV nos bancos de sangue, o rastreamento em grupos de risco, a não utilização de preservativos e a infecção pelo HIV (Busch, 2003).

A genotipagem do HCV é importante para fornecer dados epidemiológicos, mas, também, para se definir e orientar o clínico quanto à droga a ser utilizada e o tempo de administração.

No presente estudo, foi observada prevalência do genótipo 1 (69%), seguido pelos genótipos 3 (23%) e 2 (8%), corroborando com estudos de Martins (2006), Lopes (2009) e Carvalho (2014).

Os pacientes que apresentaram carga viral positiva para HCV (14/147) não tiveram alterações significativas no Log entre o período das coletas, com exceção do paciente 41 que não apresentou resultado reagente na sorologia e será discutido adiante. Destes, três pacientes possuíam contagem de linfócitos T CD4 < 350 células/mm³, considerado fator importante para a progressão do HCV em coinfectados (Sabin, 1997 e Sulkowski, 2000).

Estudo de Dieterich (1999) demonstra que a coinfeção pode ser

deletéria para as duas infecções, ou seja, o HIV é importante co-fator para a progressão da hepatopatia causada pelo HCV, aumentando a viremia e acelerando a progressão para cirrose. Por outro lado, o HCV parece acelerar a progressão da infecção pelo HIV, favorecendo o aumento da carga viral e a redução dos linfócitos T CD4.

No estudo, não foi observada correlação significativa entre a carga viral do HCV e a contagem de linfócitos T CD4. Porém, todos os pacientes faziam uso de antirretrovirais no momento das coletas, podendo justificar o controle da infecção pelo HIV e consequente manutenção do sistema imunológico.

Diversos autores como Afdhal (2004) e Hoofnagle (2002) sugerem que a cronificação da hepatite C ocorre entre 75-85% dos casos. Dessa forma a resolução da infecção pelo HCV pode ocorrer de 15-25% da população infectada. Na população estudada, 30% (6/20) dos pacientes infectados foram identificados com esse perfil.

Durante a análise de prontuários, também foram identificados pacientes com alterações nos resultados de sorologia. A flutuação da sorologia foi observada, com episódios reagentes e não reagentes em diferentes análises, mesmo em intervalos muito pequenos entre a coleta das amostras. Importante ressaltar que os pacientes que apresentaram flutuação da sorologia não haviam sido submetidos ao tratamento para HCV.

Esse fato é comumente encontrado em pacientes imunossuprimidos. De acordo com estudos de Moreira (2003) e Mendes-Corrêa (2000), a imunossupressão pode alterar a concentração de anticorpos totais, impedindo que estes sejam detectados nos exames sorológicos, onde os alvos do ensaio são apenas anticorpos. Entretanto, os pacientes encontravam-se com infecção pelo HIV controlada, com altos níveis de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV não detectada.

Ressalta-se que, a flutuação na sorologia pode resultar em um diagnóstico incorreto, o que pode prejudicar o diagnóstico do paciente e torná-lo possível fonte de infecção. Segundo Bueno (2012), resultados falso positivo ou negativo podem ocorrer dependendo da performance e diferentes

índices de sensibilidade do kit utilizado, devido a razões biológicas (anticorpos inespecíficos/ reações cruzadas) ou período de infecção recente, que ainda não desenvolveu anticorpos.

Estudos apontam que a prevalência da coinfeção pode ser subestimada, devido à flutuação da sorologia em pacientes HIV positivos, ou ainda pelo clareamento viral espontâneo (Spengler & Rockstroh, 1998).

Nas figuras 7, 8, 9 e 10, pode-se observar que quatro dos pacientes estudados – CO 52, 88, 137 e 213 - apresentaram características de flutuação nos resultados da sorologia. Os quatro apresentaram pelo menos um resultado positivo e com carga viral não detectada.

O paciente 52 (figura 7), apresentou resultado reagente em 2 análises em 1995 e 2009, apresentando resultado indeterminado em 2013 e não reagente em outubro de 2014. Logo após, em novembro de 2014 voltou a apresentar resultado reagente, mantendo-o em mais 3 sorologias. O paciente foi procurado em novembro de 2015, aceitou colaborar com uma nova coleta de sangue e, novamente, o resultado foi não reagente. Esse perfil é o típico de um paciente com flutuação sorológica, quando o clínico não consegue determinar a real condição desse indivíduo e várias repetições dos testes se fazem necessárias.

No paciente 88 (figura 8), durante a fase do estudo não foi possível quantificar o HCV-RNA, possivelmente por concentração viral abaixo do limite de detecção do teste utilizado, ou mesmo pela baixa concentração viral no plasma do paciente.

Foi observado apenas um resultado de sorologia reagente. Dessa forma, não pode ser descartada a possibilidade de outro caso de flutuação de marcador sorológico, ou mesmo falso positivo, sendo necessário acompanhamento desse paciente. Pode ser evidenciada também, a ocorrência de oscilação em resultados de sorologia devido à leitura estar muito próxima do *cut off*, podendo apresentar resultados distintos em amostras clínicas (Moreira, 2003).

Resultados semelhantes ao do paciente 52 se repetem nas figuras 9 e 10, pacientes 137 e 213. O paciente 137 apresentou resultado reagente na

sorologia, com DO/CO de 5,27 e, durante o acompanhamento, variações nos resultados surgiram com desaparecimento e reaparecimento de anticorpos no ano de 2013. Durante o nosso estudo, detectamos anticorpos em duas amostras colhidas em 2015, período em que também foram detectados anticorpos não reagentes. Os resultados do paciente 213 são bastante semelhantes ao anterior, pois ele apresentou resultados reagentes e não reagentes durante o período de acompanhamento no serviço. Em amostras colhidas em 2014 e 2015 observamos picos de valores de DO/CO com queda em uma das amostras.

Poder-se-ia concluir que esses resultados fossem erros de anotações no prontuário ou utilização de kits sorológicos de procedência duvidosa, porém não se pode deixar de lembrar que esse estudo foi realizado com pacientes, de um serviço de saúde especializado com atendimento de excelência aos pacientes infectados pelo HIV e que, muitas vezes, servem de referência para outros serviços. Não há dúvidas no rigor do diagnóstico desse serviço de saúde.

Os pacientes com resultados flutuantes, tanto nos resultados da sorologia como nos resultados dos testes moleculares, devem ser analisados com bastante cautela, pois, como discutido anteriormente, a qualidade dos insumos, a análise técnica e o período de coleta das amostras, devem sempre ser analisadas para, além de garantir a qualidade do diagnóstico do paciente, fornecer dados fidedignos à epidemiologia.

Esse trabalho propôs estudar a presença de flutuações em pacientes infectados por HIV exatamente para alertar sobre a dificuldade de análise de pacientes imunossuprimidos que, na maioria das vezes, será triado com um único teste e, esse fato pode não ser suficiente para fechar o diagnóstico ou influenciar na interpretação da triagem. Deverá ser um alerta aos serviços de saúde e para as vigilâncias epidemiológicas.

Observando os resultados apresentados, estes pacientes devem ser acompanhados periodicamente em consultas posteriores para verificar se ocorre a presença de RNA viral e manutenção da sorologia reagente.

O paciente 41 apresentou carga viral do HCV detectada em uma

única dosagem, porém seus resultados de sorologia, inclusive em exames anteriores, não apresentaram resultado reagente. Apesar de serem necessárias novas amostras para confirmação dos resultados, esse perfil sugere infecção oculta pelo HCV. Este seria, por definição, a caracterização da hepatite C oculta, sorologia não reagente com carga viral em concentração baixa (Quiroga, 2009). Porém, não podemos deixar de levantar a hipótese de resultado falso positivo, difícil de ocorrer em técnicas moleculares, mas não impossível. Não podemos descartar a suspeita da hepatite oculta e lembrar que esses pacientes devem sempre ser monitorados, com pesquisa de anticorpos e do RNA, por serem possíveis fontes de infecção.

Wooley e colaboradores (1999) analisaram 52 pacientes infectados pelo HIV e observaram que 35% desses pacientes apresentaram HCV-RNA sem sorologia reagente.

Estudo de Beld (1999) indica que na infecção primária pelo HCV nem sempre ocorre o aparecimento rápido de anticorpos e sugere que níveis baixos de RNA podem atrasar ou mesmo não provocar a resposta imune.

Importante ressaltar que esses pacientes podem se tornar possíveis fontes transmissoras do HCV em pacientes infectados pelo HIV, sendo de grande importância epidemiológica o rastreamento e acompanhamento desses pacientes.

O diagnóstico ainda na fase inicial é favorável, onde estudos demonstram maior facilidade no manejo dos pacientes e maiores taxas de resposta virológica sustentada ao tratamento (Strauss, 2001). Além disso, os pacientes encontram-se com infecção pelo HIV estabilizada, com níveis de linfócitos T CD4 altos e carga viral indetectada, fator também favorável para o manejo desses pacientes. Dessa forma, é provável que a melhor forma de avaliar esses pacientes é combinar ensaios sorológicos e moleculares, visando diminuir o risco de disseminação da infecção pelo HCV, considerando que estes ensaios podem apresentar efeito sinérgico (Moreira, 2003).

7. CONCLUSÃO

- 1) A frequência de infecção pelo vírus HCV em indivíduos infectados pelo HIV foi de 13,6%, mais de 10 vezes maior que estudos na população geral.
- 2) Foi observada maior prevalência do genótipo 1 na população, seguido pelos genótipos 3 e 2.
- 3) Foram analisados quatro casos (20%) de flutuação de marcadores sorológicos na população estudada.
- 4) Foi observado um possível caso de infecção oculta do HCV, sendo necessário acompanhamento do paciente para confirmação.

8. REFERÊNCIAS

Afdhal NH. **The natural history of hepatitis C**. Sem. Liver. Dis., v. 24 (supl 2), p. 3-8, 2004.

Ballardini G, Manzin A, Giostra F, Francesconi R, Groff P, Grassi A, Solfrosi L, Ghetti S, Zauli D, Clementi M, Bianchi FB. **Quantitative liver parameters of HCV infection: relation to HCV genotypes, viremia and response to interferon treatment**. J Hepatol. Apr; 26(4):779-86. PMID: 9126789, 1997.

Barone A, Araújo ESA . **Hepatite C**. Brasil: Manole, 582 p, 2010

Beld M, Penning M, Van Putten M, Van Den Hoek A, Damen M, Klein MR, Goudsmit J. **Low levels of hepatitis C vrus RNA in serum, plasma and peripheral blood mononuclear cells of injecting drug users during long antibody-undetectable periods before seroconversion**. Blood. Aug 15;94(4): 1183-91, 1999.

Bokharaei-Salim F, Keyvani H, Monavari SHR, Alavian SM, Madjd Z, Toosi-Mohssen N, Alizadeh AHM. **Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease**. J. med. Virol. 83:989-995; 2011.

Bueno L. **A contribuição do voto de autoexclusão na segurança transfusional**. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2012.

Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ. **Current and emerging infectious risks of blood transfusions**. JAMA. Feb 26;289(8):959-62, 2003.

Carvalho AC, Junior JLP, Silva MFO, Neto SGS. **Perfil genotípico da hepatite C em um laboratório público do estado do Piauí**. R. Interd. V. 7, n. 3, p. 55-60, 2014.

Carvalho FHP, Coelho MRCD, Vilella TAS, Silva JLA, Melo HRL. **HIV/HCV coinfection at an university hospital in Recife, Brazil.** Rev. Saúde Pública [online]. vol.43, n.1, pp. 133-139. ISSN 0034-8910. 2009.

Carvalho FHP, Silva ANMR, Mello HRL, Coêlho MRD. **Prevalence anti-HCV among HIV seropositive patients.** Rev. Paraense de Medicina, v. 20, n. 3, p. 11-13, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC).. **Hepatitis C Information for Health Professionals**, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/HCVfaq.htm>>. Acesso em: 21/12/2015.

Centers for Disease Control and prevention (CDC). **Hepatitis C virus and HIV Coinfection**, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/idu/hepatitis/hepc_and_hiv_co.pdf> Acesso em:02/10/2012

Chen S, Morgan T. **The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection.** Int. J. Med. Sci., 3 (2), 47-52, 2006.

Choo QL, Pinho JRR. **Virologia molecular. Variabilidade viral.** In: Focaccia R. Tratado de hepatites Virais. São Paulo, Atheneu; p. 195-204, 2003.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood borne non-A non-B viral hepatitis genome.** Science, V. 244, p.359-362, 1989.

Davis GL. **Clinical manifestations of hepatitis C.** Clinics in Liver Disease, Hepatitis C; v1. P569-585, 1997.

Dieterich DT. **Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in co-infection.** Am J Med; 107:79s-84s, 1999.

Dore GJ, Cooper DA. **The impact of HIV therapy on coinfection with hepatitis B and hepatitis C viruses.** *Curr Opin Infect Dis*; 14: 749–755; 2001.

European Association for the Study of the Liver. **Clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. J.** *Hepatol* 55:245–264, 2011.

Ferreira AS. **Primary Antiretroviral Resistance and High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Mato Grosso State, Central West Brazil.** 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Medicina) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

Ferreira CT, Silveira TR. **Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção.** *Rev. Bras. Epidemiol*, 7(4):473-487, 2004.

Filho GB. **Bogliolo: Patologia Geral.** ed:Editora Guanabara Koogan: Belo Horizonte; 2006.

Focaccia R. **Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas.** 3. ed. Brasil, 1282p. Atheneu, 2013.

Germer JJ & Zein NN. **Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications.** *Mayo Clin Proc*;76: 911-920, 2001.

Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. **The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine.** *FEBS Lett.* 30;535(1-3):34-8, 2003.

Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, et al. **Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved.** Int J Biochem Cell Biol; 38(2): 135-151, 2006.

Hoofnagle JH. **Course and outcome of hepatitis C.** Hepatol., v. 36 (supl 1), p. S21-S29, 2002.

Jorge SG. **Hepatite C.** São Paulo – SP, 2003. Disponível em <www.hepcentro.com.br/hepatite_c.htm>. Acesso em 02.out.2014.

Kim YS, Lee HS, Ahn YO. **Factors associated with positive predictability of the antiHCV ELISA method with confirmatory RTPCR.** J Korean; Med Sci; 14(6):62934, 1999.

Lacombe K, Rockstroh J. **HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges.** Gut; 61 (Suppl 1):i47–i58, 2012.

Levinson W, Jawetz E. **Microbiologia médica e imunologia.** Ed: ARTMED, Porto Alegre, 2005.

Lindenbach BD. e Rice CM. **Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function.** Nature 436:933-938, 2005.

Lopes CLR, Teles SA, Espírito-Santo MP, et al. **Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas.** Rev. Saúde Pública [online].vol.43, supl.1, pp. 43-50. ISSN 0034-8910, 2009.

Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. **Principles and Practice of Infectious Diseases.** 7. ed. Usa: Elsevier, 4320 p., 2010

Martins RMB, Teles AS, Freitas NR, et al. **Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]. vol.48, n.1, pp. 53-55. ISSN 1678-9946, 2006.

Martins T, Schiavon N, Luz J, de Lucca L. **Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C.** Rev. Assoc. Med. Bras, vol.57, n.1, pp. 107-112. ISSN 0104-4230, 2011.

Mendes-Corrêa MCJ, Barone AA, Cavalheiro N de P; Tengan, FM, Guastini C. **Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in São Paulo, Brazil.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 42(2): 81-85, 2000.

Mendes-Corrêa MC, Barone AA, Guastini C. **Hepatitis C vírus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection.** Rev Inst Med Trop; S. Paulo, 43:15–9, 2001.

Ministério da Saúde (MS). **Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças.** Brasília Df, 2004. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/criterios_aids_2004.pdf. Acesso em 03.Dez.2015.

Ministério da Saúde (MS). **A, B, C, D, E de Hepatites para comunicadores.** Brasília - Df, 2005. 103 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hepatites_abcde.pdf . Acesso em 09.Out.2012

Ministério da Saúde (MS). **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Brasília - Df, 2009. 813 p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf. Acesso em: 09.out.2012.

Ministério da Saúde (MS). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília - Df, 2011. 103 p. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_hepatite_c_2011_retifica do pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_hepatite_c_2011_retifica_do_pdf)>. Acesso em: 01.out.2012.

Ministério da Saúde (MS). **Boletim epidemiológico – Hepatites virais**. Brasília - DF, 2012. 176p. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim_epidemiol_gico_hepatites_virais_2012_ve_12026.pdf. Acesso em: 09. Jun.2015

Ministério da Saúde (MS). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções - Suplemento 1** . Brasília – DF, 2013. Disponível em: http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo_clinico_e_diretrizes_terapeuticas_para_hepatite_viral_c_e_coinfeccoes Acesso em: 06.mai.2015

Ministério da Saúde (MS). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília - Df, 2015. 102 p. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58192/_p_pcdt_final_hepatite_c_final_01_pdf_p__15024.pdf>. Acesso em: 09.jul.2015.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. **Replication of hepatitis C virus**. Nat Rev Microbiol, 5: 453–463, 2007.

Moreira RC, Pinho JR, Fares J, Oba IT, Cardoso MR, Saraceni CP, Granato C. **Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies**. Can. J. microbiol. 9(8):503-7; 2003.

National Institutes Of Health. **Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C**: Hepatol.; 19: 3 – 20, 2002.

Oliveira-Filho AB, Pimenta AS, Rojas MF, Chagas MCM, Crespo DM, Crescente JAB, Lemos JAR. **Likely transmission of hepatitis C vírus through sharing of cutting and perforating instruments in blood donors in the state of Pará, Northern Brazil.** Caderno de saúde pública, vol.26 no.4 Rio de Janeiro, 2010.

Oliveira-Filho AB, Sawada L, Pinto LC, Locks D, Bahia SL, Brasil-Costa I, Lemos JA. **HCV infection among cocaine users in the state of Pará, Brazilian Amazon.** Arch. Virol. DOI: 101007/s00705-013-1627-5, 2013.

Pannain VLN. **Aspectos anatomopatológicos das hepatites virais.** In: Alves JG. Gastroenterologia – Hepatites. Rio de Janeiro, Rubio; p. 69-77, 2001.

Pereira LMMB, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, Figueiredo GM, et al. **Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study.** BMC Infectious Diseases [online]. ISSN: 1471-2334 v.13, p.60, 2013.

Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. **The epidemic behavior of the hepatitis C virus.** Science, v. 292, p.2323-2325, 2001.

Quiroga, JA; Castillo, I; Llorente, S; Bartolomé, J; Barril, G; Carreño, V. **Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs.** J Hepat., Volume 50, Issue 2, Pages 244-246, 2009.

Sabin CA, Telfer P, Phillips NA, Bhagani S, Lee CA. **The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men.** J Infect Dis; 175:164-8, 1997.

Sereno L, Mesquita F, Kato M, Jacka D, Nguyen TT, Nguyen TN. **Epidemiology, responses and way forward: the silent epidemic of viral hepatitis and HIV coinfection in Vietnam.** J Int Assoc Physicians AIDS Care; 11(5):311-20, 2012.

Shah DO; Chang CD; Jiang LX; Cheng K; Muerhoff AS; Gutierrez RA; Leary TP; et al. **Combination HCV core antigen and antibody assay on a fully automated chemiluminescence analyzer.** Transfusion; 43:1067-1074, 2003.

Smith D, Bukh J, Kuiken C, et al. **Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource.** Hepatol.; 59: 318-327, 2014.

Spengler U, Rockstroh JK. **Hepatitis C in the patient with human immunodeficiency virus infection.** J. Hepat., 85: 1023-1030, 1998.

Strauss E. **Hepatite C.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. vol.34, n.1, pp. 69-82. ISSN 1678-9849, 2001.

Sulkowski MS, Mast EE, Seeff LB, Thomas DL. **Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus.** Clin Infect Dis; 30:s77-s84, 2000.

Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. **Hepatitis C : viral life cycle.** Adv drug Deliv Rev. 10;59(12):1200-12. Epub, 2007.

Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, Gish RG, Busch MP, Reingold AL, Alter MJ **Sexual transmission of HCV among monogamous heterosexual couples: The HCV partners study** . Hepatol. DOI: 10.1002/hep.26164, 2012.

Ullah S, Shah MAA, Riaz N **Recent advances in development of DNA vaccines against hepatitis C virus** Indian J Virol. 23(3): 253–260. DOI: 10.1007/s13337-012-0058-3, 2012.

Van de Laar TJ, Matthews GV, Prins M, Danta M. **Acute hepatitis C in HIV-infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection**. AIDS 31;24(12):1799-812; 2010.

Vogel M, Boesecke C, Rockstroh JK. **Acute hepatitis C infection in HIV-positive patients**. Curr. Opin. Infect. Dis. Feb;24(1):1-6; 2011.
World and Health Organization (WHO). **Hepatitis C**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 03 jan. 2016.

Wolff FH, Fuchs SC, Barcellos NN, de Alencastro PR, Ikeda ML, Brandão AB, Falavigna M, Fuchs FD. **Co-infection by hepatitis C virus in HIV-infected patients in southern Brazil: genotype distribution and clinical correlates**. PLoS One.5;5(5):e10494.; 2010

Wooley I, Valdez H, Horsch A, et al. **Prevalence of unrecognized hepatitis B and C infections in AIDS patients with abnormal liver function tests**. In: Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Program and abstracts. Abstract 189. Chicago, 1999.

Zein NN. **Clinical significance of hepatitis C virus genotypes**. Clin Microbiol Rev;13(2):223-35. DOI: 10.1128/CMR.13.2.223-235, 2000.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE: _____

DATA NASC: ____/____/____ SEXO: () F () M

DOC. DE ID. Nº: _____ CPF: _____

ENDEREÇO: _____ Nº: ____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ UF: ____

CEP: _____ TELEFONE: _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc): _____

SEXO: () Fem () Masc

DATA NASC: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CLINICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“Estudo prospectivo da infecção pelo vírus da Hepatite C em pacientes infectados pelo HIV”

2. PESQUISADOR: *Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa*

CARGO/FUNÇÃO: *Médico Assistente*

INSC. CONS. REGIONAL Nº **52275**

UNIDADE DO HCFMUSP: *Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - Casa da AIDS*

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO MAIOR ()

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Doze meses.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Justificativa e Objetivos da pesquisa

A hepatite C e o HIV são transmitidos de forma muito parecida, portanto, é comum que alguns portadores do vírus HIV também sejam portadores do vírus da hepatite C. Essa situação pode contribuir para a progressão da doença no fígado. Além disso, a infecção pelo HIV pode ocultar (esconder) casos de infecção pelo HCV, devido ao comprometimento da imunidade (defesa) do organismo, dificultando o diagnóstico da infecção através de exames tradicionais de triagem. Dessa forma, os pacientes portadores do HIV tornam-se potenciais transmissores do vírus da hepatite C. Além disso, os pacientes portadores do vírus da hepatite C, quando identificados e tratados na fase inicial da doença, tem menor chance de pior progressão, podendo-se avaliar a melhor opção de tratamento e seguimento dos pacientes portadores desses vírus.

Dessa forma, o estudo poderá fornecer dados de prevalência da co-infecção em um serviço de saúde especializado no atendimento aos portadores de HIV, podendo, inclusive, propor medidas de prevenção; poderá também, realizar o diagnóstico precoce da Hepatite C e favorecer o tratamento na fase inicial da infecção; identificar portadores ocultos da infecção além de caracterizar o tipo de vírus presente nesses casos, auxiliando no tratamento dos pacientes.

2. Procedimentos

Para poder participar deste estudo, você precisa ser um adulto (≥ 18 anos) portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Caso você queira participar do estudo, uma amostra de seu sangue será coletada a cada três meses para que alguns exames relativos à hepatite C sejam realizados. Não haverá modificações em sua rotina normal durante o período do estudo, pois as coletas serão realizadas no momento de seu retorno periódico, não interferindo em seus horários de consulta. Sua participação no estudo é voluntária. Se você não deseja participar do estudo, não haverá qualquer modificação no seu atendimento médico na Casa da AIDS.

3. Benefícios

Além de identificar o vírus da Hepatite C nos indivíduos já portadores do HIV, esse estudo vai possibilitar que a hepatite C seja tratada mais precocemente, o que pode diminuir a chance de ocorrer uma doença mais grave no fígado.

Ressaltamos que não haverá nenhuma compensação financeira para a sua participação nesse estudo.

4. Desconforto e Riscos

Os riscos envolvidos são aqueles observados na coleta de sangue (hematoma no local da punção e/ou dor) e também na manipulação incorreta de dados e armazenamento ou manipulação das amostras coletadas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1.0 *Você terá garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimentos de qualquer dúvida.*

2.0 *Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você pode recusar a participação no estudo ou poderá descontinuar sua participação do mesmo, a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou perda dos*

benefícios aos quais de outra forma faria jus. A Dra. Maria Cássia Corrêa irá prontamente aconselhá-lo sobre as opções alternativas de seguimento ou tratamento que sejam consideradas apropriadas e o melhor meio de interromper, de forma bem ordenada, sua participação. Se você decidir interromper sua participação no estudo, você deverá entrar em contato com o as pessoas responsáveis pelo estudo no telefone (11) 3120-5290, de forma a permitir que os procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados.

3.0 Solicitamos sua autorização para a análise dos seus dados clínicos armazenados nos prontuários, tais como, dados de CD4, valores de carga viral do HIV e outros resultados de seus exames de laboratórios que constem nele. Ressaltamos que a manipulação desses dados será feita com total garantia de sigilo e confidencialidade. Estarão autorizadas a pesquisar dados em seu prontuário: Dra Regina Celia Moreira; Dra Maria Cássia Mendes-Corrêa; Vanessa Martins e Samira Julien Calux. Todas participam do estudo e garantem o sigilo dos dados. Caso os resultados deste estudo sejam publicados na literatura médica, você não será identificado nominalmente, sendo sua confidencialidade garantida em todas as ocasiões.

4.0 Caso você venha apresentar indicação de internação hospitalar ou pronto atendimento, durante o período de estudo, ela será feita preferencialmente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

5.0 Uma alíquota da sua amostra será armazenada no laboratório caso haja a necessidade de repetição de algum teste, não sendo necessária solicitação de nova coleta. Solicitamos ainda, que você autorize que sua amostra de soro fique sob a guarda dos pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz, onde serão realizados os exames de laboratórios e que, essas amostras, poderão ser utilizadas para outros estudos referentes às hepatites virais ou ao HIV.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA.

Você será incentivado a fazer perguntas, em qualquer ocasião durante o estudo. Caso você tenha perguntas sobre o estudo ou sobre seus direitos como paciente, por favor, entre em contato com a Dra. Regina Celia Moreira, Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, no telefone (11) 30682911 ou 30682994; e a Dra. Maria Cássia Jacintho M. Corrêa, Dra. na Casa da AIDS, no telefone (11) 3120-5290.

VI OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: *Nenhum*

VII CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:

Eu li este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discuti-lo com um dos membros da pesquisa. Todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu fui informado (a) sobre os riscos e benefícios e concordo de livre e espontânea vontade em participar deste estudo. Eu entendo que posso sair do estudo a qualquer momento e que isso não afetará meu tratamento futuro

São Paulo, _____ de _____ de _____ .

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

Assinatura do Investigador que obteve o Consentimento, sob carimbo.

Data ____/____/____

ANEXO 2
DOCUMENTO PARA AUTORIZAÇÃO DO USO DE AMOSTRA
BIOLÓGICA ESTOCADA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE VIROLOGIA
NÚCLEO DE DOENÇAS SANGUÍNEAS E SEXUAIS
LABORATÓRIO DE HEPATITES
Tel: 3068-2911 - E-mail: labhepsp@ial.sp.gov.br



Documento para autorização do uso de amostra biológica estocada

Eu, _____

portador do RG: _____ autorizo a utilização da minha amostra biológica colhida em _____ para o projeto “Infecção oculta pelo vírus da hepatite B em portadores de HIV”, no projeto “Estudo prospectivo do vírus da hepatite C em portadores do HIV.”, sob orientação da Dra. Regina Célia Moreira.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

Assinatura do Investigador que obteve o Consentimento, sob carimbo.

Data ____/____/____

ANEXO 3 - BANCO DE DADOS

Núm	Sexo	Idade	Data coleta 1	Data coleta 2	Sorologia 1	qPCR 1	Sorologia 2	qPCR 2	CV HIV 1	CD4 1	CV HIV 2	CD4 2	Geno
BO-1	F	59	06/06/2013	26/02/2015	R	5,46	R	6,01	1312	138	106	128	3a
BO-2	F	48	06/06/2013	26/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	433	<40	367	
BO-5	M	60	06/06/2013	25/03/2015	NR	ND	NR	ND	89	656	<40	757	
BO-6	F	44	06/06/2013	27/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	926	<40	785	
BO-7	M	47	06/06/2013	27/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	614	<40	678	
BO-8	M	45	07/06/2013	04/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	628	<40	1028	
BO-10	M	47	08/06/2013	05/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	238	<40	424	
BO-11	F	66	09/06/2013	05/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	955	<40	682	
BO-12	F	53	10/06/2013	05/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	537	<40	550	
BO-16	F	38	11/06/2013	17/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	414	<40	716	
BO-18	M	68	12/06/2013	13/11/2014	NR	ND	NR	ND	48	1353	<40	1688	
BO-22	F	47	13/06/2013	24/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	391	93154	180	
BO-23	F	67	14/06/2013	15/04/2015	NR	ND	NR	ND	44	871	196	1031	
BO-24	M	48	15/06/2013	04/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	921	<40	935	
BO-26	M	50	16/06/2013	18/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	379	<40	623	
BO-27	M	52	17/06/2013	03/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	613	<40	876	
BO-28	M	47	18/06/2013	07/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	629	<40	682	
BO-29	M	52	19/06/2013	10/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	819	<40	696	
BO-30	F	50	20/06/2013	20/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	590	<40	619	
BO-31	M	68	21/06/2013	05/05/2015	R	6,26	R	6,03	52	984	118	1001	1a
BO-32	M	58	22/06/2013	23/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	419	<40	452	
BO-33	F	53	23/06/2013	04/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	361	<40	654	
BO-35	M	55	24/06/2013	19/03/2015	NR	ND	NR	ND	96287	333	1843656	2	
BO-36	M	44	25/06/2013	22/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	983	<40	608	
BO-38	M	58	26/06/2013	18/11/2014	R	6,22	R	6,40	280	794	1065	117	1a

Núm	Sexo	Idade	Data coleta 1	Data coleta 2	Sorologia 1	qPCR 1	Sorologia 2	qPCR 2	CV HIV 1	CD4 1	CV HIV 2	CD4 2	Geno
BO-41	M	48	27/06/2013	20/01/2015	NR	2,25	NR	ND	<40	661	<40	625	
BO-42	F	56	28/06/2013	08/05/2015	R	6,74	R	6,50	<40	588	<40	611	3a
BO-43	F	44	29/06/2013	27/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	674	<40	870	
BO-44	M	43	30/06/2013	29/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1283	<40	1298	
BO-45	M	59	01/07/2013	13/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	414	<40	475	
BO-48	F	55	02/07/2013	26/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	477	<40	543	
BO-49	M	51	03/07/2013	26/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	363	<40	849	
BO-50	M	46	04/07/2013	08/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	720	<40	555	
BO-51	M	54	05/07/2013	23/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	902	<40	522	
BO-52	F	45	06/07/2013	11/11/2014	IND	ND	R	ND	<40	487	25170	309	
BO-53	F	53	07/07/2013	03/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	565	<40	699	
BO-55	F	56	08/07/2013	09/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1430	<40	1482	
BO-56	F	53	09/07/2013	08/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	811	<40	675	
BO-58	M	55	10/07/2013	09/02/2015	R	ND	R	ND	<40	528	<40	652	
BO-62	M	50	11/07/2013	29/01/2015	NR	ND	NR	ND	350	139	<40	293	
BO-63	M	55	12/07/2013	11/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	146	<40	274	
BO-64	M	47	13/07/2013	11/02/2015	R	6,80	R	6,66	2116	768	<40	978	1a
BO-65	F	64	14/07/2013	13/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	427	<40	421	
BO-66	M	55	15/07/2013	08/12/2014	NR	ND	NR	ND	6403	469	<40	704	
BO-67	M	47	16/07/2013	22/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	494	<40	503	
BO-68	F	69	17/07/2013	25/02/2015	NR	ND	NR	ND	43	1009	66	1207	
BO-69	F	60	18/07/2013	11/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	1475	<40	1118	
BO-70	M	57	19/07/2013	07/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	813	<40	739	
BO-71	F	40	20/07/2013	07/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1042	<40	879	
BO-72	M	60	21/07/2013	17/04/2015	R	6,48	R	6,28	<40	1057	<40	300	1a
BO-73	M	54	22/07/2013	16/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	806	<40	896	
BO-76	M	48	23/07/2013	26/03/2015	R	5,78	R	4,90	<40	1038	<40	906	3a
BO-77	M	51	24/07/2013	08/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	939	<40	845	
BO-78	M	50	25/07/2013	05/05/2015	NR	ND	NR	ND	<40	535	<40	510	

Núm	Sexo	Idade	Data coleta 1	Data coleta 2	Sorologia 1	qPCR 1	Sorologia 2	qPCR 2	CV HIV 1	CD4 1	CV HIV 2	CD4 2	Geno
BO-79	F	54	26/07/2013	30/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	261	<40	405	
BO-80	M	59	27/07/2013	24/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	562	<40	513	
BO-81	F	61	28/07/2013	10/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	769	<40	620	
BO-82	M	51	29/07/2013	05/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	666	<40	772	
BO-83	F	57	30/07/2013	02/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	702	<40	739	
BO-84	F	43	31/07/2013	12/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	738	<40	1040	
BO-85	M	64	01/08/2013	01/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	721	<40	1133	
BO-86	M	46	02/08/2013	27/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	719	<40	741	
BO-87	M	44	03/08/2013	15/01/2014	NR	ND	NR	ND	<40	491	<40	712	
BO-88	M	47	04/08/2013	13/11/2014	NR	ND	R	ND	<40	607	<40	1040	
BO-89	M	57	05/08/2013	03/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	475	<40	688	
BO-91	F	37	06/08/2013	19/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1349	<40	1958	
BO-92	F	55	07/08/2013	27/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1161	<40	1160	
BO-93	M	54	08/08/2013	05/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	392	<40	454	
BO-94	F	37	09/08/2013	11/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	1262	<40	1252	
BO-96	M	43	10/08/2013	26/01/2015	R	5,76	R	5,96	88	585	<40	320	1a
BO-99	F	49	11/08/2013	03/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	378	<40	493	
BO-100	F	64	12/08/2013	06/11/2014	R	ND	R	ND	<40	818	<40	565	
BO-102	M	67	13/08/2013	08/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	470	<40	834	
BO-103	M	55	14/08/2013	05/02/2015	R	6,01	R	5,94	<40	573	<40	575	1a
BO-104	M	46	15/08/2013	04/12/2014	R	5,82	R	6,09	<40	721	<40	808	1a
BO-107	F	48	16/08/2013	12/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	588	<40	457	
BO-108	M	54	17/08/2013	12/02/2015	NR	ND	NR	ND	897	500	<40	524	
BO-109	M	52	18/08/2013	25/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	398	<40	413	
BO-110	F	59	19/08/2013	10/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	563	<40	949	
BO-111	M	51	20/08/2013	27/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	581	<40	611	
BO-116	F	49	21/08/2013	26/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	1068	<40	1100	
BO-117	M	53	22/08/2013	04/05/2015	NR	ND	NR	ND	<40	563	<40	716	
BO-118	F	71	23/08/2013	20/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	967	<40	685	

Núm	Sexo	Idade	Data coleta 1	Data coleta 2	Sorologia 1	qPCR 1	Sorologia 2	qPCR 2	CV HIV 1	CD4 1	CV HIV 2	CD4 2	Geno
BO-119	M	60	24/08/2013	05/05/2015	NR	ND	NR	ND	117	718	44	1050	
BO-120	M	50	25/08/2013	19/02/2015	NR	ND	NR	ND	232	562	<40	350	
BO-122	F	67	26/08/2013	10/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	699	<40	826	
BO-123	M	58	27/08/2013	03/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	377	<40	397	
BO-124	M	43	28/08/2013	09/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	944	<40	1056	
BO-125	M	55	29/08/2013	11/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	546	<40	406	
BO-126	M	49	30/08/2013	18/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	941	<40	1020	
BO-127	M	51	31/08/2013	01/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	735	<40	937	
BO-128	F	57	01/09/2013	03/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	264	<40	285	
BO-129	F	44	02/09/2013	11/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	508	<40	537	
BO-130	M	56	03/09/2013	26/01/2015	NR	ND	NR	ND	12976	178	3909	94	
BO-131	M	53	04/09/2013	31/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1059	<40	1301	
BO-132	M	65	05/09/2013	07/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	351	<40	403	
BO-135	M	52	06/09/2013	12/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1023	<40	958	
BO-137	M	53	07/09/2013	13/01/2015	R	ND	R	ND	<40	229	<40	351	
BO-138	M	62	08/09/2013	06/05/2015	NR	ND	NR	ND	80	442	<40	514	
BO-139	M	41	09/09/2013	07/05/2015	R	6,92	R	6,35	<40	673	<40	529	2b
BO-140	F	46	10/09/2013	05/05/2015	R	6,33	R	6,68	<40	732	<40	915	1a
BO-141	F	53	11/09/2013	15/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	518	<40	597	
BO-142	M	45	12/09/2013	10/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	733	<40	904	
BO-143	M	66	13/09/2013	04/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	792	<40	608	
BO-145	M	34	14/09/2013	12/03/2015	NR	ND	NR	ND	68374	323	<40	560	
BO-146	F	54	15/09/2013	13/04/2015	NR	ND	NR	ND	71	1219	<40	808	
BO-147	F	50	16/09/2013	19/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	1439	<40	1081	
BO-149	F	57	17/09/2013	26/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	584	<40	822	
BO-150	M	66	18/09/2013	02/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	598	<40	797	
BO-151	M	44	19/09/2013	20/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	429	<40	626	
BO-152	F	57	20/09/2013	30/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	311	<40	339	
BO-153	M	75	21/09/2013	02/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	579	<40	591	

Núm	Sexo	Idade	Data coleta 1	Data coleta 2	Sorologia 1	qPCR 1	Sorologia 2	qPCR 2	CV HIV 1	CD4 1	CV HIV 2	CD4 2	Geno
BO-154	M	43	22/09/2013	09/02/2015	NR	ND	NR	ND	47378	41	<40	35	
BO-157	M	72	23/09/2013	09/04/2015	NR	ND	NR	ND	<40	368	160	365	
BO-158	M	52	24/09/2013	05/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	613	<40	708	
BO-159	M	46	25/09/2013	11/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	744	73	727	
BO-161	M	65	26/09/2013	19/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	583	<40	570	
BO-164	M	56	27/09/2013	05/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	685	<40	920	
BO-165	M	68	28/09/2013	26/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	757	<40	733	
BO-168	F	55	29/09/2013	05/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	71	<40	184	
BO-170	M	59	30/09/2013	26/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	494	<40	693	
BO-173	M	56	01/10/2013	14/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	686	<40	745	
BO-174	M	66	02/10/2013	28/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	922	<40	677	
BO-195	F	55	03/10/2013	20/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	778	<40	927	
BO-196	F	47	04/10/2013	09/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	361	<40	457	
BO-198	M	54	05/10/2013	20/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	485	<40	406	
BO-199	F	45	06/10/2013	11/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	836	<40	1160	
BO-201	M	50	07/10/2013	06/02/2015	NR	ND	NR	ND	<40	545	<40	583	
BO-202	M	55	08/10/2013	11/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	403	<40	220	
BO-203	M	43	09/10/2013	20/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1002	<40	1517	
BO-205	M	42	10/10/2013	27/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	737	<40	747	
BO-206	M	41	11/10/2013	26/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	236	<40	208	
BO-207	M	64	12/10/2013	03/03/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1176	<40	1031	
BO-208	F	55	13/10/2013	14/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	596	<40	607	
BO-209	F	49	14/10/2013	09/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	409	<40	383	
BO-210	M	45	15/10/2013	27/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	394	<40	402	
BO-211	M	56	16/10/2013	30/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	659	<40	555	
BO-213	M	54	17/10/2013	04/04/2015	R	ND	R	ND	<40	503	<40	633	
BO-214	F	44	18/10/2013	23/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	421	<40	511	
BO-215	F	32	19/10/2013	10/02/2015	NR	ND	NR	ND	2946655	965	100	686	
BO-219	F	73	20/10/2013	24/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	897	<40	774	

Núm	Sexo	Idade	Data coleta 1	Data coleta 2	Sorologia 1	qPCR 1	Sorologia 2	qPCR 2	CV HIV 1	CD4 1	CV HIV 2	CD4 2	Geno
BO-220	M	69	21/10/2013	17/11/2014	NR	ND	NR	ND	<40	550	<40	368	
BO-221	M	45	22/10/2013	27/04/2015	NR	ND	NR	ND	101	217	880	669	
BO-223	M	57	23/10/2013	12/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	1751	<40	1631	
BO-224	M	58	24/10/2013	24/11/2014	R	6,16	R	6,56	<40	536	<40	640	1a
BO-226	M	65	25/10/2013	19/01/2015	NR	ND	NR	ND	<40	386	<40	398	
BO-227	M	42	26/10/2013	10/12/2014	NR	ND	NR	ND	<40	890	<40	1034	

Título: Estudo da infecção do vírus da Hepatite C em pacientes infectados pelo HIV - Study of Hepatitis C virus infection in HIV-infected patients

Título resumido: Infecção do HCV em HIV positivos

Vanessa Cristina Martins Silva¹, Samira Julien Calux¹, Marcilio Figueiredo Lemos¹, Adriana Parise Compri¹, Ana Paula de Torres Santos¹, Clóvis Roberto Abe Constantino¹, Isabel Takano Oba¹, Maria Cassia Jacintho Mendes Correa², Regina Célia Moreira^{1*}.

1. Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais – Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz Central – Avenida Doutor Arnaldo, 355.

2. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255.

*Regina Celia Moreira

Avenida Dr Arnaldo, 355 – Pacaembu.

São Paulo – SP Cep: 01246-902

RESUMO

Objetivos: O vírus HCV e o HIV partilham a mesma forma de transmissão e, esse fato, explica a alta frequência de coinfeções. O estudo propôs determinar a frequência da infecção pelo HCV em um serviço de saúde de São Paulo; caracterizar os genótipos das cepas virais detectadas; monitorar episódios de flutuação de marcadores sorológicos e moleculares e detectar possíveis casos de infecção oculta do HCV nos pacientes HIV positivos.

Métodos: O estudo envolveu de 147 pacientes infectados pelo HIV atendidos no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS, com amostras colhidas periodicamente durante o período de junho de 2013 a junho de 2015. As amostras foram triadas por sorologia baseada na detecção de anticorpos anti-HCV utilizando-se kits comerciais. As amostras foram, posteriormente, analisadas pelo teste de PCR em tempo real para a quantificação viral e sequenciamento para identificação genotípica. Foram analisados prontuários para complementação dos dados obtidos.

Resultados: Foi observada frequência de exposição ao vírus HCV em de 13,6% (20/147) e 9,5% (14/147) possuíam carga viral detectada em pelo menos uma das coletas realizadas. Do total, 87,1% (128/147) mantiveram resultado negativo em ambos os testes e nas duas coletas. O genótipo predominante foi o 1a, 69% (9/13), seguido pelo genótipo 3a, 23% (3/13) e genótipo 2b, 8% (1/13). Observou-se flutuação nos resultados dos testes sorológicos em 20% (4/20) dos pacientes.

Conclusão: O presente trabalho forneceu dados epidemiológicos e clínicos importantes à saúde pública, alertando, principalmente, sobre a importância do monitoramento periódico de pacientes coinfectados.

Palavras chave: coinfeção, Hepatite C, vírus da imunodeficiência humana.

INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo. Existe grande variação na prevalência da infecção pelo vírus de acordo com a região geográfica estudada, refletindo não só características epidemiológicas distintas entre as populações, mas diferenças nas metodologias utilizadas para a realização das estimativas¹.

Estima-se que 130 a 150 milhões de indivíduos possuem infecção crônica pelo HCV, com risco de desenvolver as complicações da doença. O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10%².

Estima-se que a taxa de prevalência da infecção pelo HIV, na população de 15 a 49 anos mantém-se estável em 0,6% desde 2004, sendo 0,4% entre as mulheres e 0,8% entre os homens. Em relação aos grupos populacionais em situação de maior vulnerabilidade, com mais de 18 anos, estudos realizados em 10 municípios brasileiros, entre 2008 e 2009, estimaram taxas de prevalências de HIV de 5,9% entre usuários de drogas ilícitas, de 10,5% entre homens que fazem sexo com homens, e de 4,9% entre mulheres profissionais do sexo³.

No Brasil, aproximadamente 0,5% da população adulta está infectada pelo HIV e, entre aqueles que compareceram aos serviços públicos de saúde para atendimento ambulatorial, 16% estão também coinfectedados com o HCV. Dos indivíduos atendidos nos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) 42% apresentavam-se coinfectedados, assim como 54% dos atendidos em clínicas de doenças infecciosas⁴.

O presente estudo discorre sobre o diagnóstico das infecções pelo vírus da hepatite C em indivíduos infectados pelo HIV devido à importância epidemiológica dos casos de coinfeção HIV/HCV.

MÉTODOS:

Pacientes e amostras clínicas:

Inicialmente os pacientes foram recrutados, de um estudo anterior composto por 169 amostras aleatórias de pacientes acima de 18 anos, infectados pelo HIV em atendimento no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS SEAP, durante o período de junho de 2013 a maio de 2014.

Após aprovação do comitê de ética em pesquisa para a realização da segunda etapa das coletas de sangue dos pacientes, foi realizado um levantamento dos agendamentos de consulta dos pacientes envolvidos, e um novo TCLE foi apresentado na data de consulta e, aqueles que concordaram, fizeram parte de nossa casuística. O período de realização das entrevistas e coletas de sangue foi de novembro de 2014 e junho de 2015.

Dos 169 pacientes, cinco não possuíam agendamento de consulta, oito não possuíam mais registro no serviço. Foram entrevistados 156 pacientes, sendo que oito deles não concordaram em participar do estudo e, de um paciente, não foi possível realizar a punção, incluindo-se, assim, 147 pacientes que foram acompanhados durante o estudo.

Diagnóstico sorológico:

Inicialmente, foi realizada uma triagem sorológica das amostras obtidas, utilizando-se kit comercial Murex anti-HCV-*version* 4.0[®], registrado e liberado pelo Ministério da Saúde

Diagnóstico molecular:

Todas as amostras foram, também, analisadas pelo teste PCR em tempo real, utilizando-se o ensaio Abbott *Real Time* HCV[®], independentemente dos resultados obtidos na sorologia, para que pudesse ser observada a evidências sorológicas ou infecção oculta nesses pacientes.

As amostras positivas no ensaio quantitativo foram também submetidas à RT-PCR "in house", para a caracterização dos genótipos virais.

Realizou-se a classificação dos genótipos pela comparação do alinhamento das sequências de aminoácidos obtidas com sequências já conhecidas dos diferentes genótipos do HCV depositadas no *Genbank*. Para estas análises foram utilizados os programas *Sequence Scanner Software* (Life Technologies[®]).

A classificação dos genótipos foi confirmada pela ferramenta *Genotyping* disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>.

Análise de prontuários:

Foi realizada análise de prontuários dos pacientes para complementação de dados.

Aspectos éticos:

Todos os procedimentos descritos nesse projeto foram iniciados após a aprovação do comitê de ética das Instituições participantes. Foram tomadas todas as providências para garantir a integridade física e moral de todos os pacientes envolvidos.

Também foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aos pacientes que participaram do projeto, aprovado previamente pelo comitê. O termo foi elaborado de forma clara e sucinta com a preocupação com o bem estar dos pacientes, assim como a garantia de confidencialidade dos resultados, sem causar prejuízo a nenhum dos participantes.

RESULTADOS

Foram acompanhados 147 pacientes, recrutados na data de atendimento no SEAP.

Participaram 95 (65%) pacientes do gênero masculino e 52 (35%) do gênero feminino. A faixa etária predominante foi de 50-59 anos (46%).

Dos 147 pacientes observou-se frequência de exposição ao vírus HCV em 13,6% (20/147) dos pacientes e 9,5% (14/147) possuíam carga viral detectada em, pelo menos, uma das coletas realizadas.

Das 14 amostras com carga viral positiva, foi possível realizar a genotipagem de 13 delas por sequenciamento. O genótipo predominante foi o 1a, 69% (9/13), seguido pelo genótipo 3a, 23% (3/13,) e o genótipo 2b, 8% (1/13).

Resultados discordantes foram observados, por exemplo: o paciente 41 apresentou resultado não reagente na sorologia, nas duas amostras analisadas, porém, foi detectada carga viral de 177 UI/mL (Log 2,25) na primeira amostra.

Além deste, o paciente 52 apresentou resultado indeterminado para sorologia na primeira coleta e positivo na segunda, mantendo carga viral não detectada em ambas as amostras. O paciente 88, o qual teve resultado não reagente na sorologia da primeira amostra, apresentou resultado reagente na segunda, mantendo o resultado de carga viral não detectada.

O valor em Log da média da carga viral das amostras da primeira coleta foi de 5,92, enquanto a média dos valores da segunda coleta foi de 5,74. No período do estudo, não foram observadas alterações significativas nos valores de carga viral dos pacientes analisados, ou seja, não detectamos pacientes com variação acima de 1 Log na quantificação.

Foram encontrados quatro pacientes (20%) com flutuação na sorologia, intercalando resultados reagentes e não reagentes ou indeterminados durante o acompanhamento no serviço.

Esses pacientes não possuem genotipagem do HCV, pois não apresentaram carga viral em nenhuma das coletas ou em exames realizados anteriormente.

A figura 1 apresenta a relação entre os resultados dos exames dos pacientes onde se observou flutuação de marcadores sorológicos.

O paciente 41 apresentou carga viral detectada apenas na primeira coleta, porém manteve resultado não reagente na sorologia, inclusive em exames realizados anteriormente, nos anos de 2006 até 2015.

Na terceira coleta realizada em março de 2016 apresentou resultado não reagente para sorologia e carga viral não detectada para o HCV.

Durante esse período, o paciente manteve a contagem de linfócitos T CD4 acima de 350 células/mm³ em todas as análises e carga viral do HIV detectada apenas no período de 2006 à 2009. Não havia nenhum resultado anterior de exame de quantificação da carga viral do HCV no prontuário.

DISCUSSÃO

No Brasil, recentemente foi realizado um estudo de base populacional entre os residentes das capitais dos estados brasileiros e do distrito federal, pelo Ministério da Saúde, onde foi detectada a prevalência do HCV de 1,38%⁵.

No Brasil, aproximadamente 0,5% da população adulta está infectada pelo HIV, sendo que, destas, 16% estão também coinfectedados pelo HCV. Dos indivíduos atendidos nos CTA 42% apresentavam-se coinfectedados, assim como 54% dos atendidos em clínicas de doenças infecciosas⁴.

Importante ressaltar que a coinfeção HIV/HCV colabora para pior progressão de doença hepática, além de ser considerada uma das maiores causas de morte em pacientes infectados pelo HIV. Do mesmo modo, pode aumentar o risco de transmissão da doença, sendo necessário acompanhamento e monitoramento desses pacientes, com o objetivo de diminuir os riscos citados⁶.

No presente trabalho, foi observada frequência de exposição ao HCV, na população estudada, de 13,6%. Observa-se que esse índice é de 10 vezes maior quando comparados com os dados populacionais em população mono infectada pelo HCV. Van de Laar⁷ (2010) e Carvalho⁸ (2006) também observaram dados semelhantes aos desse estudo.

A casuística desse estudo foi baseada na obtenção aleatória de amostras de pacientes do serviço estudado, para que não houvesse viés de seleção. Os resultados indicam que a estimativa de prevalência foi bastante adequada, uma vez que o resultado obtido na análise dos 147 casos mostrou prevalência de 13,6% (20/147), dentro de um IC 95% tem-se uma prevalência entre 8,5% e 20,3%, um erro amostral estimado em aproximadamente 6%. Isso significa que a amostragem foi suficientemente grande para estimar uma prevalência esperada de, no mínimo, 8,5%. Dessa forma, a amostra foi suficiente para estimar a prevalência esperada dentro de um erro aleatório admissível, considerando o não cometimento de viés de seleção.

Mendes-Corrêa⁹ (2001) observou prevalência de 17,7% ao estudar 155 pacientes coinfectedados. Admitindo-se um erro amostral de 5% (prevalência mínima de 12,7%), levaria a uma amostra estimada de 224 indivíduos e, considerando um erro de 6% o número de amostras de pesquisadas foi suficiente para determinar a prevalência com segurança, uma vez que a prevalência mínima seria de 12,7%. Esses dados corroboram com a amostragem e com os resultados obtidos em nosso estudo.

A maior frequência do HCV foi observada entre os indivíduos do gênero masculino e faixa etária de 50-59 anos, corroborando com dados encontrados na literatura. Em relação aos dados de coinfeções HIV/HCV, o Boletim Epidemiológico de DST/AIDS e Hepatites virais do Ministério da Saúde de

2012, relatou prevalência da coinfeção em pacientes com faixa etária entre 40-49 anos no ano de 2010¹⁰. A ocorrência da hepatite crônica nessa faixa etária pode ser explicada pela falta de monitoramento anterior, como esterilização de materiais, falta da triagem do vírus HCV nos bancos de sangue e o rastreamento em grupos de risco, não utilização de preservativos e a infecção pelo HIV¹¹.

A genotipagem do HCV é importante para fornecer dados epidemiológicos, mas, também, para se definir e orientar o clínico quanto à droga a ser utilizada e o tempo de administração.

No presente estudo, foi observada prevalência do genótipo 1 (69%), seguido pelos genótipos 3 (23%) e 2 (8%), corroborando com estudos de Martins¹² (2006), Lopes¹³ (2009) e Carvalho¹⁴ (2014).

Os pacientes que apresentaram carga viral positiva para HCV (14/147) não tiveram alterações significativas no Log entre o período das coletas, com exceção do paciente 41 que não apresentou resultado reagente na sorologia e será discutido adiante. Destes, três pacientes possuíam contagem de linfócitos T CD4 < 350 células/mm³, considerado fator importante para a progressão do HCV em coinfectados^{15,16}.

Estudo de Dieterich¹⁷ (1999) demonstra que a coinfeção pode ser deletéria para as duas infecções, ou seja, o HIV é importante co-fator para a progressão da hepatopatia causada pelo HCV, aumentando a viremia e acelerando a progressão para cirrose. Por outro lado, o HCV parece acelerar a progressão da infecção pelo HIV, favorecendo o aumento da carga viral e a redução dos linfócitos T CD4.

No estudo, não foi observada correlação significativa entre a carga viral do HCV e a contagem de linfócitos T CD4. Porém, todos os pacientes faziam uso de antirretrovirais no momento das coletas, podendo justificar o controle da infecção pelo HIV e consequente manutenção do sistema imunológico.

Diversos autores como Afdhal¹⁸ (2004) e Hoofnagle¹⁹ (2002) sugerem que a cronificação da hepatite C ocorre entre 75-85% dos casos. Dessa forma a resolução da infecção pelo HCV pode ocorrer de 15-25% da população infectada. Na população estudada, 30% (6/20) dos pacientes infectados foram identificados com esse perfil.

Durante a análise de prontuários, também foram identificados pacientes com alterações nos resultados de sorologia. A flutuação da sorologia foi observada, com episódios reagentes e não reagentes em diferentes análises, mesmo em intervalos muito pequenos entre a coleta das amostras. Importante ressaltar que os pacientes que apresentaram flutuação da sorologia não haviam sido submetidos ao tratamento para HCV.

Esse fato é comumente encontrado em pacientes imunossuprimidos. De acordo com estudos de Moreira²⁰ (2003) e Mendes-Corrêa⁶ (2000), a imunossupressão pode alterar a concentração de anticorpos totais, impedindo que estes sejam detectados nos exames sorológicos, onde os alvos do ensaio são apenas anticorpos. Entretanto, os pacientes encontravam-se com infecção pelo HIV controlada, com altos níveis de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV não detectada.

Ressalta-se que, a flutuação na sorologia pode resultar em um diagnóstico incorreto, o que pode prejudicar o diagnóstico do paciente e torná-lo possível fonte de infecção. Segundo Bueno²¹ (2012), resultados falso positivo ou negativo podem ocorrer dependendo da performance e diferentes

índices de sensibilidade do kit utilizado, devido a razões biológicas (anticorpos inespecíficos/ reações cruzadas) ou período de infecção recente, que ainda não desenvolveu anticorpos.

Estudos apontam que a prevalência da coinfeção pode ser subestimada, devido à flutuação da sorologia em pacientes HIV positivos, ou ainda pelo clareamento viral espontâneo²².

Nas figura 1, pode-se observar que quatro dos pacientes estudados – CO 52, 88, 137 e 213 - apresentaram características de flutuação nos resultados da sorologia. Os quatro apresentaram pelo menos um resultado positivo e com carga viral não detectada.

O paciente 52 apresentou resultado reagente em 2 análises em 1995 e 2009, apresentando resultado indeterminado em 2013 e não reagente em outubro de 2014. Logo após, em novembro de 2014 voltou a apresentar resultado reagente, mantendo-o em mais 3 sorologias. O paciente foi procurado em novembro de 2015, aceitou colaborar com uma nova coleta de sangue e, novamente, o resultado foi não reagente. Esse perfil é o típico de um paciente com flutuação sorológica, quando o clínico não consegue determinar a real condição desse indivíduo e várias repetições dos testes se fazem necessárias.

No paciente 88, durante a fase do estudo não foi possível quantificar o HCV-RNA, possivelmente por concentração viral abaixo do limite de detecção do teste utilizado, ou mesmo pela baixa concentração viral no soro do paciente.

Foi observado apenas um resultado de sorologia reagente. Dessa forma, não pode ser descartada a possibilidade de outro caso de flutuação de marcador sorológico, ou mesmo falso positivo, sendo necessário acompanhamento desse paciente. Pode ser evidenciada também, a ocorrência de oscilação em resultados de sorologia devido à leitura estar muito próxima do *cut off*, podendo apresentar resultados distintos em amostras clínicas²³.

Resultados semelhantes ao do paciente 52 se repetem nos pacientes 137 e 213. O paciente 137 apresentou resultado reagente na sorologia, com DO/CO de 5,27 e, durante o acompanhamento, variações nos resultados surgiram com desaparecimento e reaparecimento de anticorpos no ano de 2013. Durante o nosso estudo, detectamos anticorpos em duas amostras colhidas em 2015, período em que também foram detectados anticorpos não reagentes. Os resultados do paciente 213 é bastante semelhante ao anterior, pois ele apresentou resultados reagentes e não reagentes durante o período de acompanhamento no serviço. Em amostras colhidas em 2014 e 2015 observamos picos de valores de DO/CO com queda em uma das amostras.

Poder-se-ia concluir que esses resultados fossem erros de anotações no prontuário ou utilização de kits sorológicos de procedência duvidosa, porém não se pode deixar de lembrar que esse estudo foi realizado com pacientes, de um serviço de saúde especializado com atendimento de excelência aos pacientes infectados pelo HIV e que, muitas vezes, servem de referência para outros serviços. Não há dúvidas no rigor do diagnóstico desse serviço de saúde.

Os pacientes com resultados flutuantes, tanto nos resultados da sorologia como nos resultados dos testes moleculares, devem ser analisados com bastante cautela, pois, como discutido anteriormente, a qualidade dos insumos, a análise técnica, período de coleta das amostras, devem sempre ser analisadas para, além de garantir a qualidade do diagnóstico do paciente,

fornecer dados fidedignos à epidemiologia.

Esse trabalho propôs estudar a presença de flutuações em pacientes infectados por HIV exatamente para alertar sobre a dificuldade de análise de pacientes imunossuprimidos que, na maioria das vezes, será triado com um único teste e, esse fato pode não ser suficiente para fechar o diagnóstico ou influenciar na interpretação da triagem. Deverá ser um alerta aos serviços de saúde e para as vigilâncias epidemiológicas.

Observando os resultados apresentados, estes pacientes devem ser acompanhados periodicamente em consultas posteriores para verificar se ocorre a presença de RNA viral e manutenção da sorologia reagente.

O paciente 41 apresentou carga viral do HCV detectada em uma única dosagem, porém seus resultados de sorologia, inclusive em exames anteriores, não apresentaram resultado reagente. Apesar de serem necessárias novas amostras para confirmação dos resultados, esse perfil sugere infecção oculta pelo HCV. Este seria, por definição, a caracterização da hepatite C oculta, sorologia não reagente com carga viral em concentração baixa (Quiroga, 2009). Porém, não podemos deixar de levantar a hipótese de resultado falso positivo, difícil ocorrer em técnicas moleculares, mas não impossível. Não podemos descartar a suspeita da hepatite oculta e lembrar que esses pacientes devem sempre ser monitorados, com pesquisa de anticorpos e do RNA, por serem possíveis fontes de infecção.

Wooley e colaboradores²³ (1999) analisaram 52 pacientes infectados pelo HIV e observaram que 35% desses pacientes apresentaram HCV-RNA sem sorologia reagente.

Estudo de Beld²⁴ (1999) indica que na infecção primária pelo HCV nem sempre ocorre o aparecimento rápido de anticorpos e sugere que níveis baixos de RNA podem atrasar ou mesmo não provocar a resposta imune.

Importante ressaltar que esses pacientes podem se tornar possíveis fontes transmissoras do HCV em pacientes infectados pelo HIV, sendo de grande importância epidemiológica o rastreamento e acompanhamento desses pacientes.

O diagnóstico ainda na fase inicial é favorável, onde estudos demonstram maior facilidade no manejo dos pacientes e maiores taxas de resposta virológica sustentada ao tratamento²⁵. Além disso, os pacientes encontram-se com infecção pelo HIV estabilizada, com níveis de linfócitos T CD4 altos e carga viral indetectada, fator também favorável para o manejo desses pacientes. Dessa forma, é provável que a melhor forma de avaliar esses pacientes é combinar ensaios sorológicos e moleculares, visando diminuir o risco de disseminação da infecção pelo HCV, considerando que estes ensaios podem apresentar efeito sinérgico²⁰.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflitos de interesse na produção da pesquisa.

SUPORTE FINANCEIRO

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

BIBLIOGRAFIA

1. Martins T, Schiavon N, Luz J, de Lucca L. **Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C**. Rev. Assoc. Med. Bras, 2011. vol.57, n.1, pp. 107-112. ISSN 0104-4230.
2. World and Helth Organization (WHO). **Hepatitis C**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 03 jan. 2016.
3. Ministério da Saúde (MS). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília - Df, 2011. 103 p. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_hepatite_c_2011_retificado.pdf>. Acesso em: 01.out.2012.
4. Wolff FH, Fuchs SC, Barcellos NN, de Alencastro PR, Ikeda ML, Brandão AB, Falavigna M, Fuchs FD. **Co-infection by hepatitis C virus in HIV-infected patients in southern Brazil: genotype distribution and clinical correlates**. PLoS One; 2010. 5;5(5):e10494.;
5. Pereira LM, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, Figueiredo GM, et al. **Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study**. BMC Infectious Diseases [online]. 2013. ISSN: 1471-2334 v.13, p.60.
6. Mendes-Corrêa MCJ, Barone AA, Cavalheiro N de P; Tengan, FM, Guastini C. **Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in São Paulo, Brazil**. Rev. Inst. Med. trop. 2000. S. Paulo, 42(2): 81-85.
7. Van de Laar TJ, Matthews GV, Prins M, Danta M. **Acute hepatitis C in HIV-infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection**. AIDS 31;24(12):1799-812; 2010.
8. Carvalho FHP, Silva ANMR, Mello HRL, Coêlho MRD. **Prevalence anti-HCV among HIV seropositive patients**. Ver. Paraense de Medicina, 2006. v. 20, n. 3, p. 11-13.
9. Mendes-Corrêa MC, Barone AA, Guastini C. **Hepatitis C vírus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection**. Rev Inst Med Trop; 2001. S. Paulo, 43:15–9.
10. Ministério da Saúde (MS). **Boletim epidemiológico – Hepatites virais**. Brasília - DF, 2012. 176p. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim_epidemiol_gico_hepatites_virais_2012_ve_12026.pdf. Acesso em: 09. Jun.2015

11. Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ. **Current and emerging infectious risks of blood transfusions.** JAMA. 2003. Feb 26;289(8):959-62.
12. Martins RMB, Teles AS, Freitas NR, et al. **Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]. 2006. vol.48, n.1, pp. 53-55. ISSN 1678-9946.
13. Lopes CLR, Teles SA, Espirito-Santo MP, et al. **Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas.** Rev. Saúde Pública [online]. 2014. vol.43, suppl.1, pp. 43-50. ISSN 0034-8910.
14. Carvalho AC, Junior JLP, Silva MFO, Neto SGS. **Perfil genotípico da hepatite C em um laboratório público do estado do Piauí.** R. Interd. 2014. V. 7, n. 3, p. 55-60.
15. Sabin CA, Telfer P, Phillips NA, Bhagani S, Lee CA. **The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men.** J Infect Dis; 1997. 175:164-8.
16. Sulkowski MS, Mast EE, Seeff LB, Thomas DL. **Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus.** Clin Infect Dis; 2000. 30:s77-s84.
17. Dieterich DT. **Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in co-infection.** Am J Med; 1999. 107:79s-84s.
18. Afdhal NH. **The natural history of hepatitis C.** Sem. Liver. Dis., 2004. v. 24 (supl 2), p. 3-8.
19. Hoofnagle JH. **Course and outcome of hepatitis C.** Hepatol, 2002. v. 36 (supl 1), p. S21-S29.
20. Moreira RC, Pinho JR, Fares J, Oba IT, Cardoso MR, Saraceni CP, Granato C. **Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies.** Can. J. microbiol, 2003.9(8):503-7.
21. Bueno L. **A contribuição do voto de autoexclusão na segurança transfusional.** Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2012. 61p.
22. Spengler U, Rockstroh JK. **Hepatitis C in the patient with human immunodeficiency virus infection.** J. Hepat., 1998. 85: 1023-1030.

23. Wooley I, Valdez H, Horsch A, et al. **Prevalence of unrecognized hepatitis B and C infections in AIDS patients with abnormal liver function tests.** In: Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, 1999. Program and abstracts. Abstract 189, Chicago.
24. Beld M, Penning M, Van Putten M, Van Den Hoek A, Damen M, Klein MR, Goudsmit J. **Low levels of hepatitis C virus RNA in serum, plasma and peripheral blood mononuclear cells of injecting drug users during long antibody-undetectable periods before seroconversion.** *Blood*, 1999. Aug 15;94(4): 1183-91.
25. Strauss E. **Hepatitis C.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, [online]. 2001. vol.34, n.1, pp. 69-82. ISSN 1678-9849.

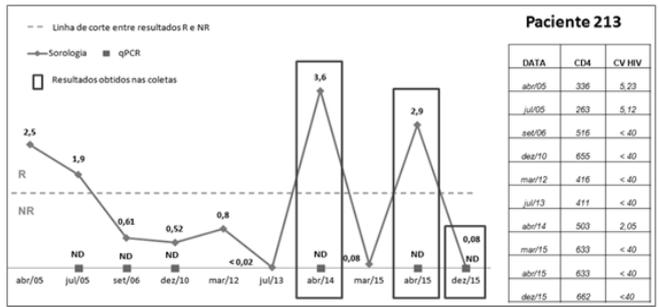
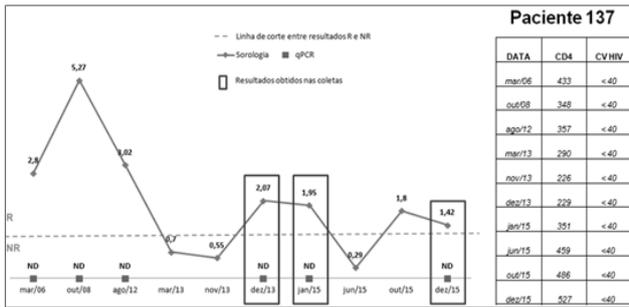
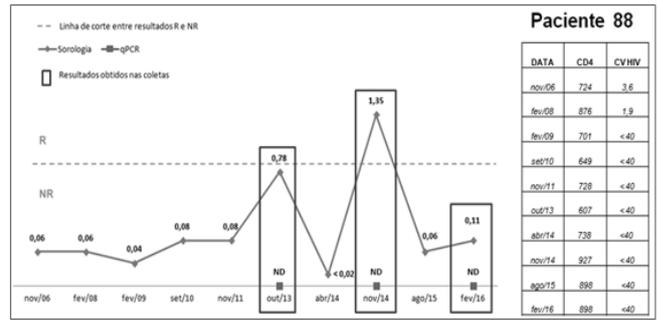
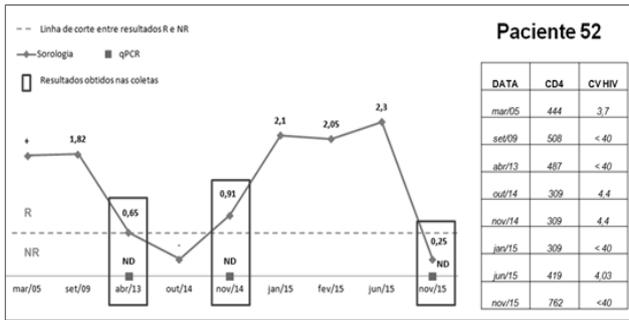


Figura 1: Relação entre os resultados de exames dos pacientes (R: reagente, NR: não reagente, ND: não detectado, CV HIV: carga viral de HIV, qPCR: PCR quantitativa de HCV).

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo prospectivo da infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes infectados pelo HIV

Pesquisador: Regina Célia Moreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28940314.3.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 663.499

Data da Relatoria: 15/05/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional, prospectivo, visando analisar aspectos de epidemiologia molecular e sorológicos da infecção pelo HCV em indivíduos adultos, co-infectados pelo HIV.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário

Conhecer a prevalência da infecção pelo HCV em pessoas infectadas pelo HIV em um serviço de saúde na cidade de São Paulo.

Objetivos secundários

- Identificar soroconversão para o HCV precocemente em pacientes HIV positivos.
- Detectar possíveis casos de infecção oculta do HCV nos pacientes HIV positivos.
- Monitorar episódios de flutuação do RNA do HCV na população estudada.
- Caracterizar os genótipos das cepas de HCV virais detectadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Foram acrescentados, além dos riscos associados a coleta de sangue, aqueles relacionados a manipulação de dados e amostras biológicas.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 663.499

Benefícios

Nada a acrescentar ao "Parecer consubstanciado do CEP" de 25/04/2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre as respostas às pendências apontadas no "Parecer consubstanciado do CEP" de 25/04/2014.

-O item "desenho" teve sua redação corrigida, e está adequado à proposta apresentada.

-As divergências sobre o período de execução do estudo foram corrigidas.

-O item "desfecho" foi preenchido como "não se aplica", acatando a orientação dada.

-Os tipos de dados e os responsáveis pelo acesso aos prontuários foram esclarecidos.

-Não houve alteração no item "critério de exclusão", como sugerido; fato esse que não compromete esta análise ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE

O texto foi revisado e está de acordo com a Resolução CNS 466/2012.

O texto do terceiro parágrafo onde se afirmava que o CEP teria acesso ao prontuário para "verificação dos procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados" foi retirado do documento.

O suporte assistencial foi estendido para condições que exijam pronto atendimento.

Outras sugestões foram aceitas.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências, adequações de texto e recomendações apontadas no "Parecer consubstanciado do CEP" de 25/04/2014 foram satisfatoriamente respondidas e atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 663.499

pelo colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 15 de maio de 2014.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 27 de Maio de 2014

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br