

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:NEFROLOGIA

ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C EM
PACIENTES EM TRATAMENTO HEMODIALÍTICO CRÔNICO

Roseméri Isabel da Silveira Nunes

Orientador: Prof. Roberto Manfro

Porto Alegre, 1997

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Roberto Ceratti Manfro, por seu empenho e competência em conduzir a orientação deste estudo.
- Ao Dr. Carlos Alberto Prompt, por ter me aberto as portas do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Ao Dr. Péricles Serafim Sarturi, por seu incentivo e seu exemplo de mestre.
- Ao Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Dr. Luis Fernando Jobim, Marta Bergman Senger, Maria Clara Medina Corrêa, Marisa Chesky e Rosana Scalco pela realização dos ELISAs e PCRs.
- As enfermeiras Cássia Morsch dos Santos, Laura Helena Ilha, Adriana Tessari, Vera Elghes, Sinaia Canhada, Gláucia Trevisan, Kátia Tollotti e Neiva Santos pela coleta das amostras de material.
- Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da UFRGS.
- Ao Dr. Mário Edgar Wagner, pela análise estatística.
- A Prof^a Adriane Cheski pela revisão do português.
- Aos colegas nefrologistas das Unidades de Diálise de onde se obtiveram os dados.
- Aos pacientes, sem vocês, certamente este estudo não teria existido.
- A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida para a realização deste estudo.
- Aos meus pais, Darcy e Sélia, pelo incentivo, mesmo a distância.
- Ao Gérson, pelo carinho e compreensão de sempre....

ÍNDICE

i. Lista de Abreviaturas

ii. Lista de Figuras

iii. Lista de Quadros

iv. Lista de Tabelas

1. Introdução	01
1.1. Estrutura do Vírus	03
1.2. Classificação	05
1.3. História Natural	08
1.4. Epidemiologia	10
1.5. Testes diagnósticos para a detecção	11
2. Objetivos	16
3. Pacientes e Métodos	17
3.1. Pacientes	17
3.2. Métodos	18
3.3. Análise Estatística	26
4. Resultados	27
4.1. Características da Amostra	27
4.2. Perdas no seguimento	28
4.3. Concomitância de infecção por vírus da Hepatite B	28
4.4. Transfusões sangüíneas prévia ao período dialítico	28
4.5. Transfusões sangüíneas durante o seguimento	30
4.6. Níveis de Transaminases	33
4.7. Correlação entre viremia e presença de anti-HCV	34
4.8. Soroconversão do anti-HCV durante período de estudo	35
4.9. Relação Prevalência-Incidência	36
5. Discussão	38
5.1. Aspectos Gerais	38
5.2. Características e representatividade da amostra	41
5.3. Papel das transfusões sangüíneas	43
5.4. Níveis das transaminases	46
5.5. Viremia	46
5.6. Incidência	49
5.7. Relação Prevalência – Incidência	53
6. Conclusões	55
7. Resumo	56
8. Summary	57
9. Referências Bibliográficas	58
10. Anexo	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
anti-HBS	Anticorpo contra superfície do vírus da hepatite B
anti-Hbe	Anticorpo contra a partícula e do vírus da hepatite B
anti-HBc	Anticorpo contra o core do vírus da hepatite B
CAPD	Diálise peritoneal ambulatorial contínua
CCPD	Diálise peritoneal contínua por cicladora
DNA	Ácido desoxi-ribonuclêico
DNAc	Ácido desoxi-ribonuclêico complementar
DM	Diabete Melitus
DPI	Diálise peritoneal intermitente
ELISA	Ensaio por imunosorvente ligado a enzima
HbsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HbeAg	Antígeno e do vírus da hepatite B
HbcAg	Antígeno do nucleocapsídeo("core") do vírus B
HCV	Vírus da hepatite C
HPT	Hepatite pós- transfusional
HNANB	Hepatite não-A, não-B
IRC	Insuficiência renal crônica
5'NCR	Região 5' não-traduzida
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCV-RNA	RNA do vírus da hepatite C
PCR	Reação de polimezização em cadeia
RIBA	Ensaio imunoblot recombinante
ORF	"Molde de leitura aberta" (open reading frame)
OPD	O-fenilediamina
RNA	Ácido ribonucléico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Proteínas estruturais (c22) e não estruturais (5-1-1, c100, c33c, NS5) do vírus da hepatite C usados nos testes ELISA de 1^a- 2^a e 3^a gerações para detecção do anticorpo anti-HCV. **B)** Organização do RNA genômico do HCV.

Figura 2. Percentagem de pacientes que permanecem anti-HCV negativos no período de seguimento.

Figura 3. Infecção pelo vírus da Hepatite C. Correlação prevalência-incidência.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Nomenclaturas propostas para a classificação dos diferentes genótipos do HCV.

QUADRO 2. Dados demográficos da amostra.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Presença de transfusões sangüíneas prévias ao período dialítico e desenvolvimento de anticorpos anti-HCV analisadas em todos os pacientes do estudo.

Tabela 1.2. Presença de transfusões sangüíneas prévias ao período dialítico e desenvolvimento de anticorpos anti-HCV, analisados nos pacientes que completaram os 24 meses de seguimento.

Tabela 2.1. Transfusões sangüíneas no período dialítico e desenvolvimento de anticorpos anti-HCV analisados em todos os pacientes da coorte.

Tabela 2.2. Transfusões sangüíneas no período dialítico e desenvolvimento de anticorpos anti-HCV somente nos pacientes que completaram os 24 meses de seguimento.

Tabela 3. Associação entre transfusões no período pré-dialítico e em diálise.

Tabela 4. Anti-HCV – Transaminases séricas

Tabela 5. Relação entre viremia e o anticorpo anti-HCV.

Tabela 6. Soroconversão para anti-HCV positivo durante o período de 24 meses.

Tabela 7. Relação entre prevalência e a incidência de anticorpos anti-HCV em pacientes mantidos em hemodiálise crônica.

1. INTRODUÇÃO

No início da década de 70, foram estabelecidas várias relações entre hepatite e o então chamado antígeno Austrália (GILES et al, 1979). O encontro das partículas de Dane, a caracterização dos antígenos virais (HBsAg,HBcAg), assim como o papel dos anticorpos, anti-HBe e anti- HBs, aliados a descoberta do HBeAg e seu anticorpo específico, anti-HBe (MAGNIUS et al, 1972), produziram significativos avanços no entendimento da biologia da infecção pelo vírus da Hepatite B.

O rastreamento do antígeno de superfície do vírus da hepatite B, HBsAg, nos bancos de sangue, levou a uma diminuição significativa das hepatites pós-transfusionais (HPT) nos EUA (PRINCE et al,1974). Os casos residuais de HPT foram atribuídos à pouca sensibilidade dos testes então empregados (ALTER, 1990).

Neste mesmo período isolou-se o vírus da Hepatite A e, paralelamente, ficou estabelecido o seu não envolvimento nas HPT (DIENSTAG et al. 1977). Entretanto, Prince e colaboradores (1974), detectaram o surgimento de HPT em 70% dos receptores de sangue que eram sorologicamente negativos para marcadores da hepatite B. Nesta ocasião, levantou-se a hipótese de que outro vírus hepatotrófico, talvez um vírus C, fosse o causador destas hepatites pós-transfusionais, não-A, não-B nestes indivíduos.

A busca da caracterização de outro agente etiológico para as HPT foi intensa. Foi demonstrado um novo sistema antígeno-anticorpo associado a

Hepatite por vírus B, onde um antígeno, denominado antígeno delta, era encontrado no núcleo de hepatócitos de pacientes com hepatite crônica por vírus B, mas que não se mostrou capaz de responder pela etiologia das hepatites Não-A, Não-B (HNANB) e pela sua alta frequência de transmissão nas transfusões sanguíneas (RIZZETO et al, 1977 e ROSINA et al, 1985).

No final da década de 80, nos EUA, partindo do plasma de chimpanzés infectados pelo agente da HNANB, isolou-se um clone de DNA complementar do vírus da hepatite C. Para tal, foi construída uma “biblioteca” de DNA que, reagindo com o soro de pacientes com HNANB crônica, permitiu o isolamento deste clone. Ficou determinado que ele era derivado de moléculas de RNA presentes em indivíduos portadores de HNANB, não sendo, no entanto, derivado do DNA hospedeiro. Na evolução destes trabalhos, chegou-se à determinação do genoma do vírus C, que será descrito mais adiante. (CHOO et al, 1989),

A descoberta do vírus da hepatite C, vinte e quatro anos após ter sido relatado o encontro do antígeno Austrália e 16 anos após a descoberta do vírus da hepatite A, produziu significativos avanços nos conhecimentos a respeito da etiologia das hepatites pós-transfusionais. Atualmente, o vírus da Hepatite C é o agente etiológico mais frequente das HNANB (GONÇALVES Jr, & BARRAVIERA, 1995). No entanto, descobertas recentes, como a do vírus da hepatite G, mantém em aberto a possibilidade de que novos agentes etiológicos virais ou não, possam vir a tornar ainda mais complexo este vasto campo de estudo (ALTER et al, 1997 e ALTER & BRADLEY, 1995).

1.1. ESTRUTURA DO VIRUS

As características estruturais do vírus da Hepatite C (HCV) são conhecidas a partir da transmissão do mesmo a chimpanzés (TABOR et al, 1978). Considera-se que este vírus seja um filamento único e tenha um envelope lipídico com o genoma que mede aproximadamente 9,4 quilobases (Kb) de comprimento (CHOO et al, 1989 e OGATA et al, 1991). O genoma é organizado em um modelo similar aos dos flavivírus que são transmitidos por artrópodes como é o caso da dengue, febre amarela e encefalite viral japonesa. **Figura 1B.**

O genoma do HCV é constituído por um único molde de leitura aberta (“open reading frame”- ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3010 aminoácidos. A sequência próxima ao terminal 5’ é altamente conservada e parece ter um papel fundamental na translação viral e na patogênese da infecção pelo HCV. (TSUKIYAMA-KOHARA et al, 1992, e YOO et al, 1992). **Figura 1A.**

Essa ORF contém vários genes que codificam as diferentes proteínas virais estruturais (S) e não-estruturais (NS). As regiões estruturais apresentam 3 partes: a proteína C e dois envelopes de glicoproteínas E1 e E2. Estas são clivadas à paraproteínas por peptidases presentes dentro do retículo endoplasmático. A proteína C do HCV no lado citoplasmático do retículo endoplasmático parece ser uma proteína estrutural viral interna, um tanto parecida com o nucleocapsídeo (“core”) da proteína do vírus da hepatite B. Evidências preliminares sugerem que esta pode ser submetida adicionalmente a processos proteolíticos durante a

replicação viral. A região não-estrutural possui 4 partes: NS2 e NS3 (HIJIKATA et al, 1993), uma helicase (NS4) e uma RNA polimerase (NS5) (SUZICH et al, 1993).

Figura 1.

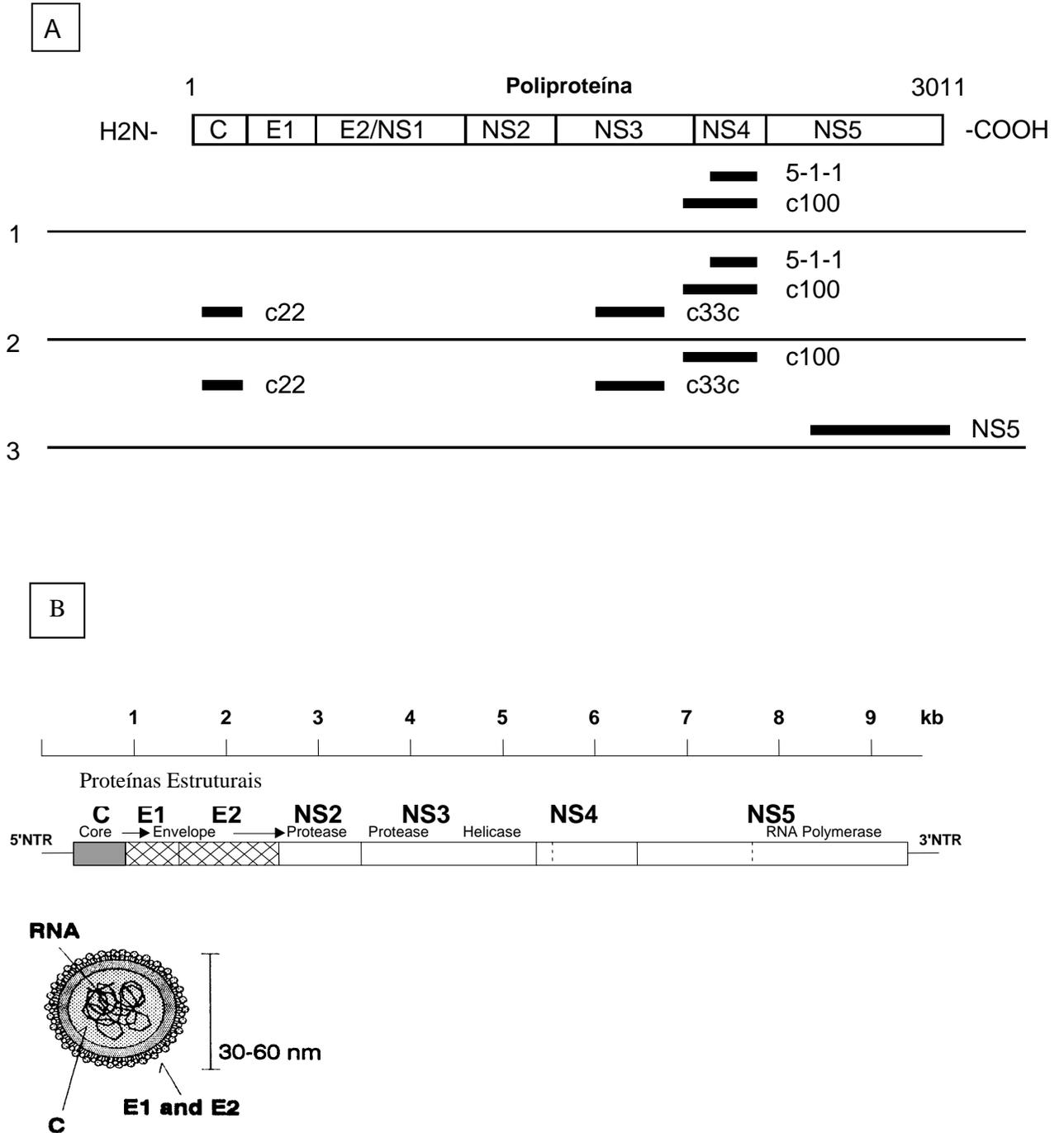


Figura 1. A. Proteínas estruturais (C22) e não estruturais (5-1-1, c100, c33c, NS5) do vírus da hepatite C usados nos testes ELISA de 1^a, 2^a e 3^a gerações para a detecção de anticorpos anti-HCV. **B.** Organização do RNA genômico do HCV. A provável estrutura da partícula viral é mostrada na esquerda e abaixo. Adaptado de Lemon & Brown, 1995

As regiões não-codificadas estão localizadas no final da ORF. A região C (“core”) codifica para a translação das proteínas que formam as nucleocápsides internas que envolvem o genoma, enquanto as regiões estruturais E1 e E2 (NS1) codificam proteínas que formam o envelope lipídico do vírus (SHERLOCK & DUSHEIKO, 1991). A similaridade observada na região 5' do genoma do HCV com a correspondente região dos flavivírus (HAN et al, 1991 e MILLER & PURCELL, 1990) levou a especulações sobre a possível transmissão do HCV por picada de insetos. No entanto, até o presente momento, esta via de contaminação não foi confirmada (GONÇALVES Jr & BARRAVIERA, 1995).

1.2. CLASSIFICAÇÃO

Diferentes subtipos de HCV demonstraram um notável grau de diversidade na sequência de nucleotídeos. De início considerou-se a existência de três genótipos (HOUGHTON et al, 1991). Atualmente as análises comparativas levam-nos a admitir que existem no mínimo seis principais genótipos virais (tipos 1 a 6) dos quais quatro (tipos 1 a 4) contém vários sorotipos intimamente relacionados (McOMISCH et al, 1994). Estes seis genótipos principais tem diferentes sequências de nucleotídios na região 5' não-codificada (5'-NCR). Entretanto estas regiões apresentam diferenças menos significantes em suas sequências dentro dos subtipos associados a um dado genótipo.

A classificação genotípica do HCV é confusa devido ao fato de que vários esquemas de classificação terem sido propostos por diferentes investigadores. Atualmente, existem no mínimo três diferentes classificações na literatura médica. Nos EUA a maioria dos pacientes são infectados pelo HCV-1 que foi

molecularmente clonado e sequenciado por Chiron (genótipo I, de acordo com Okamoto ou 1a para Simmonds) (OKAMOTO et al, 1992, e SIMMONDS et al. 1993), enquanto no Japão a maioria do padrão prevalente podem partilhar somente 75-85% dos nucleotídeos identificados com o vírus Chiron na região NS-5 (genótipo II de acordo com Okamoto, mas genótipo 1b para Simmonds) (OKAMOTO et al, 1992 e SIMMONDS et al, 1993). No quadro 1, estão demonstrados as principais classificações para os diferentes genótipos do HCV.

Quadro 1. Nomenclaturas propostas para a classificação dos diferentes genótipos do HCV.

Nome/Ano Tipo	ENOMOTO (1990)	TSUKIYAN A (1991)	OKAMOT O (1992)	CHA (1992)	SIMMONDS (1994)
1a	K-PT	I	I	I	1a
1b	K1	I	II	II	1a
1c	NC	NC	NC	NC	NC
2a	K2a	II	III	III	2a
2b	K2b	II	IV	III	2b
2c	NC	NC	NC	III	NC
3a	NC	NC	V	IV	3
3b	NC	NC	NC	IV	NC
4a	NC	NC	NC	NC	4
5a	NC	NC	NC	V	NC
6a	NC	NC	NC	NC	NC

NC: Não Classificado; Adaptado de Simmonds e colaboradores, 1994.

No Brasil, foi realizado um estudo, buscando detectar a frequência dos diferentes genótipos do HCV. Encontrou-se uma maior frequência do HCV tipo 1, com homologia de 98,8% a 99,2% na região NS5. A análise filogenética indicou

que o HCV desses pacientes pertence ao grupo 1 do genótipo do HCV com pequena divergência em relação ao tipo predominante na Europa e América do Norte (PEREIRA et al, 1993).

Os diferentes genótipos do vírus C podem apresentar importante variabilidade em termos de virulência e de resposta e terapia com interferon. Esta variabilidade pode representar uma estratégia empregada pelo vírus visando escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, seja pela produção de mutantes ou de vírus resistentes (GONÇALVES Jr & BARRAVIERA, 1995).

A seqüência de nucleotídeos do vírus é alterada lentamente durante a infecção persistente. As mutações ocorrem em média de $1,44-1,92 \times 10^3$ substituições de bases por sítio por ano (OGATA et al, 1991, e YOO et al, 1992). Essas mutações não são aleatoriamente distribuídas ao longo do genoma. Elas ocorrem de forma mais pronunciada em uma região de hiperatividade da região localizada próximo a região amino-terminal de E2. Diferenças significativas tem sido notadas na seqüência de nucleotídeos da molécula de RNA do HCV presente no sangue de indivíduos infectados ao longo do tempo. Isto levou à noção de que o HCV persiste como uma coleção de vírus na forma de “quasispécies” (MARTELL et al, 1992 e WEINER et al, 1993). Desta forma, é muito provável que a heterogenicidade genética e antigênica dos diferentes padrões de HCV, são os maiores impedimentos para o desenvolvimento de estratégias para o controle do HCV.

1.3. HISTÓRIA NATURAL

Na população em geral, o curso da infecção pelo HCV é bastante variável. Ocorre tendência a cronificação em 50% dos indivíduos que manifestam a forma aguda (ALTER et al, 1989 e RAKELA & REDEKER, 1979). Esta ocorre geralmente de maneira assintomática, observando-se apenas elevações persistentes das transaminases séricas. Algumas vezes pode apresentar um curso clínico mais agressivo do que o da hepatite B (ESTEBAN et al, 1989 e KIYOSAWA et al, 1984).

Considera-se que a evolução da infecção pelo HCV ocorra em 20 a 30% dos pacientes infectados, levando um período de 10 anos para o desenvolvimento de hepatite crônica, e de até 20 anos para o estabelecimento de cirrose hepática. Esta, uma vez instalada, implica em um aumento no risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular nos 10 anos subsequentes. Existem fortes evidências entre a associação de infecção pelo HCV e a ocorrência de carcinoma hepatocelular. O vírus C parece estar por si só, direta ou indiretamente ligado a etiopatogenia do carcinoma hepatocelular, embora uma ação carcinogênica não esteja claramente esclarecida (KIYOSAWA et al, 1984, DAVIS et al, 1989, ESTEBAN et al, 1992 e ALTER, 1990).

Na maioria dos casos, a infecção aguda pelo HCV é inaparente. O quadro clínico sintomático, com icterícia, é observado em pouco mais de 10% dos casos (ESTEBAN et al, 1992).

Até o presente momento, não está claramente determinado se o dano celular no hepatócito é mediado imunologicamente ou se está associado a um efeito citopático direto (BOTARELLI et al, 1993). O que está claro no entanto é que a infecção pelo vírus C produz inúmeras respostas imunes celulares e humorais

contra antígenos das regiões estruturais e não-estruturais do HCV e que estas respostas imunes são capazes de reconhecer e eliminar os hepatócitos infectados (KOZIEL et al, 1992 e FARCI et al, 1992). Em alguns modelos animais tem sido demonstrado que a resposta imune pode ser capaz de controlar a replicação viral, no entanto ela não impede a reinfecção dos chimpanzés por diferentes sorotipos e possivelmente não inpeça, da mesma forma, reinfecção pelo sorotipo inicial (PRINCE et al, 1992 e DEBURE et al, 1988).

Os indivíduos portadores de Insuficiência Renal Crônica submetidos à tratamento hemodialítico crônico são frequentemente infectados por vírus hepatotrópicos, principalmente o vírus das hepatites B e C, sendo, este último, atualmente, o responsável pela maioria dos casos de hepatites pós-transfusionais em unidades de hemodiálise (ELISAF et al, 1991, SCHLIPKÖTER et al, 1992 e YAMAGUCHI et al, 1990). Desta forma, a hepatite pelo vírus C é vista, hoje, como um importante problema nas unidades de hemodiálise, não somente pela sua alta prevalência, bem como pelas dúvidas ainda existentes sobre as rotas de transmissão do vírus nesta população, as implicações prognósticas nos urêmicos e as possíveis repercussões sobre os pacientes infectados que venham a receber transplantes renais.

1.4. EPIDEMIOLOGIA

O vírus da Hepatite C tem distribuição universal. A prevalência na população em geral varia de maneira amplamente (De GROOT, 1991). Nos Estados Unidos e nos países europeus a prevalência é menor do que 1%, com exceção da Espanha onde o índice foi de 2,2% em um estudo (CHOO et al, 1990).

A prevalência de infecção pelo HCV na população de doadores de sangue, varia largamente em diferentes países. Usando-se testes de primeira geração, a prevalência de HCV foi de 1,2% em países latino-americanos (MULLER et al, 1992), 0,5 a 1,4% na América do Norte (ZELDIS et al, 1990 e MENITOVE et al, 1990), 0 A 1,3% na Europa (KÜHN et al. 1989) e foi de 2,2% em países africanos (COURSAGET et al, 1990).

Nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica terminal, submetidos a hemodiálise, a infecção pelo vírus da Hepatite C é bastante comum. Usando-se testes ELISA de 1^a e 2^a geração, a prevalência de infecção por vírus C, tem mostrado ser maior que a encontrada em doadores de sangue, variando entre 1 e 48% em diferentes levantamentos (MORTIMER et al, 1989 e PONZ et al, 1991). Em um estudo, usando teste ELISA de 1^a geração, a prevalência de anticorpos anti-HCV em pacientes em hemodiálise variou de 8 a 36% na América do Norte (ZELDIS et al, 1990 e HARDY et al, 1992); 1 a 54% na Europa (ESTEBAN et al, 1989 e MORTIMER et al, 1989); 17 A 51% na Ásia (SHEU et al, 1992, KOKSAL et al, 1991 e LIN et al, 1993). Em outros estudos, a prevalência de anticorpos anti-HCV detectados por ELISA de 2^a geração foi de 1,2 a 3,8 vezes maior do que a detectada por ELISA de 1^a geração (OGUCHI et al, 1992 e McHUTCHISON et al, 1992), sugerindo que o ELISA 1^a geração subestima a prevalência soropositividade para o HCV em unidades de hemodiálise.

No Brasil, assim como na maior parte dos países em desenvolvimento, a infecção pelo vírus da hepatite C é bastante frequente nas unidades de hemodiálise. As prevalências de infecção tem mostrado variação ampla em diferentes levantamentos. Em um estudo, usando ELISA se 2ª geração, feito na região sul do país, encontrou-se uma prevalência de 28,8% (KAROHL et al, 1995), já em outro estudo, feito na região norte, a prevalência foi de 80,6% (ALVES et al, 1995).

A incidência de infecção pelo HCV, varia largamente em diferentes países. No Brasil, observou-se uma incidência anual de 15% (CENDOROGLIO et al, 1995). Na Itália a incidência relatada em um estudo foi de 6% (VANDELLI et al, 1992), em Taiwan, 14,6% (LIN et al, 1993) e nos EUA, 3% (NIU et al, 1992).

1.5. TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO

1.5.1. Testes Sorológicos

Os testes diagnósticos sorológicos para a detecção da infecção pelo vírus da hepatite C, diferem daqueles disponíveis para outros tipos de hepatites virais. Estes testes estão baseados na detecção de anticorpos reativos com proteínas recombinantes ou peptídios sintéticos, devido ao fato de que há quantidades insuficientes de antígenos virais presentes nos tecidos infectados ou no soro, para a detecção direta. Desta maneira, com estes testes, detectam-se anticorpos dirigidos a diferentes epítomos do vírus C e não a presença do mesmo ou seus fragmentos. Embora o “c” (“core”) seja uma proteína estrutural, os testes ELISA não medem anticorpos reativos com a superfície do virion, sendo estes testes, medidas de infecção, e não necessariamente de imunidade. Desta forma os testes

ELISA, que foram desenvolvidos primariamente para rastreamento de doadores de sangue, tem sido usados largamente para o diagnóstico de infecção pelo HCV (LEMON & BROWN, 1995).

Assim, os testes ELISA detectam anticorpos para um antígeno específico no caso dos testes de 1^a geração ou uma combinação de antígenos como é o caso para testes de 2^a ou 3^a geração (PEREIRA & LEVEY, 1997).

Os testes Anti-HCV de 1^a geração (ELISA I, RIBA I), detectam anticorpos dirigidos ao antígeno c100-3 da região NS4 do genoma viral (KUO et al, 1989). O intervalo médio da soroconversão usando os testes ELISA I foi de 16 semanas, podendo, no entanto, ser tão longo quanto 12 meses. Usando-se estes testes o anticorpo anti-HCV pode ser detectado em 46- 89% dos pacientes (ALTER et al, 1989). Entretanto, há problemas com testes falsos-positivos, e os valores preditivo positivos do ELISA I são pobres quando aplicados a pacientes de baixo risco para a infecção, como so doadores de sangue por exemplo (Mc FARLANE et al, 1990).

Novos testes sorológicos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos mesmos. Nos testes ELISA de 2^a geração foram incorporados antígenos para a região estrutural (c22-3) e para a região não estrutural NS3 (33-c) que foi combinado com o c100-3 da região NS4, para formar uma única proteína expressa de NS3 E NS4, chamada c200. A adição do c22-3 e do c33-c aos testes houve uma redução no período de janela entre a infecção e a soroconversão, uma vez que a resposta do anticorpo contra antígenos capsídicos ocorre antes do que contra outros antígenos do HCV, podendo desta forma detectar-se a soroconversão tão precocemente quanto quatro semanas após a exposição (WILBER & POLITO, 1995).

O teste denominado RIBA (“recombinant immunoblot assay”), detecta anticorpos para um ou mais antígenos do HCV em uma tira que é lida visualmente. Por ter maior especificidade que o ELISA é usado como teste confirmatório. (PEREIRA & LEVEY, 1997).

O RIBA I atua imobilizando os mesmos antígenos recombinantes utilizados no ELISA de primeira geração. Tem grande especificidade, mas são menos sensíveis do que o ELISA, não representando assim um teste confirmatório ideal (DUSHEIKO & RIZZETO, 1992). Já o RIBA II, ou de segunda geração, (RIBA 4), utiliza quatro antígenos específicos do HCV (c22, c33, c100-3, 5-1-1), tendo boa correlação com viremia ou presença de HCV-RNA no soro (GROSS Jr & DAVID, 1995 e DUSHEIKO & RIZZETO, 1992). Um teste RIBA II positivo resulta da demonstração de reatividade para dois ou mais destes antígenos. Mais de 85% dos pacientes com viremia para o HCV demonstraram reatividade para duas ou mais bandas no RIBA II. Entretanto, padrões de reatividade de proteínas individuais podem variar, dependendo do genótipo do HCV e da resposta imune do hospedeiro. Portanto, embora o RIBA II possa ser usado como teste confirmatório altamente específico para infecção pelo HCV, sua utilidade pode estar comprometida em alguns pacientes, necessitando-se usar outros testes para confirmar a infecção pelo HCV, como o teste que utiliza a reação de polimerização em cadeia (“PCR”) (GROSS Jr & DAVID, 1995).

Recentemente, testes de terceira geração, que detectam anticorpos anti-HCV tornaram-se disponíveis para uso clínico. Tanto o ELISA 3 como RIBA 3, foram incorporados antígenos recombinantes adicionais para a região NS5, havendo melhora nos antígenos correspondentes a região NS3 (c33), melhorando

desta maneira, a sensibilidade dos testes. (DUSHEIKO & RIZZETO, 1992 e PEREIRA & LEVEY, 1997).

1.5.2. Testes de avaliação da viremia

Vários métodos tem sido usados para se detectar diretamente o RNA genômico do HCV. Entre eles, o PCR é o mais amplamente utilizado. Neste teste o RNA viral é extraído, convertido em DNA complementar por ação da transcriptase reversa e então amplificado na PCR. A detecção pode ser realizada no soro, sangue total, plasma e em tecido hepático. Testes para RNA do RNA podem ser usados para ajudar no diagnóstico de casos antes da soroconversão ou se o RIBA for indeterminado. Entretanto mesmo sendo a técnica mais sensível, o RNA do HCV não é detectado no soro em todos os estágios da doença. Devido ao fato da detecção do HCV-RNA poder ser intermitente, um único PCR negativo não deve ser usado para indicar que um indivíduo não está infectado ou que respondeu ao tratamento. Existem várias razões para o uso de métodos como a PCR, entre elas, pode-se citar: (a) o diagnóstico de infecções agudas antes do desenvolvimento de anticorpos; (b) o seguimento dos pacientes com hepatite crônica que são negativos para anticorpo para HCV ou que tenham resultados indeterminados; (c) o seguimento dos pacientes com hepatite crônica que apresentem auto-anticorpos produzindo resultados HCV falso-positivos para o anticorpo anti-HCV e (d) monitorização da terapia antiviral (WILBER & POLITO, 1995).

1.5.3. Testes laboratoriais de função hepática

Embora as chamadas “provas de função hepáticas” sejam necessárias para a detecção de hepatite elas nem sempre refletem a intensidade da mesma. As enzimas hepáticas podem estar pouco ou moderadamente elevadas. (SHERLOCK & DOOLEY, 1993).

A AST (aspartato amino transferase) é uma enzima mitocondrial presente em grande quantidade no coração, fígado, músculo esquelético e no rim. Seu nível sérico aumenta quando esses tecidos são agudamente destruídos. A ALT (alanino amino transferase) é uma enzima citosólica, presente no fígado em proporção superior a no coração e no músculo esquelético. Seus níveis séricos elevados são mais específicos de lesão hepática do que a AST. Apesar das alterações da AST ser comum nos pacientes com hepatite C, este teste não se mostra um marcador fidedigno de infecção (SHERLOCK & DOOLEY, 1993).

3-PACIENTES E MÉTODOS

3.1. PACIENTES

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo incluindo pacientes portadores IRC terminal que iniciaram tratamento hemodialítico em unidades de diálise de Porto Alegre. Adicionalmente foi avaliada a prevalência de pacientes portadores de anticorpo anti-HCV nas Unidades de hemodiálise participantes do estudo no seu último mês de estudo em cada unidade em particular.

3.1.1. Critério de inclusão

- Ser portador de IRC terminal e estar iniciando tratamento com hemodialítico em uma das unidades envolvidas no estudo.

3.1.2. Critérios de exclusão

- Foram excluídos do estudo os pacientes com IRC, que já usavam outro método método de substituição da função renal, tais como CAPD, CCPD ou DPI antes de iniciarem tratamento hemodialítico.
- Os pacientes que ingressaram em hemodiálise nas unidades onde foi feito o recrutamento mas que vieram transferidos de outros centros.
- Pacientes que reingressaram em hemodiálise neste período.
- Pacientes com doença neoplásica.

3.1.3. Período de Inclusão e seguimento

- Período de inclusão dos pacientes foi de agosto de 1994 a maio de 1995, sendo todos os pacientes seguidos por dois anos.

3.1.4. Consentimento

- Todos os pacientes foram previamente informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Médica do Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1.5. Variáveis em estudo

- Infecção pelo vírus da hepatite C
- Co-infecção pelo vírus da hepatite B
- Papel das transfusões sanguíneas
- Níveis de transaminases
- Correlação entre viremia e presença de anticorpos

3.2. MÉTODOS

Em cada paciente, usando-se técnica asséptica, foi realizada coleta de 3 ml de sangue total previamente a primeira sessão de hemodiálise. Para a obtenção do soro o sangue foi centrifugado, o soro aspirado, e acondicionado em frascos adequados para a estocagem a 40 graus centígrados negativos. Novas coletas de sangue foram feitas aos 6, 12 e 24 meses de tratamento hemodialítico. Por ocasião da última coleta, usando-se técnica estéril, separou-se o soro em 2 alíquotas, que foram posteriormente usadas para a detecção de anticorpos e RNA viral.

Todos os pacientes incluídos no estudo, eram dialisados com capilares de acetato de celulose, três vezes por semana e com banhos de bicarbonato de sódio. Os dialisadores eram reprocessados com ácido peracético e desprezados sempre que ocorresse uma de queda de 30% do seu priming inicial. Os pacientes

portadores de HBsAg positivo eram dialisados em sala separada dos demais, bem como, uma sala de reuso próprio para o reprocessamento de tais dialisadores. Não houve segregação no reprocessamento dos dialisadores entre os pacientes com e sem anticorpo anti-HCV.

A detecção de anticorpo para hepatite C foi realizada através do método ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbente Assay) de terceira geração, UBI HCV EIA 4.0.

Após a realização do ELISA na amostra de 24 meses, foram selecionados, aleatoriamente e de maneira estratificada, pacientes com e sem anticorpos anti-HCV para a realização da pesquisa de RNA viral pela reação de polimerização em cadeia (PCR).

3.2.1. Testes Sorológicos

3.2.1.1. Método ELISA III

O Kit utilizado foi o UBI HCV EIA 4.0, (fabricado por United Biomedical Inc. USA) que emprega um imunosorbente que consiste de peptídios sintéticos que corresponde a segmentos altamente antigênicos do núcleo das regiões NS3, NS4 e NS5 do vírus da Hepatite C, detectando no total 4 epítomos virais. Anticorpos específicos, quando presentes, ligam-se ao imunosorbente com alta afinidade.

Na realização dos testes, foram empregados, além das amostras, controles não reagentes para HCV e controles altamente reagentes. Os soros foram diluídos na proporção de 1:21 em diluente de amostra (tampão 1) composta de solução salina tamponada de fosfato, que é distribuída em cada casela da microplaca, coberta e incubada a 37 graus centígrados por 30 minutos. O passo seguinte é a

lavagem da microplaca com uma solução tampão de fosfato salino com surfactante. Este processo foi realizado em uma lavadora automática e consistiu de 6 lavagens com 300uL/cavidade, com o objetivo de remover anticorpos não ligados e outros componentes do soro. A seguir foi retirado o excesso de líquido das microplaca com papel absorvente e foi adicionado, em cada cavidade 100uL de uma solução de conjugado de enzimas com anticorpos de carneiro específicos para IgG humana, seguida de incubação a 37 graus centígrados por 15 minutos. Nesta fase ocorre a reação de ligação do anticorpo a seus antígenos específicos correspondentes. Após a incubação repete-se a lavagem, adicionando-se a seguir 100uL de uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e O-fenilenediamina (OPD), que após incubação desenvolve uma coloração amarelo-alaranjada que é proporcional a quantidade de anticorpos anti-HCV presentes na amostra testada.

Esta reação enzima-substrato termina com a adição de 100uL de uma solução de ácido sulfúrico (1,0 ml/L) que encerra a reação colorimétrica. As alterações de cores são medidas por espectrofotometria a um comprimento de onda de 492 nm.

- Cálculo dos resultados

Determina-se a média da absorbância dos controles não reativos para o HCV. Tais valores devem ser menores ou iguais a 0,200 unidades de absorbância. Determina-se a média da absorbância dos controles altamente reativos, cuja absorbância deve ser maior que 0,500 U. Cada teste ELISA foi considerado tecnicamente adequado se se a diferença entre as médias dos controles

altamente reativos e não reativos fosse maior que 0,400 unidades de absorvância. Estabeleceu-se um ponto de corte que foi arbitrado em 20% do valor do controle reagente-fraco.

- Interpretação dos valores

- Amostras com valores de absorvância menores do que o ponto de corte foram considerados não reativos.

- Amostras com valores de absorvância maior ou igual os valores de ponto de corte foram inicialmente considerados reativos e foram retestados em duplicatas, usando-se a amostra original antes de se confirmar o resultado. Se não houvesse reações de ambos os testes repetidos, o teste foi considerado negativo para a presença de anticorpos anti-HCV.

- Amostras inicialmente reativas, que reagiram em um ou ambos os testes repetidos foi considerado reativos para a presença de anticorpos anti-HCV.

3.2.1.2. Detecção da Viremia:

Para a detecção da viremia foi empregada a técnica da reação de polimerase cadeia (PCR) na qual usou-se sequências específicas para a região 5' não-traduzida. Ver Figura ---

O preparo para a PCR e sua execução seguiram as seguintes etapas:

- Extração do RNA - Método de Boom modificado (BOOM et al, 1990).

- Inicialmente pipetou-se 100uL de soro para 1,0ml do tampão de extração, o isotianato de guanidina, juntamente com 40ul de suspensão de sílica colocado em tubo Eppendorff de 1,5ul. Usou-se um controle positivo e dois controles negativos para cada bateria de 12 testes.

- O tubo foi agitado no vortex e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos sendo após centrifugado por 10 segundos a 1300 rpm.
 - O sobrenadante foi descartado com pipeta de pasteur sobre o NaOH 3M.
 - Pipetou-se 1ml de etanol a 70% em cada tubo, agitando-se para ressuspender o sedimento de sílica, seguido de centrifugação a 1300 rpm por 10 segundos. Após repete-se a lavagem com acetona, removendo-se completamente o sobrenadante e fazendo-se nova centrifugação.
 - Os tubos são deixados abertos a temperatura ambiente por 5 minutos para a evaporação da acetona.
 - Adiciona-se 50ul de água destilada estéril, sem RNase, agita-se no vortex e encuba-se a 55 graus centígrados por 5 minutos com os tubos fechados. Após centrifuga-se por um minuto a 1300 rpm.
 - Pipeta-se o sobrenadante usando-se ponteira para barreira e procurando não tocar na sílica. Obtém-se assim o RNA total que será usado, na etapa seguinte para a síntese do cDNA.
- Síntese do DNA complementar
 - Para cada 12 reações foram combinados os reagentes abaixo, em área e com equipamentos livres de contaminação por RNA/DNA e usando-se material exclusivo para este procedimento.
 - 60 ul tampão 10x
 - 60 ul mistura de oligonucleotídeos (dNTPs) 10mM
 - 80 ul MgCl₂ 25mM
 - 6 ul “Randon Hexamer” (N6)
 - 12 ul dos “primers” externo

160 ul de água destilada estéril

1,5 ul de transcriptase reversa

1,5 ul de taq polimerase

- Divide-se em alíquotas de 30 ul em tubo de Eppendorff de 0,5ml e 35 ul de óleo mineral.
- Em uma área de trabalho separada, pipeta-se, usando-se ponteira com barreira, 20ul do RNA anteriormente extraído, que é adicionado à mistura descrita acima.
- Realiza-se então o passo seguinte descrito a seguir.

- Reação de Polimerização em cadeia (primeira rodada)

37 °C 15 minutos 1x

94 °C 1 minuto 1x

94 ° C 20 segundos 35x

60 ° C 20 segundos 35x

72 ° C 20 segundos 35x

72 ° C 1 minuto 1x

Utilizando-se como substrato o DNA complementar obtido anteriormente. O volume total é de 85ul, sendo 50ul , amostra e a mistura dos componentes cobertos com 35ul de óleo mineral.

Esta reação resulta em um produto de 235 pares de base.

- Reação de Polimerização em cadeia (segunda rodada - PCR “aninhado”)

Para cada 12 reações combinou-se os reagentes abaixo, usando-se como substrato, 2ul do produto da primeira rodada da PCR:

- 30 ul buffer 10x
- 30 ul mix dNTP
- 20 ul MgCl₂ 25mM
- 6 ul de mistura de “primers” internos
- 210 ul de agua destilada estéril
- 1,5 ul enzima taq. polimerase

Senod a PCR executada nas seguintes condições de ciclagem

- 94 ° C 1 minuto 1x
- 94 ° C 15 segundos 35x
- 60 ° C 15 segundos 35x
- 72 ° C 20 segundos 35x
- 72° C 1 minuto 1x

O volume total desta reação é de 56ul, sendo 24ul da amostra, 2ul do produto ampliado na primeira rodada e 30ul de óleo mineral. O produto resultante foi de 59 pares de base.

- Detecção
 - Foi pipetado 10ul do produto da 2^a reação com 2 ul do tampão usado para colocar as amostras nas caselas do gel de agarose (“loading buffer”). Feita eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio (0,5ul/ml). Usando-se como solução eletrolítica TBE a 0,5% (“tampão de corrida”). A eletroforese é feita por aproximadamente 30 minutos à 75 Volts em mini-cuba.
- Visualização

- Os produtos do PCR foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta e fotografados com câmera polaróide. O produto final do conjunto de “primers” externos tem 235 pares de bases e o que resulta dos “primers” internos (aninhamento) tem 59 pares de bases.

3.3- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas foram usados o seguintes testes: Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher para a comparação de variáveis categóricas; Teste t de Student e Wilcoxon-Mann-Witney para variáveis quantitativas; Coeficiente de correlação de Pearson na análise da curva de sobrevivida.

O nível de significância estatística selecionado foi $p < 5\%$ (alfa < 0,05).

Os testes estatísticos foram realizados por meio dos programas: EPI-INFO, versão 5.01 B e SPSS, versão 4.0

4-RESULTADOS

4.1- Características da amostra:

Setenta e oito pacientes que preencheram os critérios de inclusão, deram seu consentimento informado e foram arrolados no estudo. Durante o período de arrolamento de pacientes 92 pacientes iniciaram programa crônico de substituição da função renal com hemodiálise nas cinco unidades que participaram do presente estudo . Desta forma, a presente amostra representou 84,7% do número total de pacientes que entraram em programa de hemodiálise nas cinco unidades de diálise estudadas naquele período.

Os dados demográficos da população em estudo, assim como as causas de IRC nesta coorte de pacientes estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 2. Dados demográficos da mostra

• Número de pacientes	71	
• Sexo*	35/36	
• Idade ⁺	53 ± 14,8	
• Cor**	60/11	
• Etiologia da IRC	N	%
Hipertensão A rterial Sistêmica	25	35,2
Diabete Melitus	21	29,6
Indeterminada	8	11,3
Glomerulonefrite Crônica	7	9,7
Uropatia Obstrutiva	5	7,0
Outras	5	7,0

* masculino/feminino; + anos; ** branco/não branco

4.2- Perdas no seguimento

Vinte e um pacientes saíram do estudo durante o período de seguimento. Os motivos de saída foram: (a) óbito em 14 pacientes (19,7%); (b) transplante renal em 4 pacientes (5,6%) e (c) transferência para outras unidades onde não foi possível manter o seguimento em 3 pacientes (4,2%)

4.3- Concomitância de infecção por vírus da hepatite B

Três dos 71 pacientes arrolados no estudo de incidência apresentaram positividade para o HBsAg e assim persistiram assim durante todo o seguimento. Entre estes pacientes positivos para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B não houve desenvolvimento de anticorpos anti-HCV no período de acompanhamento. ($t = 0,30$; $p = 0,58$; teste exato de Fisher).

4.4-Tranfusões sanguíneas prévias ao período dialítico

Na coorte que iniciou o estudo, foi analisada a presença de transfusões prévias ao início do mesmo. Vinte e seis pacientes receberam transfusões sanguíneas prévias, destes, seis (23%) apresentaram soroconversão para anti-HCV positivo. Dos 45 pacientes que não receberam transfusões sanguíneas prévias, 16 pacientes (35,6%), soroconverteram durante o período. (Tabela 1).

Tabela 1. Presença de tranfusões sanguíneas prévias ao período

dialítico e desenvolvimento de anticorpos anti-HCV

Transfusões Prévias	Anticorpos anti-HCV no seguimento	
	Positivos	Negativos
Presentes	6 (23,1)	20(76,9)
Ausentes	16(35,6)	29(64,4)
Total	22 (31)	49 (69)

() percentagens; qui-quadrado = 0,0029; p = 0,96

A análise da Tabela 1, demonstrando incidências similares de soroconversão no período do estudo, entre pacientes previamente transfundidos e não transfundidos, sugere que as transfusões sanguíneas prévias não influenciaram o desenvolvimento de anticorpos anti-HCV no período de seguimento.

4.5-Transfusões sanguíneas durante o seguimento

Trinta e dois pacientes receberam transfusões sanguíneas durante o período de seguimento. O número de transfusões variou de uma a dezessete, com média de $1,64 \pm 3,01$ transfusões por paciente.

Entre os pacientes que receberam transfusões sanguíneas durante o seguimento, 9 (28%) soroconverteram tornando-se anti-HCV positivos. Por outro

lado, dos 29 pacientes que nunca receberam transfusões sanguíneas, 13 pacientes (44,8%), soroconverteram.

Tabela 2. Tranfusões sanguíneas no período dialítico e desenvolvimento de anticorpos anti-HCV

Transfusões	Desenvolvimento de anticorpos anti-HCV	
	Presente	Ausente
Presentes	9 (28,2)	23 (71,8)
Ausentes	13 (44,8)	26(66,6)
Total	22 (31)	49(69)

() porcentagens; qui-quadrado =0,10; p =0,75

A análise da Tabela 2 permite concluir que não houve correlação significativa entre a presença de transfusões sanguíneas e soroconversão para anti-HCV.

Tabela 3- Correlação entre transfusões no período pré e pós diálise.

TRANSFUSÕES Período Dialítico	Pré Diálise	
	+	-

Presentes	22	10	32
Ausentes	4	35	39
Total	26	45	71

Qui-quadrado=25,91 p=0,001

A análise da Tabela 3 permite concluir que os pacientes transfundidos no período pré-dialítico são os mesmos que foram transfundidos quando em diálise.

Visto de outra maneira, o número médio de transfusões do subgrupo de pacientes que soroconverteram foi $2,13 \pm 4,6$ transfusões e de $1,42 \pm 2,1$ transfusões no subgrupo de pacientes que não soroconverteram. ($t=$ ___ $p=0,5525$. Wilcoxon-Mann-Whitney). Desta forma, no presente estudo, não encontramos um papel relevante para as transfusões sanguíneas na transmissibilidade do HCV em pacientes com IRC mantidos em hemodiálise crônica.

4.6- Níveis de transaminases

Os níveis de transaminases foram avaliados em 44 pacientes no final dos 24 meses de acompanhamento. A média dos níveis da aspartato aminotransferase (AST) nos pacientes que se tornaram anti-HCV positivos foi de $10,3 \pm 3,3$ UI/L. Nos pacientes que permaneceram anti-HCV negativos a média foi de $8,9 \pm 3,2$ UI/L. ($t=1,39$; $p=0,17$; IC-95%: - 0,655 até 3,529; teste-t de Student não pareado).

Os níveis médios de alanino aminotransferase (ALT) foram de $13,7 \pm 3,8$ UI/L nos pacientes soropositivos para anticorpos anti-HCV e de $13,2 \pm 4,3$ UI/L nos soronegativos ($t=0,34$; $p= 0,73$. IC-95%: -2,242 até 3,162; teste t de Student não pareado). Ver tabela 4.

Tabela 4. Anti-HCV - Transaminases séricas

Anti-HCV	N	AST*	ALT**
Positivo	15	10,3 ± 3,3	13,7 ± 3,8
Negativo	29	8,9 ± 3,2	13,2 ± 4,3
Total	44	9,46 ± 3,3	13,5 ± 4,1

N = número de pacientes; AST e ALT dados em UI/L; * t =1,39; p = 0,17; ** t =0,34; p = 0,73 teste T não pareado de Student

4.7. Correlação entre viremia e presença de anticorpos anti-HCV

Vinte e cinco pacientes foram selecionados, por randomização estratificada, entre anti-HCV positivos e anti-HCV negativos, com base no resultado da pesquisa de anticorpos feita aos 24 meses de acompanhamento. Nestes procedeu-se a pesquisa de viremia através da análise da presença de RNA viral através da PCR.

A avaliação da viremia (PCR) cotejada a presença ou ausência de anticorpos (ELISA III), está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5. Relação entre viremia e anticorpos anti-HCV

	PCR +	PCR -	Total
ELISA III +	8 (32)	5 (20)	13
ELISA III -	1 (4)	11 (44)	12

Total	9	16	25
-------	---	----	----

Conforme observado na Tabela 4 acima, houve 5 casos (24%) em que não se observou concordância entre os resultados dos diferentes testes. Por outro lado, observa-se que houve concordância entre os testes para detectar ou excluir viremia e anticorpos concomitantemente em 76% dos casos. Os testes acima avaliam diferentes aspectos da infecção viral. As potenciais razões para as discordância encontradas nos resultados dos dois testes serão discutidas adiante.

4.8- Soroconverção do anti-HCV durante o período do estudo

A soroconverção para anti-HCV positivo foi avaliada no período de seguimento e os resultados estão demonstrados na Tabela 6 e na Figura 2.

Tabela 6. Soroconverção para Anti-HCV positivo durante o período de 24 meses.

Período*	Entrada	Perdas	Eventos	% livre**	% Infectados***
0 - 6	71	6	3	95,8	4,2
7 - 12	62	10	2	92,3	7,7
13 - 24	50	33	17	61,2	38,8

* meses; ** percentual da amostra em estudo que permanece anti HCV negativa; *** percentual da amostra que desenvolveu anticorpos anti-HCV no decorrer do estudo. Kaplan-Meyer.

Figura 2

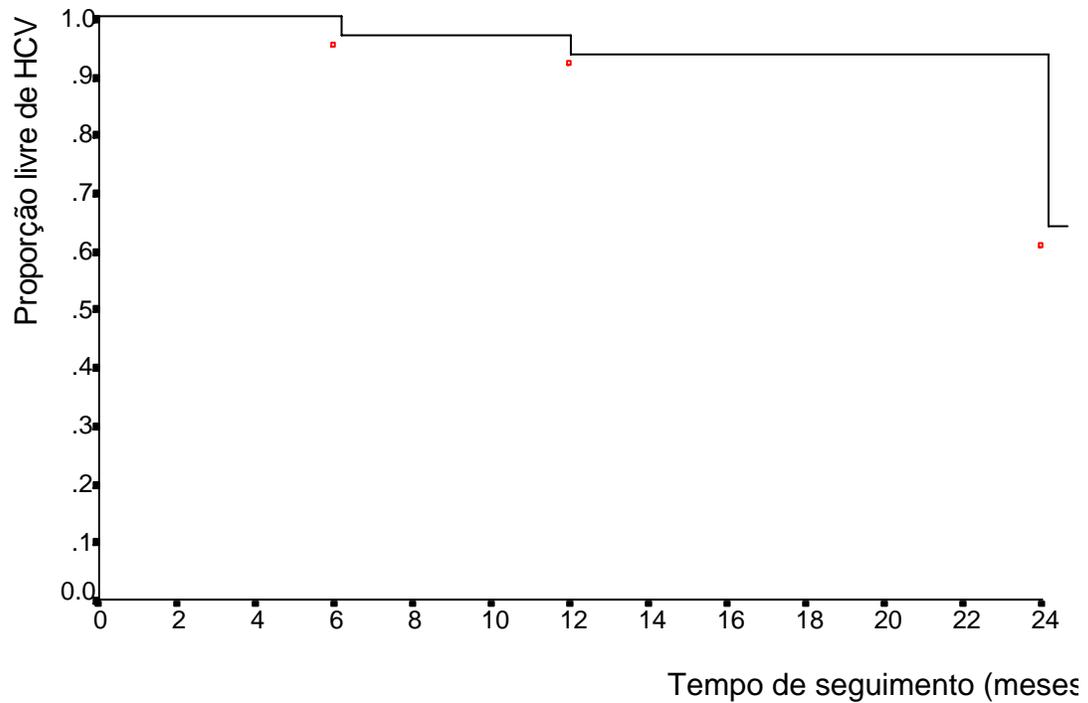


Figura 2. Curva de sobrevivência atuarial de pacientes livres de infecção pelo vírus da hepatite C no decorrer do período de acompanhamento.

A análise da Tabela 6 e da Figura 2, demonstra um progressivo aumento de pacientes que desenvolvem anticorpos anti-HCV no decorrer do período de observação.

4.9.- Relação Prevalência- Incidência

Foi avaliado o percentual de soroconversão dos pacientes do estudo de incidência de acordo com a prevalência da unidade em que os pacientes faziam tratamento hemodialítico. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Relação entre a Prevalência e a Incidência de anti-HCV

UNIDADE	PREVALÊNCIA	PAC. NOVOS	INCIDÊNCIA
Unidade I	22,6	9	16,6
Unidade II	42,8	10	66,6
Unidade III	31,9	16	40
Unidade IV	33,3	17	20
Unidade V	40,8	19	28,57
Médias	34,28		34,3

Coeficiente de correlação de Pearson $r=0,11$; $p= 0,0185$

5.DISCUSSÃO

5.1-Aspectos gerais

Pacientes com IRC submetidos a hemodiálise crônica, e por conseguinte, candidatos a receptores de transplante renal, são freqüentemente infectados por vírus hepatotrópicos, principalmente vírus da hepatite B e vírus da hepatite C (DEBURE et al, 1988 e ELISAF et al, 1991). Este último, é atualmente, a maior causa de hepatite nestes pacientes (MACHIDA, et al, 1992).

A relação entre a presença de anticorpos anti-HCV e imunidade merece algumas considerações, DUBOIS e cols (1994), encontraram viremia em 77% dos pacientes que apresentavam anti-HCV positivo, detectados por ELISA de segunda geração, e interessante, quando os autores quantificaram os níveis de RNA viral, encontraram níveis médios significativamente maiores em homens do que quando comparado com mulheres ($3,6 \times 10^6$ moléculas/ml e $3,0 \times 10^6$ moléculas/ml, respectivamente). Em outro estudo (KUHNS et al, 1994), encontrou-se viremia em 75% dos pacientes anti-HCV positivos por ELISA II, já SILVA e cols (1994), encontraram viremia em 93% dos pacientes anti-HCV positivos também testados por ELISA II. A presença de anticorpos anti-HCV pode portanto, refletir uma infecção passada e resolvida, de outra maneira, estes mesmos anticorpos podem ocorrer na presença de infecção ativa com replicação viral (POL, et al, 1993). Neste aspecto, pode-se por conseguinte concluir, a partir dos estudos acima mencionados, que em uma significativa percentagem dos pacientes, os anticorpos estão presentes na vigência de infecção ativa. Assim a determinação destes anticorpos é de extrema importância por várias razões, entre elas: (a)

vários pacientes em hemodiálise são candidatos a transplante renal, o qual, está frequentemente associado com uma piora das lesões hepáticas (POL, et al, 1990, COHEN, et al, 1997). (b) Doença hepática crônica pode existir independente dos níveis de transaminases, o que torna a monitorização da atividade da doença hepática mais difícil (SHAKIL et al, 1995). (c) Pacientes virêmicos podem ser fonte de transmissão nosocomial de HCV dentro da unidade de diálise (POL, 1990).

Para ALTER (1995), a importância da infecção pelo vírus C reside no fato dela tornar-se persistente e induzir a doença hepática crônica que pode levar a deterioração progressiva das funções hepáticas, o que de fato ocorre em um significativo número de pacientes infectados. A persistência de viremia nos pacientes em hemodiálise sugere que esta, pode estar associada a um aumentado risco de progressão para infecção crônica já que na população em geral, em torno de 50% das infecções por HCV resultam em hepatite crônica (ALTER et al, 1989), mais recentemente, demonstrou-se que há cronificação em 80% dos casos (MARCELIN & BENHAMOU, 1995).

Outro fato a considerar, é o modo de transmissão do HCV que ainda não está completamente elucidado (DRUWÉ et al, 1994). Vários estudos demonstraram, em analogia ao que ocorre com o vírus da hepatite B, um possível papel da transmissão nosocomial (TERUEL et al, 1992).

Em contraste com a abundância de dados epidemiológicos sobre a soroprevalência de hepatite C e seus possíveis modos de transmissão em unidades de diálise, ainda se questiona, quais as reais implicações clínicas da hepatite C na patologia hepática, morbidade e mortalidade na população de pacientes em tratamento hemodialítico crônico. Em um estudo, os autores

realizaram biópsia hepática transjugular em 19 de 36 pacientes em hemodiálise com anti-HCV positivo, testados para ELISA II. Os resultados histológicos evidenciaram: cirrose, em 4 paciente, hepatite crônica ativa avançada em 4 pacientes, hepatite crônica persistente em um paciente, hemosiderose em 3 pacientes, fibrose portal em um paciente, degeneração gordurosa em um paciente e alterações inespecíficas em 3 pacientes, demonstrando assim claramente, a importância da infecção por vírus HCV nesta população uma vez que lesões com alto potencial de morbidade foram encontradas (ROSELLO et al, 1993).

Também, é ainda motivo de controvérsia, qual o impacto da hepatite crônica por vírus C na sobrevida do receptor de um enxerto renal e a influência do transplante renal na evolução da hepatite crônica induzida pelo vírus C (DRUWÉ et al, 1994). Alguns estudos sugerem que a positividade do anti-HCV *per se* e anormalidades dos testes hepáticos não tem valor diagnóstico ou prognóstico se não forem acompanhados de histologia hepática (RAO et al, 1993 e ALLISON et al, 1992), outros autores acrescentam que em pacientes infectados com HCV a presença dos anticorpos, provas de função hepática alteradas, viremia ou grau de viremia predizem a presença ou a severidade da doença hepática (BOLETIS et al, 1995). Apesar das considerações acima, em um estudo local, encontrou-se que pacientes transplantados renais com anti-HCV positivo possuíam níveis de transaminases significativamente mais elevadas do que os pacientes que não apresentavam anticorpo contra este vírus (MANFRO et al, 1995).

As lesões hepáticas nos pacientes transplantados renais variam consideravelmente, dependendo dos critérios usados para a realização da biópsia hepática. Quando a biópsia é realizada independentemente da presença ou

ausência de testes de função hepática anormais, uma substancial proporção de pacientes revela uma histologia normal ou alterações mínimas(BERTHOUX, 1995 e BOLETIS et al, 1995). Em contraste, quando a biópsia é realizada somente em pacientes com anormalidades de função hepática, predominam lesões mais severas (ROTH et al ,1994). Estudos clínicos e bioquímicos sugerem que o curso da doença hepática crônica em uma grande proporção de pacientes transplantados renais não é progressivo, porém os dados histológicos, mais fidedignos, indicam que o curso da doença hepática é caracterizado por fibrose progressiva (MORALES et al, 1993).

5.2- Características e representatividade da amostra estudada

Em nosso meio, uma coorte com 294 pacientes, demonstrou que a causa mais frequente de Insuficiência Renal Crônica foi hipertensão arterial sistêmica, representando 22% dos pacientes, glomerulonefrite crônica representou 5,4% e em 30,6% dos pacientes não foi possível determinar a etiologia da IRC (GONZAGA et al, 1996). Dados da literatura nacional apontam para glomerulonefrite crônica como sendo a causa de IRC em 26% dos pacientes, hipertensão arterial sistêmica em 22% dos pacientes e diabetes melitus em 17%(BALBI et al, 1996).

No presente estudo, a causa mais frequente de IRC foi HAS, seguida de diabetes melitus e interessante, glomerulonefrite crônica foi a causa em somente 9,7%. É bem provável que neste estudo, assim como nos demais, a frequência de glomerulonefrite crônica tenha sido subestimada, atribuindo-se a HAS uma porção significativa dos pacientes que de fato sejam portadores de

outras doenças envolvidas na etiologia da IRC. O diagnóstico da etiologia da IRC é em geral dificultado na medida em que uma percentagem significativa dos pacientes, em nosso meio, se apresentam com quadros terminais e que estes, na sua maioria, se acompanham de HAS. Assim, na ausência de um quadro clínico típico de uma determinada patologia ou da biópsia renal, há uma tendência em se classificar a etiologia da IRC como HAS.

Nessa mesma coorte, anteriormente citada, a média de idades foi de $49,5 \pm 17,4$ anos e a mortalidade foi em torno de 21% em dois anos. No presente estudo, a média de idades foi de $53 \pm 14,8$ anos e a mortalidade foi 19% no período de 2 anos.

As perdas do estudo que incluem transplantes, transferências e óbitos foram ajustadas e trabalhadas durante a realização da curva de sobrevida, sendo que estes, durante o tempo que foram acompanhados foram expostos ao risco.

Assim, os pacientes do presente estudo constituem uma amostra representativa da população dos pacientes renais crônicos encontrados na prática clínica. Interessantemente, encontrou-se no presente estudo, uma prevalência de 11,5% de pacientes com anti-HCV positivos no período pré-dialítico imediato.

5.3-Papel das transfusões sanguíneas

Numerosos estudos tem demonstrado uma associação direta entre o número de transfusões sanguíneas e a prevalência da infecção pelo HCV em pacientes em hemodiálise crônica (MULLER et al, 1992; JADOUL et al, 1993; DUSSOL et al, 1995; KNUDSEN et al, 1993; CHAUVEAU et al, 1993 e JEFFERS et al, 1990). Em um estudo, conduzido por KNUDSEN e cols (1993), observou-se uma

diferença estatisticamente significativa no número de transfusões sanguíneas recebidas pelos pacientes anti-HCV positivos quando comparadas a pacientes anti-HCV negativos (30 e 13, respectivamente). Similar a este, um outro estudo demonstrou uma correlação direta entre a prevalência de anti-HCV e o número de transfusões sanguíneas administradas. A prevalência encontrada no grupo de pacientes com 1 a 10 transfusões foi de 40%, já a vista nos pacientes com mais de 10 transfusões em 76% dos pacientes. Isto sugere que as transfusões sanguíneas representam risco de contaminação e que este é progressivo na medida em que seu número aumenta (MULLER et al, 1992).

CEDEROGLO e cols (1995), demonstraram que o número de transfusões sanguíneas foi associado a soroconversão tanto para hepatite B quanto para hepatite C, entretanto, o autor comenta que como o número de transfusões sanguíneas tende a aumentar com o tempo de tratamento com hemodiálise, fica difícil estabelecer a importância de cada uma dessas variáveis, quando se usa uma análise não variada.

Em uma recente análise de 145 pacientes em hemodiálise crônica na França, o número de transfusões sanguíneas foi preditivo de positividade para anti-HCV (DUSSOL et al, 1995).

Por outro lado, vários outros autores não confirmam os dois achados acima, não encontrando associação significativa entre a positividade para o anti-HCV e o número de transfusões sanguíneas (HARDY et al, 1992; NIU et al, 1993; IRIE et al, 1994; KAPOOR et al, 1993; OKUDA et al, 1995 e SAMPIETRO et al, 1995).

Em uma análise multicêntrica de 499 pacientes de 11 centros de diálise de diferentes áreas geográficas dos Estados Unidos, foram seguidos para determinar

a prevalência e a incidência de anti-HCV, bem como, os fatores de risco para a infecção por este vírus. Foram detectados anticorpos contra o vírus C em 52 dos 499 pacientes, os quais não tinham história de transfusões sanguíneas. O tempo em diálise e o uso de drogas injetáveis foram preditores significativos de soropositividade nesta análise (NIU et al, 1993).

Em concordância com os dados da literatura, no presente estudo não demonstrou-se diferença estatisticamente significativa quanto a presença de transfusões sanguíneas feitas pelos pacientes que positivaram ou não o anticorpo anti-HCV que tenham as transfusões sido feitas antes da entrada no estudo ou após o seu início. Dos vinte e seis pacientes que receberam transfusões sanguíneas prévias a entrada em hemodiálise, seis pacientes soroconverteram, por outro lado, dos outros quarenta e cinco pacientes sem transfusões prévias, dezesseis pacientes soroconverteram.

Em relação ao número de transfusões sanguíneas durante o seguimento, a média de transfusões dos pacientes que soroconverteram foi 2,13 transfusões, enquanto que a média dos pacientes que não soroconverteram foi 1,42 transfusões. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa quanto ao número de transfusões, é interessante notar que, quatro pacientes receberam dez ou mais transfusões (2 pacientes receberam 10 transfusões, um paciente recebeu 12 transfusões e um, recebeu 17 transfusões) destes, três pacientes ao final do seguimento tinham anti-HCV positivo e apenas um deles permaneceu sem anticorpo anti-HCV.

Em função destes resultados, de acordo com os dados da literatura, sugere-se que uma exposição aumentada a um número maior de transfusões está

associada a uma maior incidência de positividade do anti-HCV. Todavia, o risco de infecção por HCV parece aumentar com o aumento do tempo em diálise, independente do número de transfusões, sugerindo uma possível transmissão intradialítica deste vírus (KAPOOR et al, 1993, SAMPIETRO et al, 1995, DUSSOL et al, 1995 e ROTH, 1995).

5.4-Níveis das transaminases

A análise dos níveis das transaminases no presente estudo foi realizada em 44 pacientes ao final dos 24 meses de seguimento. Não houve diferença nos níveis de ALT e AST entre os pacientes que soroconverteram e os que não o fizeram. Várias razões podem explicar estes resultados. Sabe-se que, caracteristicamente, na hepatite pelo vírus C os níveis de transaminases podem ser flutuantes, podendo, inclusive co-existirem lesões histológicas severas em pacientes com níveis normais de AST (POL et al, 1993, ALBERTI et al, 1992). De outra forma, a infecção pelo vírus C nem sempre está associada a doença hepática crônica (ALBERTI et al, 1992), além do que, os níveis basais de ALT tendem a estarem diminuídos nos pacientes em diálise (WOLF et al, 1972).

É importante considerar-se, que no presente estudo, foi realizada análise de apenas uma medida de AST e ALT, no final do seguimento. Não podendo-se dessa maneira, afirmar que não tenha ocorrido elevações nos níveis séricos das transaminases destes pacientes, em algum momento do estudo. Porém, é interessante a observação de alguns autores que relatam níveis de AST elevados somente em 27% dos pacientes com HCV RNA positivos, não tendo assim, o nível de AST, valor preditivo de viremia pelo HCV (FABRIZI et al, 1995).

5.5-Viremia

No presente estudo não houve concordância entre os resultados do ELISA III e PCR em 6 pacientes, os quais eram anti-HCV positivos mas não apresentavam viremia, em um paciente com anti-HCV negativo a PCR foi realizada mais de uma vez pois, apresentou um teste HCV RNA indeterminado e na segunda e terceira dosagens foi positivo e negativo, respectivamente, obtendo-se por realizar avaliação da carga viral do mesmo, que demonstrou presença de vírus em níveis baixos.

Houve concordância entre os resultados do ELISA III e a PCR em 76% dos casos analisados. A PCR é considerado o método “padrão ouro” para a detecção de infecção ativa na hepatite por vírus C (GARSON et al, 1990, ALBERTI et al, 1992), é o mais sensível porém menos prático, já que é relativamente sofisticado e de alto custo sendo assim de difícil aplicabilidade na prática clínica de rotina. Em função de sua complexidade, está sujeito a erros, principalmente no que se refere a contaminação com RNAses, que são muito estáveis e altamente ativas mesmo em concentrações muito baixas, podendo resultar na degradação enzimática de qualquer RNA presente, portanto, a amostra do material pode ser contaminada durante a coleta, centrifugação ou pipetagem se for realizada sob condições não ideais, resultando em não ocorrência da transcrição reversa, e portanto, um exame falso-negativo (KENNER et al, 1995).

E' também possível, que alguns pacientes que são anti-HCV positivos, mas tenham um RIBA ou PCR negativos possam realmente terem tido infecção por HCV em níveis muito baixos (SILVA et al, 1994). Para FARCI e cols (1992), o fato

de algumas vezes não haver concordância entre os exames podeira ser por uma insuficiência na sensibilidade da PCR em se detectar HCV RNA , ou possivelmente devido a viremia intermitente ou a um baixo número de cópias virais circulantes em um determinado momento.

Em um outro estudo FERNANDEZ e cols (1996), encontraram HCV RNA em 12,9% dos pacientes que eram anti-HCV negativos, uma explicação para essa diferença seria o fato de que a positividade do HCV RNA precede a soroconversão do anti-HCV na fase aguda (BOUCHARDEAU et al, 1993). Este fato é de extrema importância, já que pode haver viremia por HCV em paciente que tem anti-HCV negativos. Isto levanta a questão de quais os critérios de isolamento a serem utilizados para a prevenção da transmissão da hepatite por vírus C nas unidades de hemodiálise. Novamente aqui, o custo e a complexidade técnica inviabiliza a análise pela PCR como um método de rastreamento (FERNANDEZ et al, 1996).

Mesmo usando-se a técnica da PCR aninhadas, pode-se não detectar o RNA do HCV em indivíduos portadores de anticorpos. Tais resultados podem, mais uma vez ser devidos a sensibilidade inadequada da PCR, viremia em títulos baixos, ausência transitória de viremia ou em uma proporção menor dos casos, cura da infecção (GARSON et al, 1990). Por outro lado, PCR tem mostrado que o HCV RNA é quase que universalmente detectado na fase aguda da infecção por HCV (ALTER, 1995).

Alguns estudos em animais tem evidenciado o aparecimento de HCV RNA no soro dentro de poucos dias após a exposição ao HCV e quase que todos dentro de 2 semanas após a exposição (FARCI et al, 1992). Em humanos também demonstrou-se HCV RNA no soro dentro de 1 a 2 semanas após a exposição ao

HCV, precedendo o aumento da ALT, algumas vezes em 10 a 12 semanas (ALTER, 1995). Em pessoas que parecem recuperar-se da infecção por HCV, o HCV RNA geralmente declina ou desaparece antes do pico de elevação da ALT. Entretanto, na vasta maioria dos indivíduos (no mínimo 80%) o HCV RNA persiste, geralmente associado a flutuações nos níveis ALT e algumas vezes, inclusive na ausência de anormalidades bioquímicas. As implicações desta relação é que os pacientes podem ser mais infecciosos na fase que precede os sinais e sintomas de hepatite aguda (ALTER, 1995).

Tipicamente, na fase crônica da infecção, os níveis de HCV RNA são menores do que nos estágios agudos, entretanto, os níveis de RNA podem flutuar dramaticamente, e algumas vezes, mostram relação temporal com flutuações da ALT sérica, nestes casos, um aumento no HCV RNA precede imediatamente a elevação da ALT e uma redução do HCV RNA precede a redução da ALT (LAU et al, 1993).

5.6-Incidência

O risco de aquisição de infecção por HCV em hemodiálise tem sido estimado, ser de 10% ao ano (HARDY et al, 1992).

No presente estudo, encontramos uma incidência de soroconversão de 7,7% e 38,8% no primeiro e no segundo ano respectivamente.

Alguns autores demonstraram incidência anuais, entre 4,9 e 11,4% (CHAN et al, 1993 e ALFARAIH et al, 1992). É bem provável que estes resultados tenham subestimado as incidências reais, isto se deve ao fato de que os estudos acima citados, empregaram testes ELISA de primeira geração, cuja sensibilidade é grandemente reduzida quando comparado com testes de segunda geração e mais

recentemente, com os testes de terceira geração (FABRIZI et al, 1994 e COURACÉ et al, 1995).

Em um estudo nacional, CENDEROGLO e cols (1995), demonstraram, avaliando uma população de 129 pacientes anti-HCV negativos em hemodiálise crônica, uma incidência de 32% em 2 anos. No mesmo estudo, na comparação das taxas de soroconversão dos grupos de pacientes em hemodiálise e pacientes em CAPD, encontrou-se uma taxa de soroconversão de 0,15/paciente/ano e 0,03/paciente/ano, respectivamente. Da mesma forma, outros estudos também tem demonstrado que pacientes em diálise peritoneal tem um risco menor de infecção pelo HCV, se comparadas aos pacientes em hemodiálise (DUSSOL et al, 1995 e CHAN et al,1991).

Alguns fatores podem contribuir para este baixo risco de infecção pelo HCV nos pacientes em tratamento com CAPD. O fato de que os mesmos necessitam menor número de transfusões sanguíneas do que os pacientes em hemodiálise(CHAN et al, 1991), a redução no risco de exposição parenteral ao vírus já que não há necessidade de acesso venoso nem de um circuito extracorpóreo de sangue e a característica de que a diálise é realizada em casa oferecendo um ambiente isolado (BARREL & TRAVEL, 1995 e BRUGUERA et al, 1990).

Outro achado interessante do presente estudo, é que o maior número de soroconversões para anti-HCV positivo ocorreu após o primeiro ano de seguimento, é provável que tal achado ficasse ainda mais evidente se o acompanhamento destes pacientes fosse estendido por um período de tempo maior. Vários estudos confirmam estes dados (FABRIZI et al, 1993, FABRIZI et al,

1994, KNUDSEN et al, 1993, MULLER et al, 1992, CENDEROGLO et al, 1995), de que o tempo em diálise parece ter um papel importante na soroconversão do anti-HCV. Para um destes autores (CENDEROGLO et al, 1995), hemodiálise foi o único fator significativo associado ao desenvolvimento de infecção pelo HCV e o risco de de infecção pelo HCV foi 5,7 vezes maior em pacientes em hemodiálise quando comparado aos pacientes em tratamento com CAPD.

Outro fato ainda não completamente esclarecido e portanto, motivo de grande preocupação, é o papel da transmissão nosocomial desta infecção. Novamente aqui neste estudo, fica claro que grande parte dos pacientes que soroconverteram não tinham história de terem recebido transfusões sanguíneas. CENDEROGLO e cols, (1995) reforçam esta hipótese em seu estudo, quando levaram em consideração que a prevalência de anti-HCV positivo na população de doadores de sangue era de 2,2%, então, usando-se esta prevalência sem qualquer rastreamento para os doadores de sangue, seria esperado que somente um determinado número de pacientes soroconvertessem como resultados de transfusões sanguíneas e não o dobro do que o esperado como os autores observaram. Esta discrepância nos resultados poderia ser explicada pela transmissão nosocomial.

Alguns autores (SAMPIETRO et al, 1994), sugerem que a transmissão do HCV possa ocorrer através dos equipamentos de diálise. Estes autores investigaram as possíveis rotas de transmissão do HCV em pacientes em hemodiálise, examinando amostras de fluido coletado do dialisado e amostras do ultrafiltrado do sangue durante o tratamento dialítico de pacientes positivos para HCV RNA. Em 2 amostras, uma de dialisado e uma de ultrafiltrado, foram obtidos

produtos de PCR, cuja sequência era consistente com o subtipo viral previamente identificado nos pacientes. Os autores sugeriram que a passagem de partículas virais através das membranas de diálise, provavelmente ocorrem devido a microrupturas dos capilares levando a vazamentos de sangue. Estes achados indicam a existência de potenciais riscos de infecção cruzada pelo HCV pelos fluídos de diálise nos pacientes. Os autores sugerem ainda a desinfecção das máquinas após cada sessão de diálise e a segregação dos pacientes anti-HCV positivos.

SAMPIETRO e cols (1995), estudaram a heterogeneidade das variações das sequências genômicas do HCV em pacientes em hemodiálise, através da análise da forma de polimorfismo de um único filamento, obtidos dos produtos da PCR do genoma viral do HCV e de um grupo controle com doença hepática crônica relacionada ao HCV. Entre os 28 pacientes em hemodiálise com HCV RNA foram encontrados seis padrões diferentes, sendo que três deles, foram observados em 85% dos pacientes. Em contraste, no grupo controle foram encontrados 16 padrões diferentes, sendo que o mais frequente só foi encontrado em 12% dos pacientes. Quando se comparou os dois grupos, o padrão mais frequente nos pacientes em hemodiálise não era comum no grupo controle, ou seja, na população em geral, sendo 10 vezes mais frequente nos pacientes em hemodiálise. Essa relativa homogeneidade nas variantes do HCV em pacientes em hemodiálise e o fato destes serem incomuns na população em geral, reforça adicionalmente, a possibilidade da transmissão do HCV no ambiente de diálise.

Por fim, no presente estudo demonstrou-se uma alta incidência de infecção por vírus C na população de pacientes em hemodiálise, onde as transfusões

sanguíneas não foram o fator de risco mais importante, havendo claras evidências de ter ocorrido transmissão nosocomial. Todavia sua rota ainda necessita ser elucidada. Não obstante, a prevenção da infecção pelo HCV em nossas unidades de diálise só será possível, quando os fatores que facilitam esta infecção forem melhores entendidos e controlados.

5.7-Relação Prevalência/Incidência

Vários estudos tem demonstrado a existência de uma correlação direta entre a incidência e a prevalência de HCV nas unidades de hemodiálise. JADOUL e cols (1993), demonstraram que pacientes tratados em uma unidade de hemodiálise com alta prevalência de infecção por HCV tem um maior risco de aquisição da mesma. Estes mesmos autores, em um estudo colaborativo, avaliaram a frequência de HCV em 401 pacientes de 15 unidades de diálise diferentes por um período de 18 meses, demonstrando que a prevalência que variou de zero a 31% nas 15 unidades participantes, sendo a prevalência média 13,4% e a incidência anual média de 1,7%. Há também relatos de que nas unidades que apresentaram prevalência de pacientes anti-HCV positivos menor do que 19%, a incidência de soroconversão foi de 2,5% ao ano, comparado a 35,3% de incidência anual nas unidades de diálise em que os casos prevalentes ultrapassaram 60% (PEREIRA & LEVEY, 1997).

No presente estudo, assim como na literatura, demonstrou-se claramente esta associação entre maior prevalência e maior incidência. Em uma das unidades estudadas, a prevalência de anti-HCV foi de 42,8% e a incidência em 2

anos foi de 66,6%. Em outra unidade, onde a prevalência de anti-HCV foi 22,6% a incidência em 2 anos foi de 16,6%. Estes dados demonstram claramente, o risco aumentado de aquisição de infecção por HCV em unidades onde a prevalência do mesmo é elevada, levantando, novamente, a questão da prevenção da infecção pelo HCV nos pacientes que recebem tratamento hemodialítico em unidades com este perfil epidemiológico de infecção pelo HCV.

6. CONCLUSÕES

- 1.** Em nosso meio, existe uma elevada incidência de infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes mantidos em tratamento hemodialítico crônico.
- 2.** O tempo em tratamento dialítico está associado a um aumento significativo na percentagem de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C. Transfusões sanguíneas e co-infecção pelo vírus da hepatite B não foram fatores significativamente associados.
- 3.** Ocorreu significativo grau de concordância entre o teste ELISA III e o teste da PCR, denotando elevado grau de concordância entre a presença de partículas virais e anticorpos.

7. RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C tornou-se um problema crescente nas unidades de hemodiálise. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a incidência de infecção pelo vírus da hepatite C em pacientes com insuficiência renal crônica mantidos em hemodiálise crônica em unidades de tratamento de Porto Alegre.

Pacientes e Métodos. Setenta e oito pacientes foram inicialmente arrolados no estudo, em sete constatou-se a presença de anticorpos anti-HCV prévios ao início do tratamento dialítico e eles foram excluídos por se tratarem de casos prevalentes. O teste diagnóstico utilizado foi o ELISA de terceira geração. Em uma parcela dos pacientes foram feitos testes utilizando-se a PCR. A presença de anticorpos foi testada aos 6, 12 e 24 meses. A pesquisa de viremia foi realizada aos 24 meses em 25 pacientes aleatoriamente selecionados.

Resultados. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre presença de infecção pelo vírus da hepatite B e soroconversão do anti HCV. Da mesma forma o número de transfusões sanguíneas e os níveis de transaminases séricas não foi estatisticamente diferente entre os pacientes que soroconverteram e os que não o fizeram. Encontrou-se elevado grau de concordância entre os resultados do ELISA III e a PCR. Por fim, a incidência atuarial de soroconversão foi de 4,3% aos 6 meses; 7,5% aos 12 meses e 38,9% aos 24 meses.

Conclusões. Existe uma elevada incidência de infecção pelo vírus da hepatite C nas unidades de tratamento dialítico no nosso meio; o risco de infecção parece ser proporcional ao tempo de exposição e a prevalência de infecção na unidade de tratamento; a presença de anticorpos está associada a viremia na maior parte dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, A; MORISCA, G; CHEMELLO, L; CAVALLETO, D; NOVENTA, F; PONTISSO, P; RUOL, A.: Hepatitis C viremia and liver disease in symptom free individuals with anti-HCV. *Lancet* 340: 8821-8824, 1992.
- ALFURAIH, O; SOBH, M; BUALI, A. R; BARRY, Y; OUNIBI, W; TAHER, S. - Hepatitis C infection in chronic haemodialysis patients, a clinicopathology study. *Nephrol Dial Transplant* 7:327-332, 1992.
- ALLISON, M; MOWAT, A; Mc CRUDEN, E. - The spectrum of chronic liver disease in renal transplant recipients. *Clin J Med* 301: 355-367, 1992.
- ALTER, H. I. Clinical, virological and epidemiology basis for the treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. *J Hepatology* 11 (suppl 1): 519-525, 1990.
- ALTER, H.J; BRADLEY, D.W. - Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (non-ABC). *Semin Liver Dis* 15: 110-120, 1995.
- ALTER, H. J; NAKATSUJI, Y; MELPOLDER, J; WAGES, J; WESLEY, R; SHIH, WK; KIM, P. - The incidence of transfusion associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *New Engl J Med* 336: 747- 754, 1997.
- ALTER, H. J; MARGOLIS, H. S. et al - Clinical outcome and risk factors associated with hepatitis C in the United States. *Hepatology* 10:581, 1989.
- ALTER, H. J; PURCELL, R. H; SHIH, J. W; MELPOLDER, J. C; HOUGHHTON, M; CHOO, Q-L. - Detection of antibody to Hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A,non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321: 1494-1500, 1989.

- ALTER, H.J.: To C or not to C: These are the questions. *Blood* 85: 1681-1695, 1995.
- ALVES. D.M.; SOARES, M.C.P.C et al: Surto de hepatite C em uma unidade de hemodiálise no estado do Pará, Brasil - resultados preliminares- XVI Congresso Brasileiro de Nefrologia - Livro de Resumo 1: 3 (Resumo).
- BALBI, A.L; MARTIN, L.E; BARRETTI, P; HABERMANN, F; FRANCO, R.J.S.- Hipertensão arterial essencial como causa de Insuficiência renal crônica. In: Cruz e Toledo Barros. *Atualidades em Nefrologia 4*. Editora Sarvier, São Paulo, 1996.
- BARREL, G; TRAVEL, J.A. Prevalence of hepatitis C virus in dialysis patients in Spain. *Nephrol Dial Transplant* 10 (suppl 6): 78-80, 1995.
- BERTHOUX, F. Hepatitis C virus infection an disease in renal transplantation. *Nephron* 71: 386-394, 1995.
- BOLETIS, J; DELADETSIMA, J; PSIMENOU, E; VAFADI, I; TZALA, E; KATSOULIDOU, A; KOSTAKIS, A; HATZAKIS, H; VOSNIDES, G. - Liver biopsy in essential in anti-HCV (+) renal transplant patients inespective of function tests and serology for HCV. *Transplant Proc* 27: 945-948, 1995.
- BOOM, R; SOL, C.J; SALIMANS, M.M; JANSEN, C.L; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M; VAN DER NOORDAA, J. – Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiology* 28: 495-503, 1990.
- BOTARELLI,P; BRUNETTO, M.R; MINUTELLO, M.A; CALVO, P; UNUTMAZ, D; WIENER, A.J; CHOO, Q-L; SHUSTER, J.R; KUO, G; BONINO, F. - T-

lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical sources of infection. *Gastroenterology* 104:580-7, 1993

- BOUCHARDEAU, F; CHAUVEAU, P; LeMARREC, N; GIRAULT, A; ZINS, B; COUROUCE, A.M.- Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction in haemodialysed patients in relationship to anti-HCV status. *Res Virol* 144: 233-242, 1993.
- BRUGUERA, M; VIDAL, L; SANCHEZ-TAPIAS, J.M; COSTA, J; REVERT, L; RADES, J. Incidence and features of liver disease in patients on chronic haemodialysis. *J Clin Gastroenterol* 12: 298-302, 1990.
- CENDOROGLO-NETO, M.; DRAIBE, S.A.; SILVA, A.E.; FERRAZ, M. L; GRANATO, C; PEREIRA, C.A.P; SESSO, R.C; GASPAR, A.M.C; AJZEN, H.- Incidence of risk factors for hepatitis B and hepatitis C virus infection among haemodialysis and CAPD patients: Evidence for environment transmission. *Nephrol Dial Transpl* 10: 240-246, 1995.
- CHA, F.A.; BEDL, E.; IRVINE, B. - At least five related, but distinct hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Nat Acad Sci* 89: 7144- 7148, 1992.
- CHAN, T.M; LOK, A.S.F; CHENG, I.K.P.- Hepatitis C infection among dialysis patients: A comparison between patients on maintenance hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 6: 944-947, 1991.
- CHAN, T.M; LOK, A.S.F; CHENG, I.K.P; CHAN, R.T. - Prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: A longitudinal study comparing the results of RNA and antibody assays. *Hepatology* 17: 5-8, 1993.

- CHAUVEAU, P; COUROUCE, A.M; LEMAREC, N; NARET, C; POIGNET, J-L; GIRAULT, A; RAMDAME, M; DELOM, S.: Antibodies to hepatitis C virus by second generation test in hemodialysis patients. *Kidney Int* 43: suppl: 149-152, 1993.
- CHOO, Q.L; KUO, G; WEINER, A. J; OVERBY, L. R; BRADLEY, D. W; HOUGHTON, M. - Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-62,1989.
- CHOO,Q.L; WEINER, A.J; OVERBY, L.R; KUO, G; HOUGHTON, M; BRADLEY, D.W. - Hepatitis C virus: The major causative of viral non-A,non-B hepatitis. *Br Med-Bull* 46:423-441, 1990.
- COHEN, J.J; HARRINGTON, J,T; MADIAS, N.- Hepatitis C in renal transplantation. *Kidney Int* 52: 843-861, 1997.
- COURSAGET, P.; LESAGE, G.; BOURDIL, C.; KASTALLY, R; IVONNET, B; RAMPANARINO, Z; CHIRON, J.P; BAO, O; DIOP-MAR, I; PERRIN, J; NTAREME, F. - Hepatitis C virus infection in diseases in tropical Africa (Senegal), International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases, Houston, Texas, USA, april 4-8, 1990.
- COUROUCÉ, A.-M; BOUCHARDEAU, F; CHAUVEAU, P; Le MARREC, N; GIRAULT, A; ZINS, B; NARET, C; POIGNET, J.-L. - Hepatitis C virus (HCV) infection in haemodialysed patients: HCV-RNA and anti-HCV antibodies (third-generation assays). *Nephrol Dial Transpl* 10:234-239, 1995.
- DAVIS, G. L; BALART, L. A; SCHIFF, E.R; LINDSAY, K; BODENHEIMER, H.C; PERILLO, R.P; CAREY, W; JACOBSON, I.M; PAYNE, J; DIENSTAG, J.L; VAN THIEL, D.H; TAMBURRO, C; LEFKOVITCH, J; ALBRECHT, J; MESCHIEVITZ,

C; ORTEGO, T.J; GILAS, A; and the Hepatitis International Therapy Group: Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. N Engl J Med 321: 1501-6, 1989.

- DEBURE, A; DEGOS, F; POL, S; DEGOTT, C; CARNOT, F; LUGASSY, C; LACOMBE, M; KREIS, H.- Liver diseases and hepatic complications in renal transplant patient. Adv Nephrol 17:375-400,1988.
- DE GROOT, J. - Prevalence and significance of anti-HCV antibodies. Acta Gastroenterology 54: 248-256, 1991.
- DIENSTAG, J. L; ALAAMA, A.; MOSLEY, J.W; REDEKER, A.G; PURCELL, R.H.: Etiology of sporadic hepatitis B surface antigen-negative hepatitis. Ann Intern Med 87:1-6, 1977.
- DRUWÉ, P.M; MICHELSEN, P.P; RAMON, A.M; De BROE, M.E. - Hepatitis C and Nephrology. Nephrol Dial Transplant 9: 230-237, 1994.
- DuBOIS, D.B; GRETCH, D; ROSA, C.D; LEE, W; FINE, J; BLAGG, C.R; COREY, L.: Quantification of Hepatitis C viral RNA in sera of hemodialysis patients: Gender-related differences in viral load. Am J Kidney Dis 24: 795-801, 1994.
- DUSHEIKO, G.M; RIZZETO, M. - The management of chronic hepatitis C. Synopse in viral hepatitis. Adelphi Communications Ltd: 2-15,1992.
- DUSSOL, B; BERTHEZÈNE, P; BRUNET, P; ROUBICEK, C; BERLAND, Y. - Hepatitis C virus infection among chronic dialysis patients in the south of France: A collaborative Study. Am J Kid Dis 25: 399- 404, 1995.

- ELISAF, M; TSIANOS, E; MAURIDIS, A. - Antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV) in haemodialysis patients: Association with hepatitis B serological markers. *Nephrol Dial Transpl* 6:476-479, 1991.
- ENOMOTO, N.; TALADA, A.; NAKAO, T; DATE, T. - There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1021-1025, 1990.
- ESTEBAN, J.I.; ESTEBAN, R.; VILADOMIU, L.; LOPES TALAVERA, J. C; GONZALES, A; HERNANDEZ, J.M; ROGET, M; VARGAS, V; GENESCA, J; BUTI, M; GUARDIA, J; HOUGHTON, M; CHOO, Q. L. & KUO, G.- Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* ii: 294-296, 1989.
- ESTEBAN, J. I; GENESCA, J; ALTER, H. J. - Hepatitis C: Molecular biology, pathogenesis, epidemiology, chemical features and prevention. *Progress live Disease* 10:253-282, 1992.
- FABRIZI, F; RAFFAELLE, L; BACHINI, I; GUARNORI, I; PONTORIERO, G; ERBA, G; LOCATELLI, F.- Antibodies to hepatitis C virus (HCV) and transaminase concentration in chronic hemodialysis patients: A study with second-generation assays. *Nephrol Dial Transplant* 8: 744-747, 1993.
- FABRIZI, F; LUNGHI, G; GUARNORI, I; RAFFAELLE, L; CREPALDI, M; PAGARRO, A; LOCATELLI, F.- Incidence of seroconversion for hepatitis C virus in chronic haemodialysis patients: A prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 9: 161101615, 1994.
- FABRIZI, F; LUNGHI, G; GUARNORI, I; RAFFAELLE, L; Di FILLIPO, S; ERBA, G; PAGANO, A; LOCATELLI, F.- Virological characteristics of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Clinical Nephrology* 44: 49-55, 1995.

- FABRIZI, F; RAFFAELLE, L; GUARNORI, I; BACCHINI, G; MARAI, P; ERBA, G; LOCATELLI, F.- Comparison of second generation screening and confirmatory assays with recombinant antigens and sintetic peptides against antibodies to hepatitis C virus: A study in Renal Patients. *Nephron* 69: 444-448, 1995.
- FARCI, P; ALTER, H. J; GOVIDARAJAN, S; WONG, D. C; ENGLE, R; LENIEWSKI, R. R; MUSHAHWAR, I. K; DESAI, S. M; MILLER, R. H; OGATA, N; PURCELL, R. H.- Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258:135-40, 1992.
- FARCI, P; LONDON, W.T; WONG, D.C; DAWSON, G.J; VALLARI, D.S; ENGLE, R; PURCELL, R.H.: The natural history of infection with hepatitisC virus (HCV) in chimpanzees: Comparison of serologic responses measured with first and second generation assays and relationship to HCV viremia. *J Infect Dis* 165: 1006, 1992.
- FERNANDEZ, J.L; DEL PINO, N; LEF, L; VALTUILLE, R; BERRIDI, J; RENDO, P; VIOLA, L.: Serum hepatitis C virus RNA in anti- HCV negative hemodialysis patients.*Dialysis & Transpl* 25: 14-18, 1996.
- GARSON, J.A; TEDDER, R.S; BRIGGS, M; TUKE, P; GLAZEBROOK, J.A; TRUTE, A PARKER, D; BARBARA, J.AJ; CONTRERAS, M; ALOYSIUS, S.: Detection of hepatitisC viral sequence in blood donations by “nested”polymerase chain reaction and prediction of infectivite. *Lancet* 335: 1419-1422, 1990.
- GARSON, J.A; RING, C.J; TUKE, P.W.: Improvement of HCV genome detection with “short” PCR products. *Lancet* 338: 1466-1467, 1990.

- GILES, J. P; MC COLLUM, R.W, et al- Relation of Australia/SH antigen to the willowbrook MS-2 strain. *N Engl J Med* 281:119-21, 1969.
- GONÇALVES Jr, F. L; BARRAVIERA, B.- Hepatite por vírus C, revisão 1995. *Jornal Brasileiro de Medicina* 2: 38-48, 1995.
- GONZAGA, R.V; SCHESTATSKY, P; MELLO, P.R; FONTOURA, R.R; BARROS, E; THOMÉ, F.S. Seguimento de uma coorte de pacientes em tratamento dialítico em Porto Alegre- RS. *Jornal Bras Nefrologia* 18: 117, 1996. Abstrat.
- GROSS, J. B. Jr; DAVID, H: Hepatitis C : Advances in diagnosis. *Mayo Clin Proc* 70: 296-297, 1995.
- HAN, J, H; SHYAMALA, U; RICHMAN, K; BRAUER, M.J; IRVINE, B; URDEA, M.S; TEKAMP-OLSON, P; KUO, P; CHOO, Q-L; HOUGHTON, M. - Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequence in the 5'untranslated region and poly (A) tail at the 3'end. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1711-5, 1991.
- HARDY, N. M; SANDRONI, S; DANIELSON, S; WILSON, W. J; - Antibody to hepatitis C virus increases with time haemodialysis. *Clinical Nephrol* 38:44-48, 1992.
- HIJIKATA, M; MIZUSHIRNA, H; AKAGI, T; MORI, S; KAKUICHE, N; KATO, N; TANAKA, T; KIMURA, K; SHIMOTOHOMO, K. - Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67:4665-75, 1993.

- HOUGHTON, M; WEINER, A; KUO, G; CHOO, Q. L. - Molecular biology of the hepatitis C virus: Implications for diagnosis development and control. *Hepatology* 14:381-8, 1991.
- IRIE, Y; HAYASHI, H; YOKOZIKI, K; KASHIMA, T; OKUDA, K. -Hepatitis C infection unrelated to blood transfusion in hemodialysis patients. *J Hepatology* 20: 557-559, 1994.
- JADOUL, M; CORNU, C; PAIS, E; Second generation tests for hepatitis C virus (HCV) in haemodialysis patients. *Ann Intern Med* 115:747-748,1991.
- JADOUL,M; CORNU, C; STRIHOU, C. V. Y; VCL COLLABORATIVE GROUP: Incidence and risk for hepatitis C seroconversion in haemodialysis: A prospective study. *Kidney Int* 44: 1322-1326,1993.
- JEFFERS, L.J; PEREZ, G.O; DeMEDINA, M.D; ORTIZ-INTERIAN, C.J; SCHIFF, E.R; REDDY, K.R; JIMENEZ, M; BOURGOIGNIE, J.J; VAAMONDE, C; DUNCAN, R; HOUGHTON, M; CHOO, Q-L.: Hepatitis C infection in two urban hemodialysis units. *Kidney Int* 38: 320-322, 1990.
- KAPOOR, M; EI-RESHAID, K; AI-MUFTI, S; SANAD, N.A; KOSHY,A.- Is dialysis environment more important than blood transfusion in transmission of hepatitis C virus during hemodialysis? *Vox Sang* 65: 331, 1993.
- KAROHL, C.; MANFRO, R.C; SENGER, M.B; THOMÉ, F.S; GONÇALVES, L.F; RIGATTO, M; PROMPT, C.A.: Prevalência de anticorpo anti-virus da hepatite C em pacientes em hemodiálise crônica em Porto Alegre. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 17: 40-46, 1995.

- KENNER, L; EI-SHABRAWI, Y; WIRNSBERGER, G; HORINA, J.: Polymerase chain reaction for the diagnosis of viral hepatitis C in clinic Medicine. *Nephron* 69: 180, 1995.
- KIYOSAWA, K; AKAHANE, Y; NAGATA, A; FURUTA, S. - Hepatocellular carcinoma after non-A, non-B post-tranfusion hepatitis. *Am. J. Gastroenterology* 79: 771-81,1984.
- KÖKSAL, I.; BIBEROGLU, S.; KOÇ, F; AYMA, Y; AKER, F; KÖKSAL, H.- Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Turkey. *Infection* 19: 228-229, 1991.
- KOZIEL, M. J; DUDLEY, D; WONG, J.T; DIENSTAG, J; HOUGHTON, M; RAESTON, R; WALKER, B.D.- Intrahepatic citotoxic T- limphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunology* 149:3339-44, 1992.
- KÜHNL, P.; SEIDL, S.; STANGEL, W.; BEYER, J.; SIBROWSKI, W.; FLIK, J.: Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* ii: 324, 1989.
- KUHNS, M; De MEDINA, M; McNAMARA, A; JEFFERS,L.J; REDDY, R; SILVA, M; ORTIZ-INTERIAN, C; JIMENEZ, M; SCHIFF, E.: Detection of Hepatitis C virus RNA in hemodialysis patients. *J Am Soc of Nephrology* 4: 1491-1497, 1994.
- KNUDSEN, F; WANTZEN, P; RASMUSSEN, K; LADEFOGED, S.D; LOKKEGAARD, N; RASMUSSEN, L.S; LASSEN, A; KROGSGAARD, K.: - Hepatitis C in dialysis patients: Relationship to blood tansfusions, dialysis and liver disease. *Kidney Int* 43: 1353- 1356, 1993.

- KUO, G; CHOO, Q. L; ALTER, H. J; GITNICK, G. L; REDEKER, A. G; PURCELL, R. H; MIYAMURA, T; DIENSTAG, J. L; ALTER, M. J; STEVENS, C. E; TEGTMEIER, G. E; BONINO, F; COLOMBO, M; LEE, W, S; KUO, C; BERGER, K; SCHUSTER, J. R; OVERBY, L. R; BRADLEY, D. W; HOUGHTON, M. - An assay for circulating antibody to a major etiologic virus of human non-A,non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364, 1989.
- LAU, J.Y.N; DAVIS, G.L; KNIFFEN, J; OIAN, K-P; URDEA, M.S; CHAN, C.S; MIZOKAMI, M; NEUWALD, P.D; WILBER, J.C.: Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 341: 1501, 1993.
- LEMON, S.M; BROWN, EDWIN.- Hepatitis C virus. In: Mandell, Douglas e Bennett's. Principles and practice of infectious diseases. 4^a edição. Editora Churcell Livingstone Inc. Vol:2, 1474-1486. 1995.
- LIN, D.Y.; LIN, H.H.; HUANG, C.C.; LIAW, Y.F.; High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Taiwan. *Am J Kidney Dis* 21: 288-291, 1993.
- MACHIDA, J; YAMAGUCHI, K; UEDA, S; YOSHIDA, M; KUSUMOTO, G; NISHIMURA, Y; FUTANE, G; ISHII, T; WATANABE, T; TAKATSUKI. K. - High incidence of hepatitis C virus antibodies in hemodialysis patients. *Nephron* 60: 117-118, 1992.
- MAGNIUS, LO; ESPMAK, J.A - New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouveir determinants. *J Immunol* 3: 1017-1021,1972.
- MANFRO, R.C; KAROHL, C; GONÇALVES, L.F; SENGER, M.B; THOMÉ, F.S; PROMPT, C.A. - Liver function tests in hepatitis C virus infected kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 27: 1821-1822, 1995.

- MARCELIN, P; BENHAMOU, J.P. - Natural history of hepatitis C virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 43: 669-673, 1995.
- MARTELL, M; ESTEBAN, J. I; ILNER, J. et al - Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely relation genome: Quasespecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66: 3225-9, 1992.
- Mc FARLANE, I; SMITH, H; JOHSON, P; BRAY, G; VERGANI, D; WILLIANS, R. : Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: Pathogenetic factor or falso positive result? *Lancet* 335: 754-757, 1990.
- McHUTCHISON, J.G.; PERSON, J.L.; GOVINDARAJAN, S. VALINLUCK, B; GORE, T; LEE, S.R; CHIEN, D; Di NILLO, R; QUAN, S; KUO, G; REDEKER, A.G.: Improved detection of hepatitis C antibodies in high-risk populations. *Hepatology* 15: 19-25 , 1992.
- McOMISCH, F; UAP, P. L; DOW, B.C; FOLLETT, A.C; SEED, C; KELLER, A.J; COBAIN, T.J; KRUSIUS, T; KOLHO, E; NAUKKARINEN, R; LIN, C; LEONG, S; MEDGYESI, G.A; HÉJJAS, M; KIUOKAWA, H; FUKADA, K; CUYPERS, T; SAEED, A.A; AL-RASHEED, A.M; LIN,M; SIMMONDS, P. - Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors an international collaborative Survey. *J Clin Microbiol* 32:881-92, 1994.
- MENITOVE, J.E.; RICHARDS, W.A.; DESTREE, M.: Early U. S. experience with anti-HCV kit in blood donors. *Lancet* 336: 244-245, 1990.
- MILLER, R. H; PURCELL, R. H. - Hepatitis C virus shares aminoacids with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus aupergroups. *Proc Acad Sci* 87:2057-61, 1990.

- MORTIMER, P. P; COHEN, B. J; LITTON, P. A; VANDERVELDE, E. M; BASSEDINE, M. F; BRIND, A. M; HAMBLING, M. H.- Hepatitis C antibody. Lancet 2: (letter), 1989.
- MOLALES J.M; MUNOZ, G; CASTILLONO, F; COLINA, A; FUERTES, A; ANDRES, A; CAMPO, C; BLASCO, A; HERNANDEZ, E; RODICIO, J.L. - Impact of hepatitis C in long-functioning renal transplants: A clinicopathological follow-up. Transplant Proc 25: 1450-1453, 1993.
- MULLER, G. Y; ZABELETA, M. E; ARMINIO, A; COLMENARES, C. J; CAPRILES, F, I; BIANCO,N. E; MACHADO, I. V. - Risk factors for dialysis associated hepatitis C in Venezuela. Kidney Int 41: 1053-1058,1992.
- NIU, M.T.; ALTER, M.J.; KRISTENSES, C.; MARGOLIS, H.S.; Outbreak of hemodialysis-associated non-A, non-B hepatitis and correlation with antibody for hepatitis C virus. Am J Kidney Dis 19: 345-352, 1992.
- NIU, M.T; COLEMAN, P.J; ALTER, M.J. - Multicenter study of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients and hemodialysis center staff members. Am J Kid Dis 22: 568-573, 1993.
- OGATA, N.R; ALTER, H.J; MILLER, R.H; PURCELL, R.H.- Nucleotide sequence and mutation rate of the strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA. 88:3392-6, 1991.
- OGUCHI,H.; MIYASALRA, M; TOKUNOGA, S; HORA, K; ICHIKAWA, S; OCHI, T; YAMADA, K; NAGASAWA, M; KANNO, Y; AIZAWA, T; WATANABE, H; YOSHIZAWA, S; SATO, K; TERASHIMA, M; YOSHIE, T; OGUCHI, S; TANAKA, E; KIYOSAWA, K; FURUTA, S. -Hepatitis virus infection (HBC and HCV) in eleven japonese haemodialysis units. Clin Nephrol 38: 36-43, 1992.

- OKAMOTO, H.; SUGIYAMA, Y.; OKADA, S; KURAI, K; AKAHANE, Y; SUGAI, Y; TANAKA, T; SATOH, K; TSUDA, F; MIYAKAWA, Y; MAYUMI, M.: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73: 673-679, 1992.
- OKAMOTO, H; KURAI, K; OKADA, S-J; YAMAMOTO, K; LIZUKA, H; TANAKA, T; FURUKA, S; TSUDA, F; MISHIRO, S. - Full length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: Comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188: 331-41, 1992.
- OKAMOTO, H; KOJIMA, M; OKADA, S-I; YOSHIZAWA, H; IIZUKA, H; TANAKA, T; MUCHMORE, E.E; PETERSON, D.A; ITO, Y; MISHIRO, S. - Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2 year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190: 894-9, 1992.
- OKUDA, K; HAYASHI, H; KOBAYASHI, S; IRIE, Y.- Mode of hepatitis C virus infection not associated with blood transfusion among chronic hemodialysis patients. *J Hepatology* 23: 28-31, 1995.
- PEREIRA, B.J.G; LEVEY, A.S.- Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int* 51: 981-999, 1997.
- PEREIRA, L.M.M.B.; SALEH, M.G.; TIBBS, C.J.; et al. Genótipo do Vírus da Hepatite C no Brasil. 12o Congresso Brasileiro de Hepatologia, Salvador-BA, 22 a 25 de setembro de 1993. Abstr. nº 09.
- PETROSILLO, N; SCACCIA, F; PURO, V; IPPOLITO, G. Hepatitis C virus transmission in dialysis (letter). *Nephron* 63: 115, 1993.

- POL, S; ROMEO, R; ZINS, B; DRISS, F; LEBKIRI, B; CARNOT, F; BERTHELOT, P; BRÉCHOT, C.- Hepatitis C virus RNA in anti-HCV positive hemodialyzed patients: Significance and therapeutic implications. *Kidney Int* 44: 1097-1100, 1993.
- POL, S; DEBURE, A; DEGOTT, C; CARNOT, F; LEGENDRE, C; BRÉCHOT, C; KREIS, H. - Chronic hepatitis in kidney allograft recipients. *Lancet* 335: 878-880, 1990.
- PONZ, E; CAMPISTOL, J.M; BRUGUERA, M; BARRERA, J. M; GIL, C; PINTO,J.B; ANDREU, J. - Hepatitis C infection among Kidney transplant recipients. *Kidney Int* 40:748-751, 1991.
- PRINCE, A. M.; BROTMANN, B; GRADY, G.F. - Long incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 2:241-6,1974.
- PRINCE, A. M; BROTMAN, B; HUIMA, T; PASCUAL, D; JAFFERY, M; INCHAUSPE, G. - Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 165:438-43, 1992.
- RAKELA, J. & REDEKER, A. G. - Chronic liver disease after acute non-A,non-B viral hepatitis. *Gastroenterology* 77:1200, 1979.
- RAO, K; ANDERSON, W; KASISKE, B; DAHL, D. - Value of liver biopsy in the evaluation and management of chronic liver disease in renal transplant recipients. *Am J Med* 94: 241-250, 1993.
- RIZZETTO, M; CANESE, M. G; ARICO, S; CRIVELLI, O; TREPO, C; BONINO, F; VERME, G. - Immunofluorescence detection of new antigen- antibody sistem

associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAG carriers. Gut 18:997-1003, 1977.

- ROSINA, F; SARACCO, G; RIZZETTO, M. - Risk of posttransfusion infection with the hepatitis delta virus. N Engl J Med 312: 1488-91, 1985.
- ROSELLO, L; FERNANDEZ, E; LOPEZ-TALAVERA, J; BRUGUERA, M; MONTOLIU, J.- Hepatitis C in hemodialysis patients: Prognosis and diagnostic value of transjugular liver biopsy (abstract). In XIIth International Congress of Nephrology, Jerusalém, 1993.
- ROTH, D; ZUCKER, K; CIRROCO, R; DE MATTOS, A; BURKE, G.W; NERY, J; ESQUENAZI, V.; BABISCHKIN, S; MILLER, J.: The impact of hepatitis C virus infection on renal allograft recipients. Kidney Int 45: 238-244, 1994.
- ROTH, D.- Hepatitis C virus: The nephrologist's view. Am J Kid Dis 25: 3-16, 1995.
- SAMPIETRO, M; BADALAMENTI, S; SALVADORI, S; CORBETTA, N; GRAZIANI, G; COMO, G; FIORELLI, G; PONTICELLI, C.- High prevalence of a rare hepatitis C virus in patients treated in the same hemodialysis unit: Evidence for nosocomial transmission of HCV. Kidney Int 47: 911-917, 1995.
- SAMPIETRO, M; GRAZIANI, G; BADALAMENTE, S; SALVADORI, S; CALDARELLI, R; COMO G; FIORELLI, G.: Detection of hepatitis C virus in dialysate and in blood ultrafiltrate of HCV-positive patients. Nephron 68: 140, 1994.
- SHAKIL, A.O; CONRY-CANTILENA, C; ALTER, H.J; HAYASHI, P; KLEINER, D.E; TEDESHI, V; KRAWCZYNSKI, K; CONJEEVARAN, H.S; SALLIE, R; Di BERCEGLE, A.M.- Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus:

Clinical, biochemical, virologic and histology features. The hepatitis C study group. *Ann Intern Med* 123: 330-337, 1995.

- SCHLIPKÖTER, U; ROGGENDORF, M; ERNEST, G; RASSHOFER, R; DEINHARDT, F; WEISE, A; GLADZIWA, U; LUZ, N. - Hepatitis C virus antibodies in haemodialyses patients. (letter). *Lancet* 335:1409, 1992.
- SHERLOCK, S; & DUSHEIKO, G; - Hepatitis C virus updated. *Gut* 32: 965-7, 1991.
- SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. - Viral Hepatitis. Ed Disease of the liver and biliary Sistem. Ninth Edition. Blackwell Scientific Publications, 260-292, 1993.
- SHEU, J. C; LEE, S. H; WANG, J. T; SHIH, L.N; WANG, T. H; CHEN, D. S; Prevalence of anti-HCV and HCV viremia in haemodialysis oatients in Taiwan. *J Med Virol* 37: 108-112, 1992.
- SILVA, A.E; HOSEIN, B; BOYLE, R; FANG, C,T; SHINDO, M; WAGGONER, J.G; HOOFNAGLE, J.H; BISCEGLIE, A.M.: Diagnosis of chronic hepatitis C: Comparison of immunoassays and the polymerase chain reaction. *Am J of Gastroenterology* 89: 493-496, 1994.
- SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J.; BONINO, F; DANIEL, W; BRADLEY, C. B; BRECHOT, C; BROUWER, T; CHAN, S-W; CHAYMA, K.- A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19: 1321-1324, 1994.
- SIMMONDS, P; HOLMES, E.C; CHA T-A; CHAN, S.W; McOMISH, F; IRVINE, B; BEALL, E; YAP, P.I; KELBERG, J; ORDEA, M.S.- Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74: 2391-9, 1993.

- SUZICH, J. A; TAMURA, J.K; PALMER-HILL, F; WARRENER, P; GRAKOU, A; RICE, C.M; FEINSTONE, S.M. - Hepatitis C virus NS3 and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 67:6152-8, 1993.
- TABOR, E; GERETY, R. J. -Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1:463-6, 1978.
- TERUEL, J; PASCUAL, J; LIANO, F; ORTUNO, J. - Importance of nosocomial transmission of hepatitis C virus infection in dialysis units (letter). *Clin Nephrol* 38: 177-178, 1992.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K; LIZUKA, N; KOHARA, M.; NOMOTO, A. - Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66:1476-83, 1992.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KOHARA, M.; YAMAGUCHI, K.; MAKI, N; TOYOSHIMA, A; MIKI, K; TANAKA, S; HATTORI, N; NOMOTO, A. - A second group of hepatitis C viruses. *Virus Genes* 5: 243-254, 1991.
- VANDELLI, L.; MEDICI, G.; SAVAZZI, A.M.; LUSVARGHI, E.- Behavior of antibody profile against hepatitis C virus in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron* 61: 260-262, 1992.
- WEINER, A. J; THALER, M. M; CRAWFORD, K; CHING, K; KANSOPON, J; CHIEN, D.Y; HALL, J.E; HU, F; HOUGHTON, M. - A unique predominant hepatitis C virus variant found in a infant born to a mother with multiple variants. *J Virol* 67: 4365-8, 1993.
- WILBER, J. C; POLITO, A: Serological and virological diagnostic tests for hepatitis C virus infection. *Seminars Gastrointestinal Disease* 1: 13-19, 1995.

- WOLF, P,L; WILLIAN, D; COPLAN, N; COULSON, A.,D.- Low aspartate transaminase activity in serum of patients undergoing chronic hemodialysis. Clin Chem 18: 567-573, 1972.
- YAMAGUCHI, K; NISHIMURA, Y; FUKUOKA, N; MACHIDA, J; UEDA, S; KUSUMOTO, Y FUTAMI, G; ISHII, T; TAKATSUKI, K. - Hepatitis C virus antibodies in haemodialyses patients. Lancet 335:1409, 1990.
- YOO, B. J; SPAETE, R.R; GEBALLE, AP; SELBY, M; HOUGHTON, M; HAN, J.H. - 5' End-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region. Virology 191:889-99, 1992.
- ZELDIS,J. B; DEPNER, T. A; KUMRAMOTO, I. K; GISH, R. G; - The prevalence of hepatitis C virus antibodies among haemodialysis patients. Ann Int Med 112: 985,1990.

10. ANEXO

Termo de consentimento

Eu _____ pelo presente consentimento pós-informação, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa do procedimento a que serei submetido, dos riscos, desconforto e benefícios da presente pesquisa.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta em relação a presente pesquisa;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;
- Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;
- De que não terei despesas por participar do estudo e que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador