



**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA  
FMUSP**

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C  
POR PCR EM TEMPO REAL PELA ANÁLISE  
DA REGIÃO NS5B**

Sueli Massumi Nakatani

Orientadora: Suzane Kioko Ono-Nita



## IMPACTO GLOBAL DA INFECÇÃO

	<b>VHC</b>	<b>HIV</b>
<b>Prevalência global</b>	<b>3,0%</b>	0,34%
<b>USA</b>	<b>1,8%</b>	0,60%
<b>França</b>	<b>1,2%</b>	0,44%
<b>Brasil</b>	<b>1,5%</b>	0,50%

*Alter et al, 1994*

Ministério da Saúde - 2005



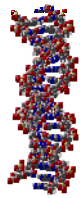
# GENOTIPAGEM DO VHC

VALOR PROGNÓSTICO

ESTABELECE O TEMPO DE  
TRATAMENTO



# OBJETIVOS



## OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento da genotipagem do vírus da hepatite C por PCR em tempo real pela análise da região NS5B



# CASUÍSTICA E MÉTODOS



## MÉTODOS

- I- Seqüenciamento das amostras para o desenho de "primers" e sondas para a genotipagem do VHC por PCR em tempo real
- II- Desenvolvimento e padronização da técnica de PCR em tempo real para a genotipagem do VHC
- III- Testes de validação da PCR em tempo real "one-step" modificado

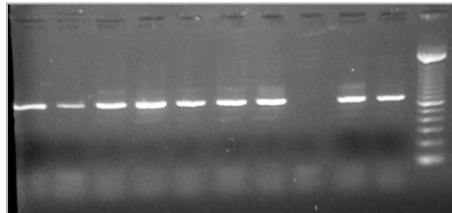


ANÁLISE DA  
REGIÃO NS5B  
SEQÜÊNCIAS CONSENSO

DESENHO DOS PRIMERS  
PRODUTO DE 688pb

EXTRAÇÃO DO RNA  
KIT NUCLISENS MINIMAG

RT  
PCR  
DETECÇÃO



PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR  
QUANTIFICAÇÃO DO DNA  
PURIFICADO DILUÍDO 20NG  
SEQÜENCIAMENTO ABI 3130

ANÁLISES DAS  
SEQÜÊNCIAS  
BIOEDIT  
CODONCODE  
SEQSCAPE



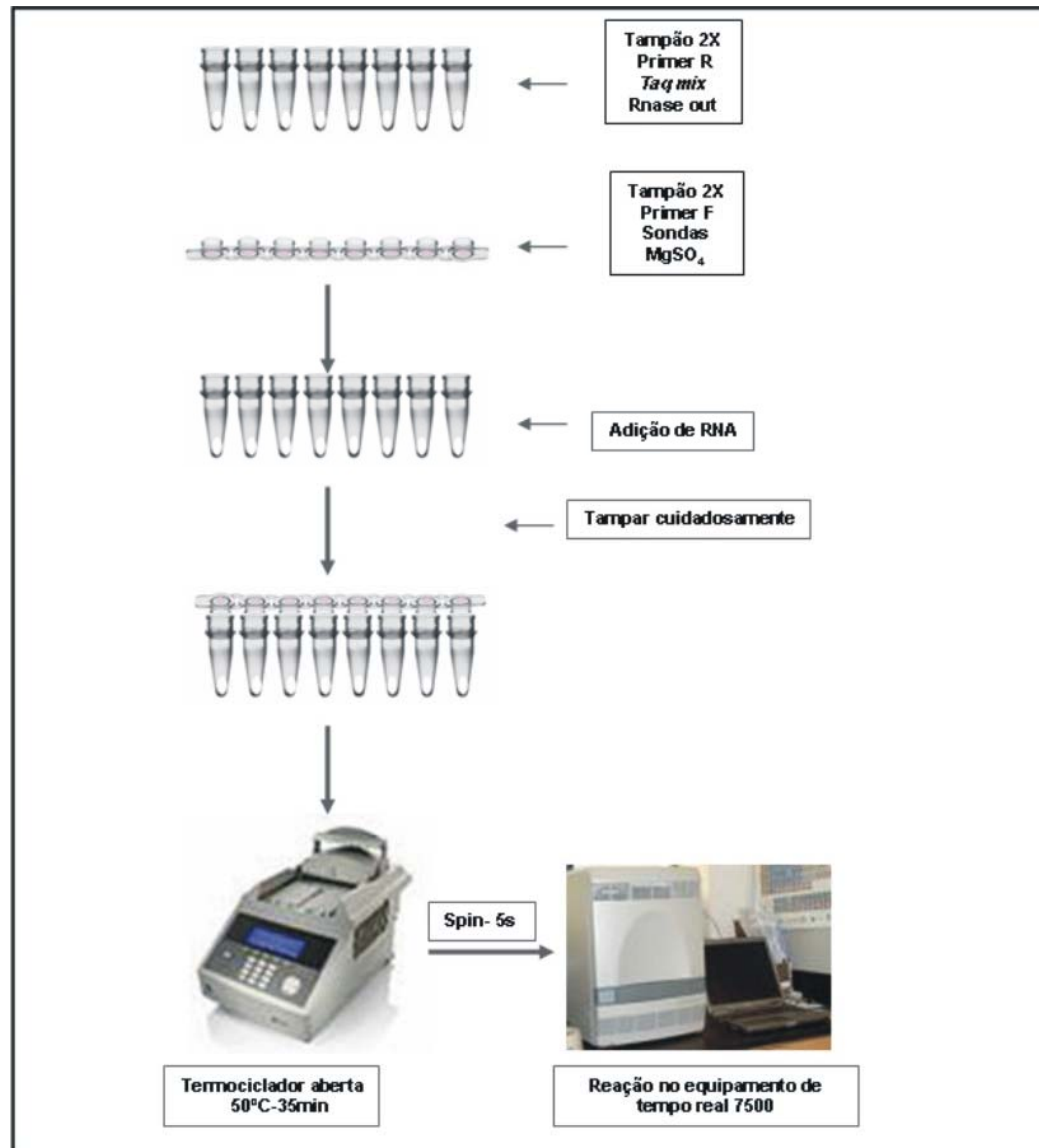


# Região NS5B para as sondas 1a, 1b, 3a e 2a, 2b, 2c

3a	<pre>   140      150 CACACTCCAGTTAACTCCTGG CACACTCCAGTTAACTCCTGG CACACTCCAGTTAACTCCTGG CACACTCCAGTTAACTCCTGG           </pre>	1a	<pre>   240      250 AGATACTTGATCGACCC ..... ..... .....           </pre>	1b	<pre>   240      250 CAGCTTGAACAGGCC ..... ..... .....           </pre>	2a	<pre>   350      360      37 CTCCACAGTTACTCTCCAGTAG CTCCACAGTTACTCTCCAGTAG CTCCACAGTTACTCTCCAGTAG CTCCACAGTTACTCTCCAGTAG           </pre>	2c	<pre>   350      360      37 CTCCACAGTTACTCTCCAGGTG CTCCACAGTTACTCTCCGGGTG CTCCACAGTTACTCTCCAGGTG CTCCACAGCTACTCTCCGGGTG           </pre>	2b	<pre>   350      360      37 CTCCATAGTTACTCTCCAGGTG CTCCATAGTTACTCTCCAGGTG CTCCACAGTTACTCTCCAGGTG CTCCATAGTTACTCTCCAGGTG           </pre>
----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---

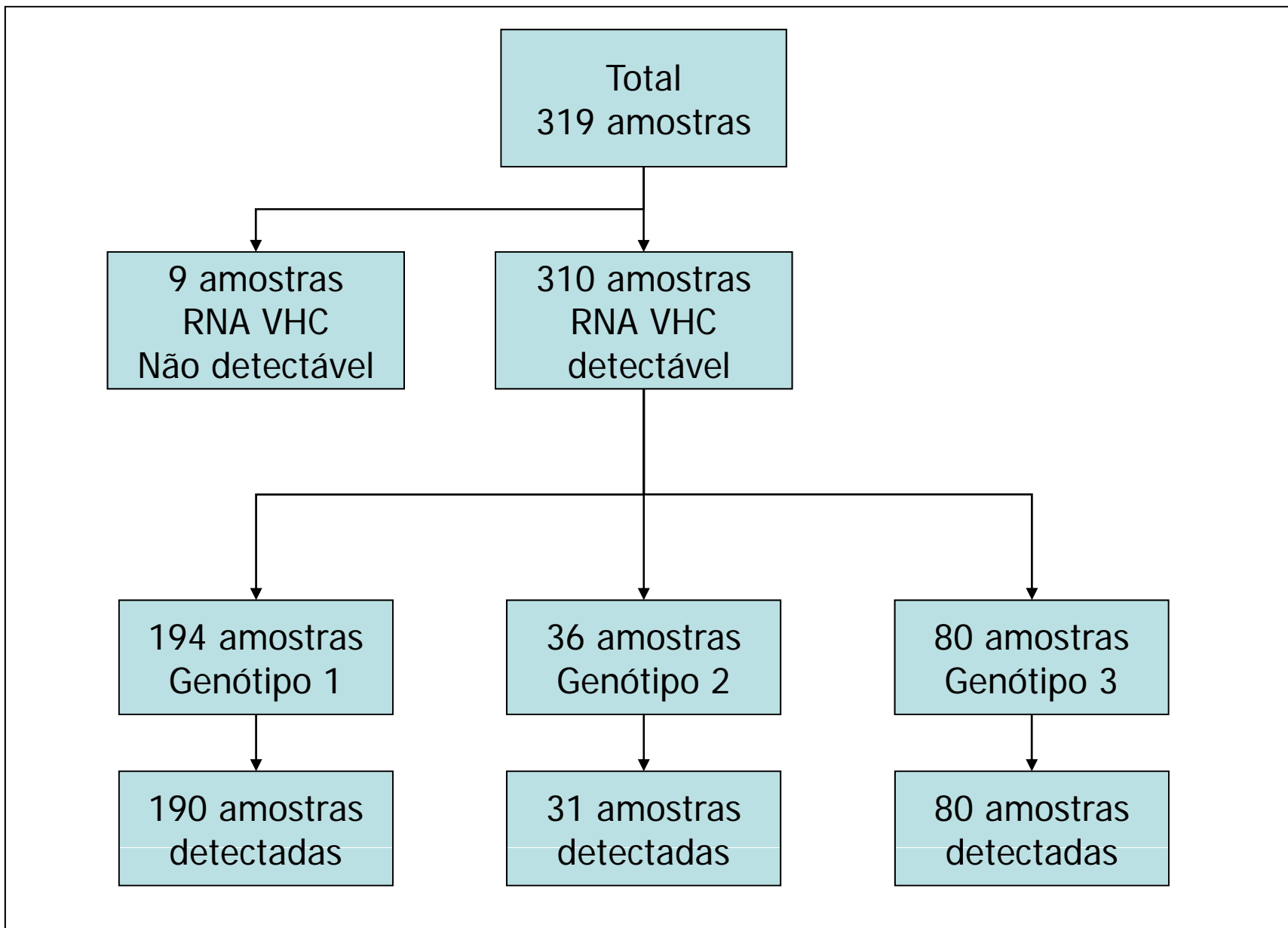
2a	<pre>   100      110      120 GACACTCCCCGTCAACTCATGG GACACTCCCCATCAATTCATGG GACACTCCCCGTCAATTCATGG AACACTCCCCGTCAATTCATGG           </pre>	2c	<pre>   190 TTCTCCATTCTCAT ..... ..... .....           </pre>	2b	<pre>   190 TTCTCCGTTCTGAT ..... ..... .....           </pre>	2a	<pre>   200      210      2 GCCCAAGACACTCTGGACCA GTCCAAGACACCCTGGACCA GCCCAAGATACTCTGGACCA GCCCAAGACACCCTGGACCA           </pre>	2c	<pre>   200      210      2 GCCCAAGACACTCTGGACCA GTCCAAGACACCCTGGACCA GCCCAAGATACTCTGGACCA GCCCAAGACACCCTGGACCA           </pre>	2b	<pre>   200      210      2 GCCAAGACACTCTGAACCA GCCAAGACACTCTGAACCA GCCAAGACACTCTGAACCA GCCAAGACACTCTGAACCA           </pre>
----	--	----	---	----	---	----	--	----	--	----	--

# Reação "one-step" modificado





# RESULTADOS





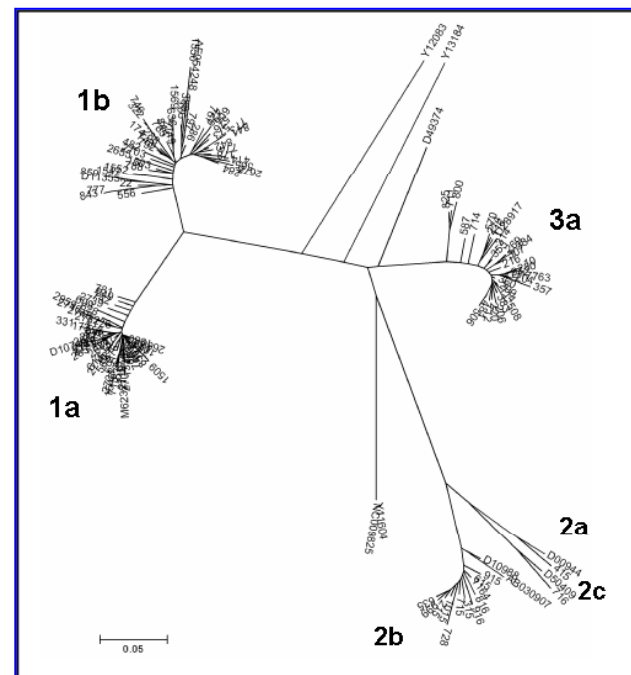
Comparação dos métodos de sequenciamento e PCR em tempo real para a genotipagem do VHC

$\kappa=0,6222$ ;  $p=0,002$

Comparação dos métodos de LiPa e PCR em tempo real para a genotipagem do VHC

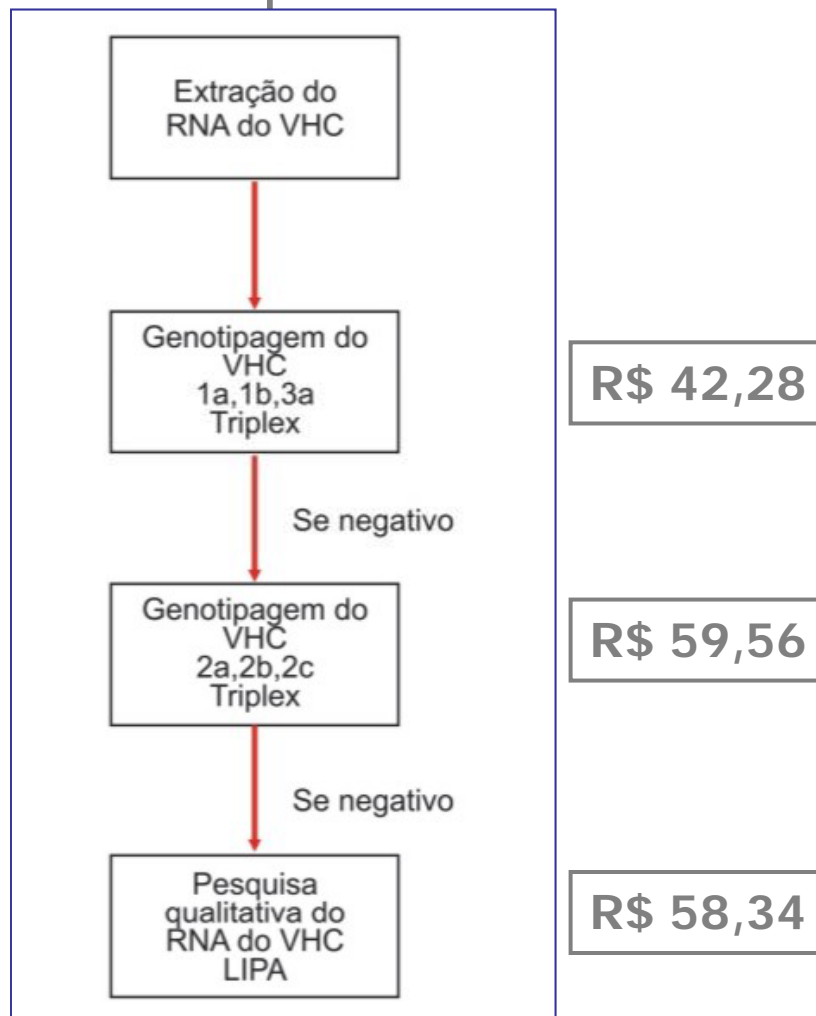
$\kappa=0,6933$ ;  $p<0,0001$

Análises Filogenéticas





## Algoritmo sugerido para laboratório de saúde pública para a realização da genotipagem do VHC por PCR em tempo real





# Conclusões



O método de genotipagem por PCR em tempo real focado na região NS5B, desenvolvido no presente trabalho **possibilitou**:

Realizar as reações em um sistema “one-step” modificado com reação em “triplex” para as identificações dos genótipos(1a, 1b, 3a) e (2a, 2b, 2c)

Determinar a genotipagem em 97% (301/310) das amostras quando comparadas com o método LiPA.





Definir todos os subtipos que apresentaram resultados incompletos, indefinidos ou discordantes pelo método LiPA.

Uma acurácia de 100% quando comparamos cento e cinquenta duas amostras entre o seqüenciamento parcial da região NS5B e o método de genotipagem por PCR em tempo real.

O método desenvolvido teve um valor agregado em custo e no tempo de execução