

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP**

**RECONHECIMENTO DA LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-  
HCV COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VÍRUS DA  
HEPATITE C POR MEIO DO TESTE ELISA**

**LAÍS CRISTINA DE SOUZA**

**São Carlos – SP  
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP**

**RECONHECIMENTO DA LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-  
HCV COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VÍRUS DA  
HEPATITE C POR MEIO DO TESTE ELISA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutora em Biotecnologia.

LAÍS CRISTINA DE SOUZA

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosana Rossi Ferreira

**São Carlos – SP**  
**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729r Souza, Laís Cristina de  
Reconhecimento da ligação dos anticorpos anti-HCV com proteínas recombinantes do vírus da hepatite C por meio do teste ELISA / Laís Cristina de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
80 p.

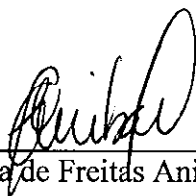
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Hepatite C. 2. HCV. 3. ELISA. 4. Proteínas recombinantes. I. Título.

Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutora em  
Biotecnologia

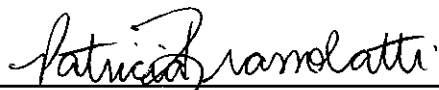
**Aprovado em: 15/07/2016**

**BANCA EXAMINADORA**



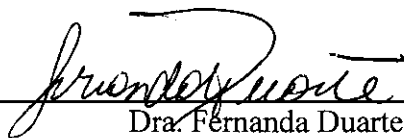
---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (Orientadora)  
(UFSCar)



---

Dra. Patrícia Brassolatti  
(UFSCar)



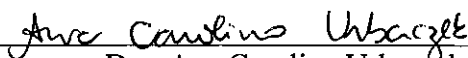
---

Dra. Fernanda Duarte  
(UFSCar)



---

Dr. Ricardo de Oliveira Correia  
(IQSC USP)



---

Dra. Ana Carolina Urbaczek  
(IQSC USP)

*Dedico este trabalho ao meu marido João Paulo pela presença, pelo amor e companheirismo em todos os momentos de minha vida ao seu lado. Aos meus queridos pais Angela e Roberto, aos meus irmãos Ligia e Lucas pelo incentivo, apoio, amor e dedicação sempre. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus que me fez conseguir chegar até aqui, e seguir meu destino mantendo a minha fé e me fazendo superar os momentos de provação e dificuldade.

Gostaria de agradecer em especial ao meu marido João Paulo que está na minha vida há anos, pelos momentos que me ajudou com palavras amigas, pela paciência, compreensão pelos dias que não pude estar ao seu lado devido a minha dedicação aos estudos, obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que me proporciona momentos felizes e agradáveis quando estamos juntos. Amo muito você hoje e sempre!

Agradeço com muito carinho aos meus pais Angela e Roberto, que me ensinaram sempre seguir os caminhos do bem e a ter caráter, que me geraram e amarão por toda a vida. Agradeço pelo amor, paciência e atenção que sempre me dedicaram, por nunca deixar faltar nada e por serem exemplos de PESSOAS as quais tenho orgulho de seguir. Obrigada por nunca deixarem de acreditar em mim, amo vocês mais do que se possa traduzir em simples palavras.

Agradeço meus irmãos Ligia e Lucas, pela paciência e compreensão na minha ausência. Amo muito vocês, obrigada por existirem em minha vida. Ligia, obrigada por ser um exemplo de profissional e Lucas, obrigada por ser meu “irmãozinho” e confiar em meus ensinamentos.

Minhas avós Victalina e Alzira e avôs Bernardino (**em memória**) e Diniz (**em memória**), vocês estarão eternamente guardados em meu coração aonde quer que eu vá. Vocês são muito especiais em minha vida. Obrigada pela admiração e carinho que tem por mim!

Agradeço também, aos familiares pela admiração e incentivo, em especial agradeço aos cinco “anjinhos” que surgiram em minha vida, Maria Virginia, Davi, Henrique, Maria Fernanda e Valentina que me proporcionam momentos de amor e paz.

Aos meus queridos animais de estimação Chavinho, Max e Nina que me proporcionam momentos felizes, em especial ao Caiul que se tornou uma “estrelinha” no céu e estará eternamente guardado em meu coração aonde quer que eu vá.

Depois dos agradecimentos aos familiares gostaria de agradecer a equipe do laboratório – LAP: Joice Rodolpho, Sandra Oliveira, Débora Neris e Ricardo Correia que contribuíram para que este trabalho fosse concluído, obrigada a todos pela dedicação, incentivo e esforço principalmente nos dias de experimentos.

As pessoas maravilhosas que surgiram na minha vida Joice Rodolpho e Débora Neris pela amizade e carinho, e saibam que cada uma de vocês possui um valor único e especial para mim, obrigada pelos momentos amigáveis e felizes que me proporcionam, vocês nunca deixarão de existir no meu coração.

A minha querida orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal e “mãe de

coração”, pela qual eu tenho imensa admiração, respeito e carinho. Fer, tenho que te agradecer não apenas pela oportunidade que me deu de estar em seu laboratório realizando esse trabalho, me orientando, confiando em mim, acreditando nas minhas possibilidades e no meu crescimento como profissional. Quero te agradecer pelas conversas científicas ou não, pelos sorrisos que sempre me fez dar, pela amizade e incentivo profissional. Você é alguém que trabalha muito, e apesar do reconhecimento nem sempre chegar, nossa equipe do LAP sabe o quanto você se desdobra para fazer tudo da melhor forma possível, obrigada por tudo!

A minha querida orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosana Rossi Ferreira pela atenção e mesmo estando longe fez parte significativa deste trabalho, contribuiu com informações e ensinamentos valiosos, obrigada por fazer parte deste trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Malheiro - HEMOAM que nos doou as amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Anderson de Sá Nunes - ICB-USP/SP, pessoa que tive a honra de conhecer e nos abriu a porta de seu laboratório para que eu pudesse realizar parte dos meus experimentos, obrigada pela valiosa contribuição que possibilitou a realização deste trabalho.

A CAPES que contribuiu com apoio financeiro.

Gostaria de agradecer por todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha formação e que por uma razão ou outra me esqueci de colocar aqui.

*Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação,  
seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu  
semelhante”.*

*Albert Schweitzer*



## RESUMO

As hepatites virais são um grave problema de saúde pública no mundo e no Brasil. São doenças de notificação compulsória e segundo estimativas, bilhões de pessoas já tiveram contato com vírus das hepatites e milhões são portadores crônicos. A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) constitui um grave problema de saúde pública mundial devido à elevada taxa de progressão para cronicidade, ao potencial evolutivo para cirrose e carcinoma hepatocelular, principais complicações conducentes à morte. Em geral, pode-se dizer que na última década houve grandes avanços no diagnóstico da hepatite C. Nesse período houve progressiva melhora na sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para detecção de anticorpos contra o vírus HCV. Contudo, é necessário que sejam desenvolvidos testes de maior acurácia. Assim, considerando que a preocupação com a detecção da hepatite C aumenta a cada dia, principalmente em bancos de sangue; os métodos diagnósticos desta infecção são de grande relevância clínica e podem ser utilizados como marcadores de cronicidade e indicativos da eficácia terapêutica. Portanto, esse trabalho propôs avaliar a ligação e reconhecimento dos anticorpos anti-HCV de amostras positivas e positivas genotipadas de pacientes portadores de Hepatite C, através da padronização dos procedimentos e soluções utilizadas no ELISA qualitativo. Realizou-se o processo de sensibilização das microplacas com proteína recombinante quimérica, fez-se a análise da sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e validade do método. Obtivemos a partir dos ensaios de padronização do ELISA com proteínas recombinantes um protocolo capaz de ter um bom rendimento dos principais componentes da reação, antígenos e conjugado, com boa resolução. O presente estudo apresentou-se resultados do ELISA com validade 95,69% , reprodutibilidade 100%, sensibilidade 94,5% e especificidade 99,3%, superior ao ELISA realizado com a proteína multiepitopo MEHCV que apresentaram com sensibilidade (92,86%) e especificidade (82,89%). O ELISA padronizado pode ser utilizado como uma técnica sorológica qualitativa, visando a detecção de anticorpos anti-HCV, pois mostrou-se com ótima reatividade nos soros pacientes infectados com HCV.

Palavras-chave: Hepatite C, HCV, ELISA e Proteínas recombinantes.

## **ABSTRACT**

Viral hepatitis is a major public health problem worldwide and in Brazil. They are notifiable diseases and according to estimates, billions of people have had contact with the hepatitis and millions are chronic carriers. Infection with hepatitis C virus (VHC) is a major problem worldwide public health due to the high rate of progression to chronicity, the evolutionary potential for cirrhosis and hepatocellular carcinoma, major complications leading to death. In general it can be said that in the last decade there have been major advances in the diagnosis of hepatitis C. In this period there was progressive improvement in sensitivity and specificity of the tests used to detect antibodies against the VHC virus. However, it is necessary that more accurate tests are developed. Thus, considering that the concern for the detection of hepatitis C increases every day, especially in blood banks; the diagnostic methods of this infection are of great clinical relevance and may be used as markers chronicity and indicative of therapeutic efficacy. Therefore, this work proposed to evaluate the connection and recognition of anti-VHC antibody positive and positive genotyped samples in patients with hepatitis C through the standardization of procedures and solutions used in qualitative ELISA. There was the process of awareness of microplates with recombinant chimeric protein, made the analysis of sensitivity, specificity, reproducibility and validity of the method. We obtained from ELISA assays with standardized recombinant proteins a protocol able to have a good performance of the main components of the reaction, and antigens conjugated with good resolution. This study presented ELISA results valid 95.69%, 100% reproducibility, 94.5% sensitivity and specificity 99.3%, higher than the ELISA performed with multiepitopo protein MEHCV who presented with sensitivity (92.86%) and specificity (82.89%). The standard ELISA can be used as a qualitative serological technique aimed at detection of anti-VHC antibodies, as demonstrated with great reactivity in patients infected with VHC.

**Keywords:** Hepatitis C, VHC, ELISA and recombinant proteins.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CLDN1: Claudina 1

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

ELISA: Ensaio Imunoenzimático, do ingles *enzyme-linked immunosorbent assay*

EphA2: Receptor de efrina A2, do inglês *ephrin type-A receptor 2*

GAG: Glicosaminoglicanas

HCV: Vírus da Hepatite C

HEMOAM: Hemocentro do Amazonas – Manaus

LDLR: *Low-density lipoprotein receptor / low-density lipoprotein receptor*

OCLN: Ocludina

PCR: Reação em cadeia de polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

RVS: Resposta virológica sustentada

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do Vírus da Hepatite C.....	14
<b>Figura 2.</b> Genoma do HCV.....	15
<b>Figura 3.</b> Distribuição mundial dos genótipos do HCV .....	16
<b>Figura 4.</b> Ciclo replicativo do vírus da hepatite C (HCV).....	20
<b>Figura 5.</b> Prevalência estimada da infecção pelo HCV .....	26
<b>Figura 6.</b> Prevalência da positividade de anti-HCV .....	28
<b>Figura 7.</b> Prevalência de anti-HCV em doadores de sangue .....	30
<b>Figura 8.</b> Algoritmo para confirmação diagnóstica da Hepatite C.....	32
<b>Figura 9.</b> Procedimento da metodologia ELISA .....	33
<b>Figura 10.</b> Padronização da concentração da proteína de sensibilização na microplaca.....	46
<b>Figura 11.</b> Escolha da solução de bloqueio e diluição da amostra .....	48
<b>Figura 12.</b> Diluições do conjugado.....	50
<b>Figura 13.</b> Junção das proteínas individuais a proteína quimérica.....	52
<b>Figura 14.</b> Validação do ELISA .....	57
<b>Figura 15.</b> Teste com amostras genotipadas.....	60
<b>Figura 16.</b> Análise da reprodutibilidade .....	62
<b>Figura 17.</b> ELISA para a Análise da Sensibilidade, Especificidade e Valor Preditivo ..	64

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos Genótipos no Brasil .....	18
<b>Tabela 2.</b> Análise do processo produtivo-sensibilização .....	54
<b>Tabela 3.</b> Análise do processo produtivo-bloqueio .....	54
<b>Tabela 4.</b> Análise do C.V. do teste de homogeneidade com Soro HCV Positivo 2 .....	55
<b>Tabela 5.</b> Análise do C.V. do teste de homogeneidade com Soro HCV Negativo 4.....	55
<b>Tabela 6.</b> Análise da Sensibilidade e Especificidade.....	67

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	13
1.1.Vírus HCV .....	13
1.2. Ciclo Replicativo do Vírus HCV .....	18
1.3. Patogênese.....	20
1.4. Transmissão.....	23
1.5.Distribuição da Doença e Epidemiologia .....	25
1.6. Diagnóstico e Tratamento .....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3.OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.1. Obtenção da proteína viral .....	39
4.2. Delineamento Experimental.....	40
4.3 Amostras sorológicas .....	40
4.4. Padronização da concentração da proteína- antígeno na placa.....	41
4.4.1. Junção das proteínas Core e NS3 individuais com a Quimérica	41
4.5.Fabricação das microplacas: avaliação do processo produtivo e teste de homogeneidade do lote.....	42
4.6.Validação.....	42
4.7. Reprodutibilidade.....	42
4.8. Avaliação da Sensibilidade .....	43
4.9. Avaliação da Especificidade .....	43
4.10. Valor Preditivo .....	43
4.11. Comparação com Kit de referência no mercado.....	44

4.12. Análise comparativa da sensibilidade especificidade .....	44
4.13. Análise estatística.....	44
5.0. RESULTADOS .....	45
5.1. Concentração de proteína recombinante quimérica.....	45
5.2. Escolha da solução Bloqueio e diluição da amostra .....	47
5.3. Definição da diluição ideal do Conjugado.....	49
5.4. Análise da junção das proteínas Core e NS3 individuais com a Quimérica.....	51
5.5. Fabricação de placas: análise do processo produtivo e homogeneidade .....	53
5.6. Validação.....	56
5.7. Análise das amostras HCV positivas genotipadas.....	59
5.8. Reprodutibilidade.....	61
5.9. Avaliação da Sensibilidade, Especificidade e Valor Preditivo.....	63
5.10. Comparação da Sensibilidade e Especificidade com kits de referência no Mercado .....	66
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
9. REFERÊNCIAS .....	73

## 1.INTRODUÇÃO

As hepatites são doenças de notificação compulsória e segundo estimativas, bilhões de pessoas já tiveram contato com vírus das hepatites e milhões são portadores crônicos. Estas são doenças provocadas por diferentes tipos de vírus, sendo os mais comuns os vírus A, B, C, D e E, que possuem tropismo primário pelo tecido hepático e apresentam características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais semelhantes, porém, com importantes particularidades. A distribuição das hepatites virais é universal, sendo que a magnitude dos diferentes tipos varia de região para região (Ministério da Saúde, 2005).

A Hepatite C, causada pelo vírus da Hepatite C (HCV), é uma doença infecciosa que vem sendo reconhecida mundialmente como um dos maiores problemas de saúde pública, inclusive no Brasil, pois, até o momento não está disponível uma vacina preventiva e um grande número de infectados apresenta a forma assintomática da doença, geralmente sem o conhecimento prévio do paciente, aumentando a taxa de cronicidade (DIPTI et al., 2006). Há estimativas que apontam para prevalência global de mais de 100 milhões de pessoas infectadas pelo HCV em todo o mundo (MARTINS, et al., 2011).

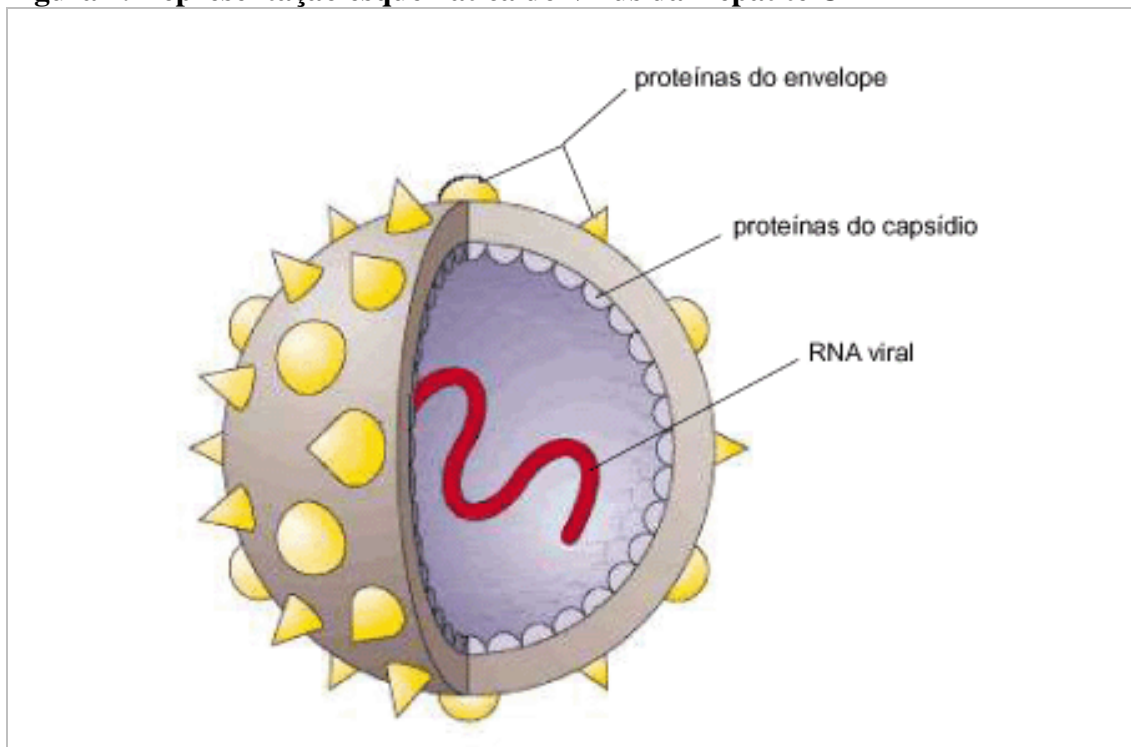
### 1.1.Vírus HCV

O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado por Choo e colaboradores (1989) através de técnicas de biologia molecular, sendo responsável por mais de 90% das hepatites por vírus anteriormente rotuladas de não-A e não-B e é considerado o principal patógeno humano causador de infecções agudas e crônicas associadas a um curso variável que pode levar a cirrose e ao carcinoma hepatocelular (CHOO et al., 1989; WHO, 1997).

O HCV é um vírus RNA pequeno (aproximadamente 50 nm) envelopado que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, com genoma em fita simples de polaridade positiva medindo 9,7 kilobases de comprimento. Na poliproteína, com uma longa fase de leitura aberta (*open reading frame*) distinguem-se as proteínas estruturais: Core, E1 e E2 e as não estruturais ou NS (1 a 5), essas últimas são responsáveis pela replicação viral (Figura 1) (KATO, 2000; LAI & WARE, 2000)



**Figura 1. Representação esquemática do Vírus da Hepatite C**



O vírus da Hepatite C é um vírus de RNA da família flaviviridae de 50nm de diâmetro (STRAUSS, 2001).

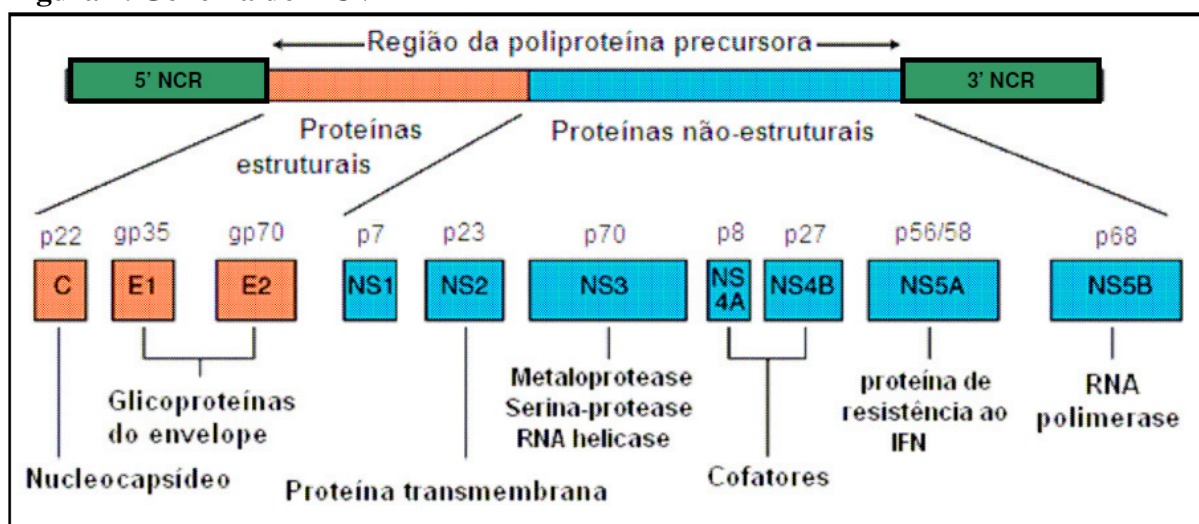
A proteína Core é procedente do nucleocapsídeo viral, utilizada como importante alvo antigênico em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-HCV. E parecem estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir com o metabolismo lipídico e deprimir a resposta imune do hospedeiro por mecanismos ainda desconhecidos (KATO, 2000; LAI & WARE, 2000).

As proteínas E1 e E2 são constituintes do envelope viral e estão relacionadas com a adsorção e fusão do vírus a receptores na célula-alvo para indução da infecção viral (BARTENSCHLAGER & LOHMANN, 2000; TRIYATNI et al., 2002; BARTOSCH et al., 2003). A proteína p7 é codificada pela região E2 e processada por um precursor E2/p7. Estudos apontam que possa mediar a permeabilidade de íons e formar hexâmeros e, até mesmo apresentar importante função na maturação e infectividade da partícula viral (PAVLOVIC et al., 2003; SAKAI et al., 2003; PREMKUMAR et al., 2004).

As proteínas não estruturais (essenciais para o ciclo de vida do vírus), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, são codificadas na extremidade carboxi-terminal do genoma viral (ZEIN, 2000; STRAUSS, 2001). A proteína NS2 e o domínio amino-terminal da NS3 constituem a protease NS2-3 que catalisa a clivagem do sítio NS2-NS3 (BARTENSCHLAGER & LOHMANN, 2000). A NS3 apresenta três atividades enzimáticas: uma serina-protease na extremidade amino-terminal, que cliva os sítios NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A e NS5A/B, uma helicase e uma nucleotídeo-trifosfatase-dependente de ATP na carboxi-terminal, essenciais para tradução e replicação do HCV (Figura 2) (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000).

A proteína NS4A forma um complexo heterodinamico com NS3, agindo como um cofator necessário para a atividade protease de NS3 (BARTENSCHLAGER et al., 1993; GRAKOUÏ et al., 1993; TOMEI et al., 1993), enquanto que, a função da proteína NS4B na replicação viral permanece indefinida. A proteína NS5A é uma fosfoproteína cujo número de fosforilações é influenciado por NS4A, mediada por uma quinase celular e pode estar envolvida na resistência a ação antiviral do interferon (IFN) (ENOMOTO et al., 1996; GALE et al., 1998). Já a proteína NS5B é uma RNA polimerase RNA-dependente, necessária para a replicação genômica e constitui um excelente alvo para a terapia antiviral (BEHRENS et al., 1996; LOHMANN et al., 1997).

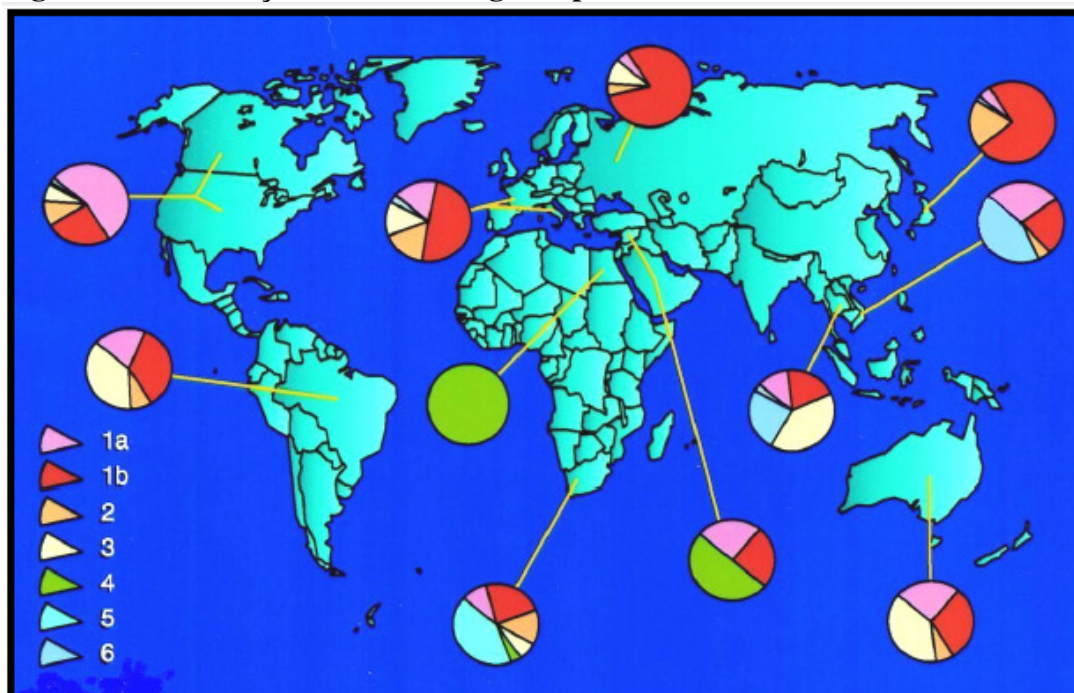
**Figura 2. Genoma do HCV**



As caixas na cor verde mostram as regiões 5' não traduzidas (5'-NCR) e a Região 3' não traduzida (3'-NCR). Na cor laranja são destacadas as regiões que codificam proteínas estruturais. Na cor azul são regiões que codificam proteínas não estruturais (ANZOLA et al., 2003).

A análise filogenética das sequências genômicas permitiu a caracterização de 6 genótipos (1 a 6) que são subdivididos em mais de 100 subtipos (1a, 1b, 2a, etc.). Os genótipos podem diferir de 30 a 35% entre suas sequências nucleotídicas, enquanto que entre os subtipos essas diferenças podem variar de 15 a 20% (SIMMONDS, et al., 1994). A distribuição dos genótipos e subtipos do HCV apresenta significativa variação geográfica e na frequência em que são observados. Assim, os genótipos 1, 2 e 3 distribuem-se pelo mundo (ZIEN, 2000); o genótipo 4 é encontrado, principalmente, na África Central, Egito e no Zaire; o 5 na África do Sul e o 6 na Ásia (NGUYEN et al., 2005; NAINAN et al., 2006) (Figura 3). O Brasil é um país de dimensão continental com uma população de origens étnicas diferentes. Assim, uma grande variação nas frequências dos genótipos do HCV é observada em nosso país (AMORIM et al., 2004; CAMPIOTTO et al., 2005; MARTINS et al., 2011). Um estudo realizado em São Paulo investigou a prevalência e distribuição dos genótipos do HCV em diferentes populações (doadores de sangue, hemodialisados, transplantados e portadores crônicos do HCV). A frequência encontrada foi a seguinte: genótipo 1, 54,2%, genótipo 2, 20,8%, genótipo 3, 25% e genótipo 4, 0,3% (ARAÚJO et al., 2011).

**Figura 3. Distribuição mundial dos genótipos do HCV**



Podemos observar a distribuição dos genótipos nos gráficos de “pizza” de acordo com as cores da legenda. (*Adaptado* ZEIN, 2000).

Quando analisadas as diversas regiões do país, os estudos têm demonstrado considerável variação na distribuição de genótipos, mas de forma geral, observa-se maior prevalência do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2 (Tabela 1).

Recentemente na cidade de São Paulo, foi realizado um estudo avaliando a distribuição dos genótipos do HCV em pacientes coinfectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). O genótipo 1 foi observado em 69% dos pacientes, genótipo 2 em 4%, genótipo 3 em 26,3% e genótipo 4 em 1%. É importante citar que alguns trabalhos brasileiros relatam a ocorrência de genótipos incomuns, como é o caso do genótipo 4 e 5, numa frequência extremamente baixa (BASSIT et al., 1999; LEVI et al., 2002; MENDES-CORREA et al., 2008).

Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ainda ter variações do HCV, que são denominadas *quasispecies*. Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações. A maior ou menor diversidade das *quasispecies* parece estar relacionada com a pressão imunológica, já que costuma ser pequena nas fases iniciais da doença, com aminotransferases normais, sendo de alta heterogeneidade nos casos de doença hepática mais avançada e/ou baixa resposta terapêutica (Ministério da Saúde, 2010).

A existência de *quasispecies* e a grande capacidade mutagênica do vírus propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Assim, cerca de 90% dos indivíduos infectados evoluem para a cronicidade. A infecção crônica pelo HCV, além de evoluir lentamente, em anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (MISSALE, et al. 1998).

**Tabela 1. Distribuição dos Genótipos no Brasil**

<b>Autor/ano</b>	<b>Local</b>	<b>Nº</b>	<b>Grupo de indivíduos</b>	<b>Técnica genotipagem</b>	<b>Prevalências genótipos 1, 2, 3</b>
KRUG <i>et al.</i> , 1996	Porto Alegre	100	HCV +	RFLP	1 (55%), 2 (8%), 3 (37%)
BASSIT <i>et al.</i> , 1999	SP	348	HCV +	Inno-Lipa	1 (63%), 2 (4,3%), 3 (31,3%)
OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1999	Belo Horizonte	44	Hemofilicos	RFLP	1 (84,1%), 3 (13,6%)
PARANÁ <i>et al.</i> , 2000	Bahia	232	HCV +	Inno-Lipa	1 (63%), 2 (6%), 3 (26%)
BUSEK <i>et al.</i> , 2002	Belo Horizonte	83	Renais Crônicos	RFLP	1 (66,3%), 2 (24,1%), 3 (7,2%)
CAMPIOTTO <i>et al.</i> , 2005	São Paulo	840	HCV +	Seqüenciamento Região 5'-NCR	1 (63%), 2 (5%), 3 (32%)
	Rio de Janeiro	234			1 (79%), 2 (5%), 3 (16%)
	Pernambuco	122			1 (60%), 2 (2%), 3 (37%)
	Paraná	156			1 (52%), 2 (6%), 3 (42%)
SILVA <i>et al.</i> , 2005	São Paulo	89	Doadores de sangue	Inno-Lipa	1 (45%), 2 (5,7%), 3 (40%)
SILVA <i>et al.</i> , 2007	Rio Grande do Sul	627	HCV +	RFLP	1 (53,9%), 2 (5,4%), 3 (40,7%)
	Santa Catarina	917			1 (51%), 2 (2,9%), 3 (46,1%)
BEZERRA <i>et al.</i> , 2008	Ceará	95	HCV +	RFLP	1 (47,4%), 2 (8,4%), 3 (34,7%)
MENDES-CORREA <i>et al.</i> , 2008	São Paulo	100	HIV +	Sequenciamento 5'-NCR	1 (68,7%), 2 (4%), 3 (26,3%)

Nesta tabela podemos observar o estudo da frequência dos genótipos do HCV no Brasil, publicados até 2008 (COSTI, 2008).

## 1.2. Ciclo Replicativo do Vírus HCV

O modo de entrada do vírus HCV na célula não está completamente elucidado, mas é um processo complexo que requer a ação coordenada de diversas proteínas do

hospedeiro, incluindo glicosaminoglicanas (GAG), o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR, do inglês *low-density lipoprotein receptor*), o receptor de lipoproteína de alta densidade SR-BI, CD81, e duas proteínas de junção, claudina-1 (CLDN1) e ocludina (OCLN). É provável que o vírus utilize esses fatores de forma sequencial (PILERI et al., 1998; BARTOSCH et al., 2003; EVANS et al., 2007; PLOSS et al., 2009). Um grupo de receptores é, provavelmente, responsável por mediar interações iniciais de baixa afinidade, necessárias à entrada do HCV (MONAZAHIAN et al., 1999; KOUTSOUDAKIS et al., 2006; ZEISEL et al., 2007).

A proteína de envelope E2 se liga à CD81. Em seguida, eventos de sinalização são necessários para o recrutamento da CLDN1. O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) e receptor de efrina A2 (EphA2, do inglês *ephrin type-A receptor 2*) modulam a associação CD81-CLDN1. Após a ligação CD81-CLDN1, o complexo HCV- receptor interage com a OCLN e é internalizado nas junções celulares, via endocitose mediada por clatrina. O desencapsidamento ocorre em endossomos acidificados (LUPBERGER et al., 2011). A poliproteína do HCV é traduzida na membrana do retículo endoplasmático rugoso, com a fita positiva de RNA servindo de molde. A tradução é iniciada de maneira independente do cap, por meio do IRES localizado na 5'NTR. É produzida uma poliproteína precursora de, aproximadamente, 3.000 aminoácidos, que é posteriormente processada por proteases celulares (ex.: peptidases de sinal) e virais (NS2 e NS3) para gerar as 10 proteínas virais: Core, E1 e E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (KIM; CHANG, 2013).

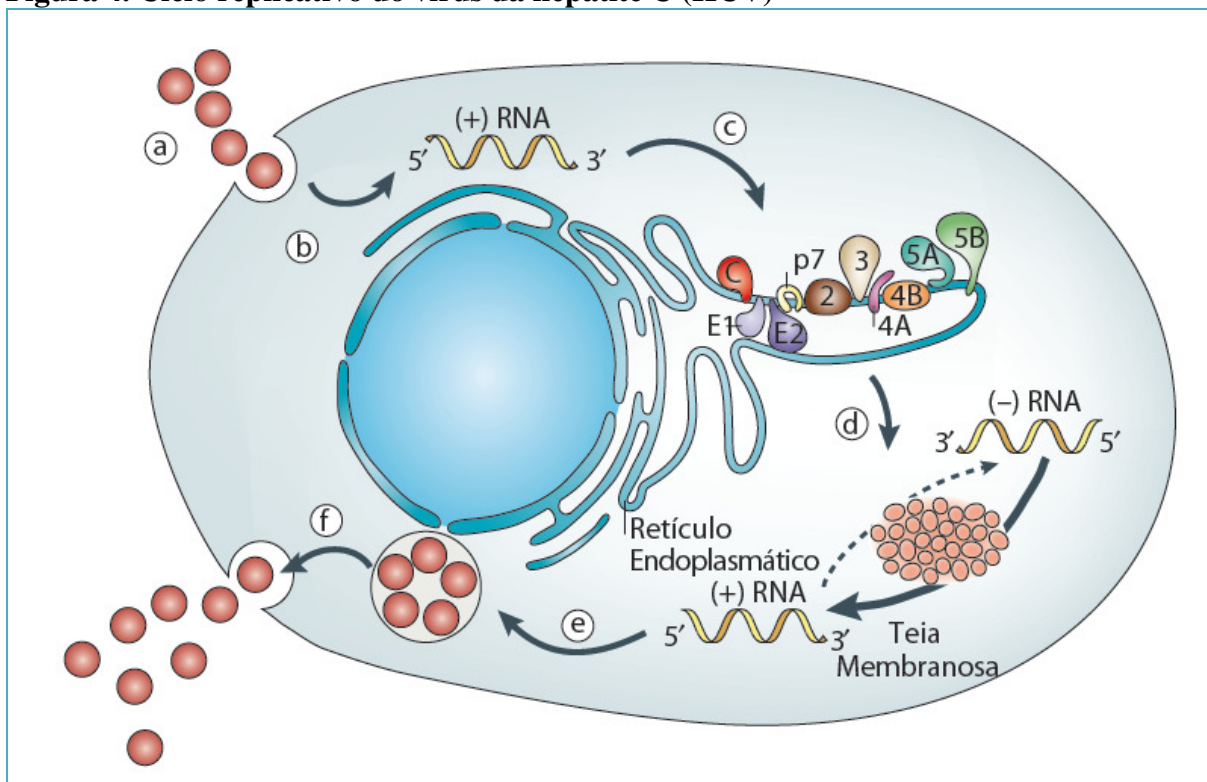
O genoma viral é replicado pela NS5B; a proteína NS5A tem papel regulatório para a replicação do vírus e a proteína NS3 possui uma porção com função helicase, que também é importante para a replicação do genoma viral. Finalmente, a NS4B é uma proteína com papel importante no rearranjo de membranas da célula, levando à formação da chamada “teia membranosa” (ou complexo de replicação) que suporta e compartimentaliza a replicação do HCV. Esse complexo se associa a proteínas virais, componentes celulares do hospedeiro e fitas nascentes de RNA (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2012). Os estágios tardios do ciclo do HCV não estão completamente elucidados. No entanto, sabe-se que a montagem e liberação da partícula são processos firmemente regulados com a síntese de lipídios da célula hospedeira. Após a clivagem



pelas proteases celulares, a proteína do Core se realoca na membrana do retículo endoplasmático em gotículas de lipídios (SCHEEL; RICE, 2013).

Acredita-se que o RNA viral é entregue ao Core pela NS5B, além de ocorrer uma interação com NS5A. A interação NS5A-Core aciona a formação do nucleocapsídeo. Os capsídeos recém-formados brotam do lúmen do retículo endoplasmático em um processo ligado à síntese de VLDL. Dessa forma, o brotamento depende da síntese de VLDL e requer diversas enzimas do hospedeiro (BARTENSCHLAGER; COSSET; LOHMANN, 2010). O ciclo replicativo do HCV encontra-se representado esquematicamente na (Figura 4).

**Figura 4. Ciclo replicativo do vírus da hepatite C (HCV)**



(a) Contato e internalização do vírion na célula; (b) liberação do RNA viral no citoplasma; (c) tradução mediada por IRES e processamento da poliproteína viral; (d) replicação do RNA viral; (e) empacotamento do RNA viral e montagem da partícula; (f) maturação do vírion e liberação. (*Adaptado* de MORADPOUR et al., 2007).

### 1.3. Patogênese

O período de incubação da Hepatite C pode durar, em média de 6 a 8 semanas, embora possa se estender por vários meses (BENENSON, 1995). O período de transmissibilidade pode variar de uma a várias semanas antes do início dos sintomas,

mas pode persistir indefinidamente (BENENSON, 1995).

Aproximadamente 15% dos indivíduos infectados pelo HCV eliminam o vírus espontaneamente, 25% têm doença assintomática com aminotransferases persistentemente normais e lesões histológicas leves, enquanto 60% evoluirão para Hepatite C crônica progressiva. Além disto, cerca de 20% dos pacientes com Hepatite C crônica evoluem para cirrose em 10 ou 20 anos e podem evoluir para óbito em decorrência das complicações da cirrose ou surgimento de hepatocarcinoma (MARCELLIN, 2002). Os mecanismos através dos quais o HCV causa lesão hepatocelular aguda dando início à sequência de eventos que levam à doença hepática crônica evoluindo assim para cirrose e carcinoma hepatocelular, entretanto os mesmos ainda não são bem conhecidos. É importante destacar que o HCV é o maior responsável por cirrose e transplante hepático no Mundo Ocidental (CHISARI, 1997).

Algumas proteínas do HCV possuem a capacidade de disparar um sinal iniciador de processos celulares como proliferação, diferenciação ou apoptose, a proteína do Core teria o sinal mais potente para iniciar as alterações celulares. Foi descrita a proteína - CD81 que se ligaria à fração E2 (envelope do vírus), funcionando como um receptor ou co-receptor encontrado tanto em hepatócitos como em linfócitos periféricos. Assim, a neutralização do HCV poderia se fazer por intermédio desse receptor. (PILERI, et al. 1996; LERAT, et al. 1996).

A lesão hepatocelular se faz pelo reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição. A dinâmica desse processo mostra-se extremamente variável, fazendo com que a reação necro-inflamatória do fígado tenha diferentes intensidades. Admite-se que o processo inflamatório contínuo e ineficiente, em termos de eliminação total dos vírus, constitui o principal responsável pela fibrogênese. Argumenta-se que fatores relacionados ao vírus, como carga viral e genótipo, poderiam influenciar a evolução da hepatite crônica pelo HCV. Enquanto alguns estudos mostram níveis séricos mais elevados em doenças mais avançadas, outros autores demonstraram de forma definitiva que podem ocorrer níveis muito altos em pacientes com enzimas normais, sem grandes alterações hepatocelulares (MARCELLIN, 1999).

Como os níveis séricos de RNA-HCV não refletem corretamente os níveis de RNA-HCV intra-hepático, tornam-se necessárias investigações sobre essa variável, de mais difícil acesso, assim como estudos sobre a replicação viral. Em relação ao genótipo, o mais frequente deles - 1b é reconhecidamente aquele com pior resposta



terapêutica, mas é discutível ser ele causador de lesões hepáticas mais graves. Os estudos iniciais associavam o genótipo 1b com evolução mais frequente para cirrose e hepatocarcinoma, não confirmados quando afastados elementos de confusão como idade, duração da infecção ou forma de aquisição do HCV (CHUTAPUTTI, 2000). Ou seja, o genótipo 1b associava-se com pacientes mais idosos, com muito tempo de infecção ou nos pacientes com doença adquirida por via transfusional. Estudos demonstram que, a distribuição dos diferentes genótipos pode ser semelhante em pacientes com enzimas séricas normais comparados àqueles com enzimas aumentadas.

A progressão da lesão hepática, da hepatite crônica para cirrose, pode ainda relacionar-se a fatores do hospedeiro, ou seja, sexo, idade, uso de álcool ou concomitância com outros vírus. (BENVEGNI, et al., 1997).

O mais importante dos fatores do hospedeiro, entretanto, parece ser o seu estado imunológico. Assim, uma resposta imunológica vigorosa pode eliminar o HCV em 15% dos indivíduos que entram em contato com ele, enquanto em pacientes crônicos, ou imunossuprimidos a doença evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos imunocompetentes. Portanto, após transplantes hepáticos por cirrose com HCV, recomenda-se que a terapia imunossupressiva seja a menor possível (FÉRAY, et al., 1999).

Na coinfeção HCV-HIV, a progressão da doença revela-se mais rápida, se comparada aos pacientes HIV negativos, de forma semelhante ao que ocorre na coinfeção com o vírus da hepatite B. Fatores hormonais e genéticos devem estar implicados na patogênese da hepatite pelo HCV, sendo aceito que a doença costuma progredir mais rapidamente no sexo masculino. A idade do paciente ao adquirir a infecção também mostra-se relevante, havendo pior prognóstico naqueles com idade superior a 40 anos (SORIANO, et al., 1999).

A maioria dos doentes infetados evolui para a cronicidade (cerca de 75-85% dos casos). A Hepatite C crônica define-se pela persistência do ácido ribonucléico do HCV por mais de 6 meses após a transmissão vírica. Esta transição de infecção aguda para infecção crônica é, frequentemente, sub-clínica. A fibrose é um processo dinâmico, muito heterogêneo e variável. Caracteriza-se pela deposição de matriz extracelular que altera a arquitetura e a microcirculação hepáticas, conduzindo à falência do órgão. O estadiamento da fibrose é medido através de escalas de estadiamento como a METAVIR e ISHAK. Este permite prever a progressão para cirrose. Assim, a história natural da

Hepatite C constitui o reflexo do estadio da fibrose e da velocidade da sua progressão para cirrose. Outro importante fator, variável independente no prognóstico evolutivo da fibrose hepática, é o consumo alcoólico. Os mecanismos, não bem elucidados, envolvem aumento de carga viral induzida pelo álcool, assim como lesões imunomediadas e hepatotóxicas (LOPES, 2015).

#### **1.4. Transmissão**

A investigação dos fatores de risco para infecção pelo HCV pode ser realizada por estudos prospectivos ou retrospectivos, sendo que diversos trabalhos apontam como principais fatores de risco: transfusão de sangue e hemoderivados de doadores não testados para anti-HCV; transplantes de órgãos de doadores infectados; uso de drogas injetáveis; terapias injetáveis com equipamento contaminado (ou não seguro); hemodiálise; exposição ocupacional ao sangue; transmissão perinatal e transmissão sexual (HOOFNAGLE, et al., 1986; KENNY-WALSH, 1999). Além disso, em decorrência da grande variedade de atividades humanas com potencial exposição ao sangue, existem diversos outros modelos biológicos possíveis de transmissão do HCV. Alguns exemplos incluem procedimentos estéticos, culturais e religiosos como: tatuagem; *piercing*; serviços de barbearia; rituais de escarificação; circuncisão e acupuntura (JOO, et al. 2000; KATO, et al., 2000).

Entre os diversos fatores de risco, os mais descritos na literatura são a transfusão sanguínea, uso de drogas injetáveis e terapias invasivas com equipamentos contaminados (ou não seguros) (JARVIS, et al., 1998). Entretanto, ao longo do tempo e em cada região, ocorreu variação significativa na importância de cada um desses fatores na transmissão da doença (GAYOTTO, 2000).

A transmissão do HCV acontece principalmente por via parenteral, por meio de transfusão de sangue e hemocomponentes, utilização de agulhas e seringas contaminadas e pelo transplante de órgãos e tecidos (SAEZ-ALQUEZAR et al., 2001). Dentre as formas não-parenterais de transmissão, destaca-se a transmissão por contato sexual, que, embora seja pouco frequente, se torna um importante fator de risco em indivíduos com múltiplos parceiros sexuais. A transmissão materno-fetal pode ocorrer principalmente na hora do parto, mas é pouco frequente (STRAUSS, 2001). No entanto, num percentual significativo de casos, não é identificada a via de infecção (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

A transfusão de sangue e hemoderivados de doadores não testados para HCV é considerada forma importante de transmissão. Porém, após a padronização dos processos de triagem pré-doação, houve significativa redução na transmissão do HCV por meio da transfusão de hemoderivados (KIYOSAWA, et al., 1990).

Estima-se que entre 1960 e 1991, 5% a 15% dos receptores de produtos sanguíneos infectaram-se com HCV e que, atualmente, após a adoção dos testes de rastreamento, o risco de infecção por transfusão sanguínea está em torno de 0,001% por unidade de sangue transfundida (LAM, et al., 1997).

Apesar dessa significativa redução observada nos últimos anos, um estudo realizado no maior banco de sangue de Santa Catarina revelou que a probabilidade de contaminação pelo HCV ainda se mantinha na ordem de uma para 13.721 unidades de sangue transfundidas, valor este, no mínimo, 10 vezes mais alto que o encontrado em países desenvolvidos (LERAT, et. al., 1996).

As terapias injetáveis com equipamentos contaminados (ou não seguros) se apresentam como outra forma possível de transmissão do HCV. Apesar da escassez de dados confiáveis, o National Institutes of Health (1997) estima que aproximadamente dois milhões de indivíduos se infectem anualmente por esta via. Em países em desenvolvimento, o suprimento de materiais esterilizados pode ser inadequado ou inexistente. Além disso, fora dos centros médicos, terapias injetáveis podem ser realizadas por indivíduos não habilitados; assim, ao longo da vida, uma pessoa pode receber múltiplas injeções com material contaminado, o que aumenta significativamente o risco acumulado de infecção pelo HCV (SCHWIMMER, et al., 2000).

No Egito, o país com a maior prevalência de Hepatite C no mundo, a maioria dos indivíduos foi contaminada pela reutilização de seringas de vidro durante campanhas nacionais de tratamento da esquistossomose entre 1960 e 1987 (PILERI, et al., 1998). Do mesmo modo, na Índia, a prevalência de HCV entre os pacientes que receberam múltiplos tratamentos injetáveis para Calazar é de 31,1%, o que é significativamente maior do que a prevalência observada na população geral (PILERI, et al., 1998).

No Brasil, a hepatite C teve como formas preferenciais de transmissão o uso de drogas injetáveis, hemodiálise, transfusão de sangue e hemoderivados e outros procedimentos médicos invasivos, particularmente até o início dos anos 90, quando não havia exame que permitisse diagnosticar o portador do HCV. Atualmente, as pessoas

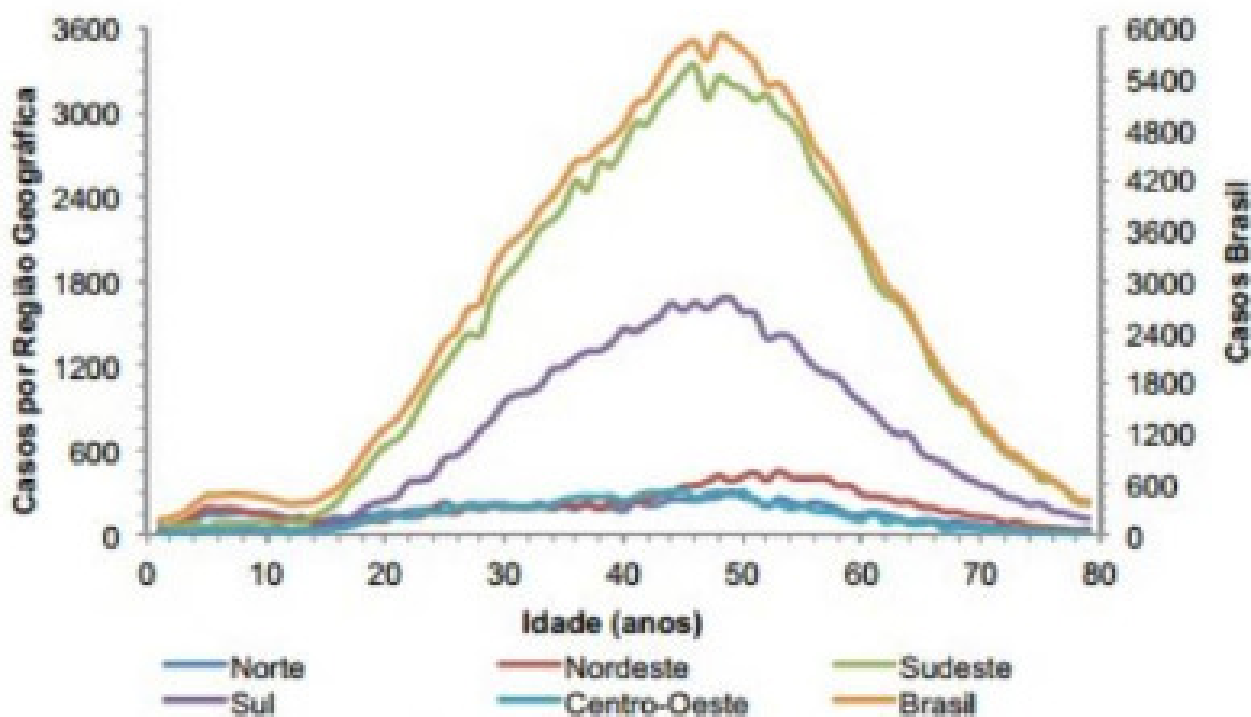
que usam drogas, injetáveis ou inaláveis, são um grupo de risco no Brasil, embora em número bem menor do que na Ásia, Europa e nos Estados Unidos. Entretanto, a transmissão do vírus não se restringiu a estes grupos. Assim, foram identificadas formas adicionais de transmissão em procedimentos estéticos (como manicure e pedicure); em piercings e tatuagens; e durante outros procedimentos de serviços de saúde (como tratamentos odontológicos, uso de seringas de vidro, endoscopia digestiva alta, por exemplo) e relações sexuais desprotegidas etc. A doença também encontrou oportunidades em populações que apresentam fatores adicionais de vulnerabilidade, como transtornos mentais e privação de liberdade (CONITEC - Ministério da Saúde, 2015).

### **1.5. Distribuição da Doença e Epidemiologia**

Uma das maneiras de estimar a prevalência de hepatite C é por meio de estudos de soroprevalência realizados em doadores de sangue. No entanto, por se tratar de uma população com características específicas, tais estudos podem não representar de forma acurada a verdadeira prevalência da doença. Tal discrepância foi demonstrada na população norte-americana, a qual apresentava na década de 1990 prevalências estimadas de infecção pelo HCV de 0,6% nos estudos com doadores de sangue e de 1,8% na população geral (ALTER, et al., 1999).

Estudos populacionais com amostras representativas de uma ou mais comunidades serem mais adequados, esse tipo de estudo possui maior complexidade e custo elevado e não pode ser executado na maior parte das regiões do mundo. Mesmo com essas ponderações, as estimativas apontam para prevalência global em torno de 2% a 3%, ou seja, entre 123 milhões e 170 milhões de pessoas infectadas pelo HCV em todo o mundo (SHEPARD, et al., 2005; WASLEY, ALTER, 2000). Apesar de a Hepatite C ser considerada endemia mundial, existe um elevado grau de variação geográfica de sua distribuição. Em muitos países faltam dados, e as estimativas são baseadas em médias ponderadas para as regiões. A (Figura 5), mostra a prevalência estimada de casos de infecção pelo HCV, segundo faixa etária, de acordo com a região geográfica do Brasil durante os anos 2004-2014 (Boletim epidemiológico, 2015).

**Figura 5. Prevalência estimada da infecção pelo HCV**



No gráfico observamos a distribuição da infecção pelo HCV, segundo faixa etária, Brasil e regiões, 2004-2011, sendo cada região identificada por cores respectivas na legenda. (Boletim epidemiológico, 2015).

A prevalência da infecção pelo HCV é considerada baixa no Reino Unido, Escandinávia (0,01% a 0,1%), Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul (0,2% a 0,5%) (WASLEY, ALTER 2000; YEN, et al., 2003). Prevalências intermediárias são encontradas no Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. Outros países com prevalência intermediária incluem Brasil, Europa Oriental, partes da África e Ásia. O Egito possui alta prevalência de infecção pelo HCV (17% a 26%), além de Hubei, Mongólia, Paquistão (PERZ, et al., 2004).

Globalmente, a epidemiologia da hepatite C também aponta maior vulnerabilidade entre indivíduos de certas gerações (GALBRAITH, et al., 2015). Em recente análise da série histórica brasileira, realizada pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), observa-se que o HCV acomete com maior

frequência os indivíduos com mais de 40 anos de idade. (MESQUITA, 2014; BURATTINI, 2014) Segundo a mesma análise, estima-se que existam, no Brasil, entre 1,4 e 1,7 milhão de portadores de hepatite C – número significativamente inferior às estimativas da Organização Mundial da Saúde. Grande parte dos portadores de hepatite C desconhece o diagnóstico e poucos sabem como ocorreu a transmissão e que existe tratamento para a doença. No Brasil, aproximadamente 10.000 casos são notificados a cada ano. A epidemiologia da hepatite C não é homogênea no cenário nacional: o desconhecimento da doença e a ausência de um exame para o diagnóstico dos portadores assintomáticos levou à maior concentração da doença em indivíduos submetidos à transfusão de sangue e hemoderivados. As regiões em que o uso de drogas injetáveis era frequente abrigam também um maior número de portadores do HCV. (CONITEC - Ministério da Saúde, 2015).

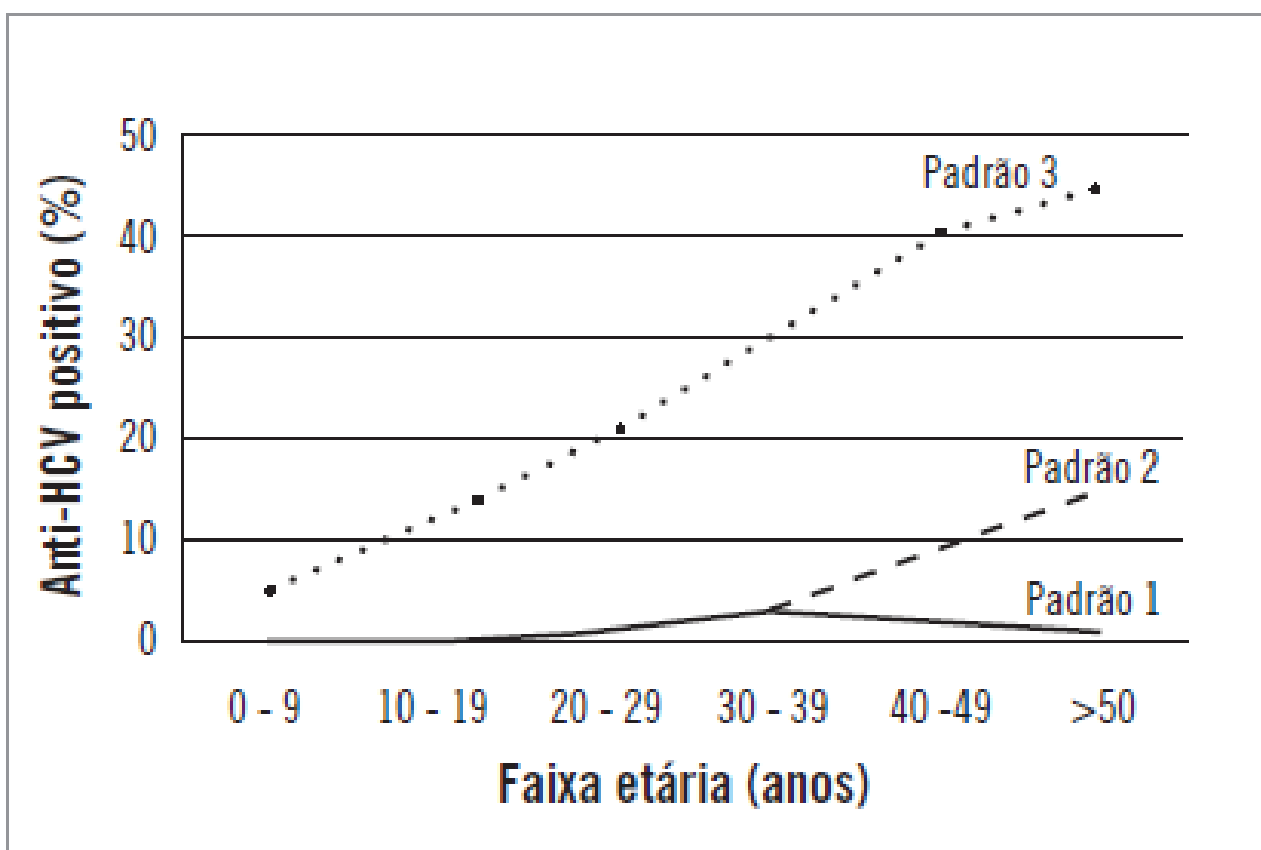
Um estudo de prevalência nas capitais brasileiras de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C encontrou as seguintes prevalências de anti-HCV: 2,1% na Região Norte, 0,7% no Nordeste, 1,3% no Centro-Oeste, 1,3% no Sudeste; 1,2% na Região Sul; e 0,8% no Distrito Federal. Os fatores de risco mais relevantes encontrados na população de 13 a 69 anos foram o uso de drogas, particularmente drogas injetáveis com padrões de morbidade mais severos que drogas inaladas. (ICICT/FIOCRUZ, 2014)

Existe apenas um número limitado de trabalhos relacionando a prevalência da infecção pelo HCV às diferentes faixas etárias, e esses demonstram não apenas as variações regionais, mas temporais que refletem épocas de maior risco de transmissão do HCV em cada região (YEN, et al., 2003). Nesses trabalhos percebem-se ao menos três padrões epidemiológicos distintos (Figura 6). O primeiro deles ocorre em países como Estados Unidos e Austrália, em que há maior prevalência do HCV na população entre 30 e 39 anos e menor prevalência nas pessoas abaixo de 20 e acima de 50 anos (WASLEY, ALTER, 2000). Nesse caso, especula-se que as maiores taxas de transmissão do HCV tenham acontecido em um passado recente, aproximadamente entre 10 e 30 anos. Em outro padrão, como o que ocorre na Turquia, Espanha, Itália, Japão e China, a maioria dos infectados pelo HCV estão acima dos 50 anos, o que pode indicar maior risco de infecção em um passado distante, aproximadamente entre 40 e 60 anos (SHEPARD, et al., 2005; ALTER, 2007). O terceiro padrão é aquele que ocorre no Egito, em que há aumento do número de casos com a idade e ao mesmo tempo grande

número de casos em todos os grupos etários, indicando risco aumentado de transmissão em um passado distante que se mantém de forma contínua (SHEPARD, et al., 2005).

A identificação desses padrões específicos de prevalência da infecção pelo HCV nas diferentes faixas etárias demonstra, provavelmente, características epidemiológicas peculiares de cada região. O reconhecimento do padrão de prevalência nos diferentes países e localidades pode permitir maior eficácia das medidas de detecção e de controle da infecção pelo HCV (FERREIRA, et al., 2004).

**Figura 6. Prevalência da positividade de anti-HCV**



Podemos observar os padrões de prevalência da positividade de acordo com a faixa etária. (WASLEY, ALTER, 2000).

O Brasil é um país de proporções continentais e, portanto, com grandes variações demográficas, sociais e culturais entre as diferentes regiões. Por esse motivo, os estudos que avaliam a prevalência do HCV no Brasil são escassos e pouco precisos, englobando, no geral, áreas geográficas restritas ou populações específicas, como os

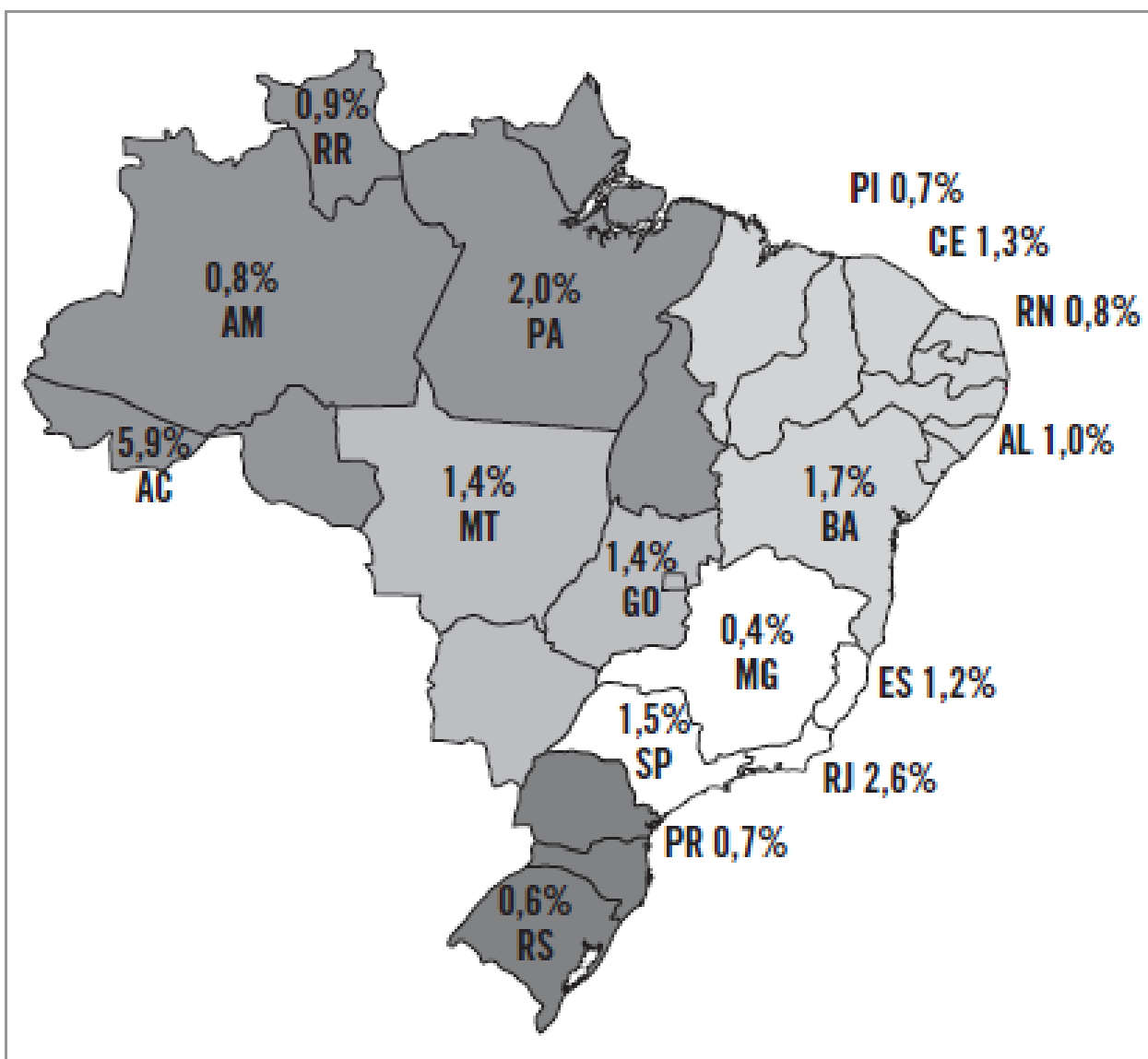
doadores de sangue (FERREIRA, et al., 2004). Há relatos de diversos estudos que traz informações contraditórias, o que sugere a necessidade de estudos com metodologia mais adequada.

Um inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia revelou que, dos 1.173.406 doadores de sangue avaliados, 14.527 (1,23%) foram reativos para o anti-HCV. A (Figura 7), exibe a distribuição espacial da prevalência de positividade para o anti-HCV segundo os Estados. As maiores taxas de prevalência foram observadas nos Estados da região Norte (2,12%) (FERREIRA, et al., 2004). A região Sul, por sua vez, mostrou baixa prevalência de positividade para o anti-HCV (0,65%) (SBH, 1999). As regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste apresentaram taxas intermediárias (1,04%, 1,19% e 1,43%, respectivamente) (SBH, 1999). No entanto, conforme discutido anteriormente, a utilização de um grupo específico como os doadores de sangue limita a extrapolação dessas estimativas para a população geral (FOCACCIA, et al., 1998) e (MARTINS, et al., 2011).

Focaccia e colaboradores (1998) relataram um estudo de base populacional com prevalência de 1,42% de positividade para o anti-HCV em 1.049 residentes do município de São Paulo, as maiores prevalências foram observadas nos indivíduos acima de 30 anos, sendo o pico de 3,8% observado na faixa etária entre 50 e 59 anos. Como discutido anteriormente, a maior prevalência de Hepatite C observada após os 50 anos de idade sugere infecção em um passado distante, sendo possível um deslocamento gradual entre as faixas etárias, com tendência de a maioria dos casos se concentrarem entre os idosos.



**Figura 7. Prevalência de anti-HCV em doadores de sangue**



Podemos observar a prevalência da positividade para o anti-HCV de doadores de sangues nos diferentes estados brasileiros (FOCACCIA, et al., 1998), (MARTINS, et al., 2011).

No Brasil, também há grande variação regional na prevalência de cada um dos agentes etiológicos, mecanismos de transmissão e evolução clínica. Os sintomas são pouco frequentes tanto nas infecções agudas quanto crônicas, mas quando aparecem podem caracterizar icterícia, fadiga, dor abdominal, náusea e vômitos, entre outros. As hepatites virais têm grande importância pelo número de indivíduos atingidos e pela possibilidade de complicações das formas agudas e crônicas. Os quadros clínicos

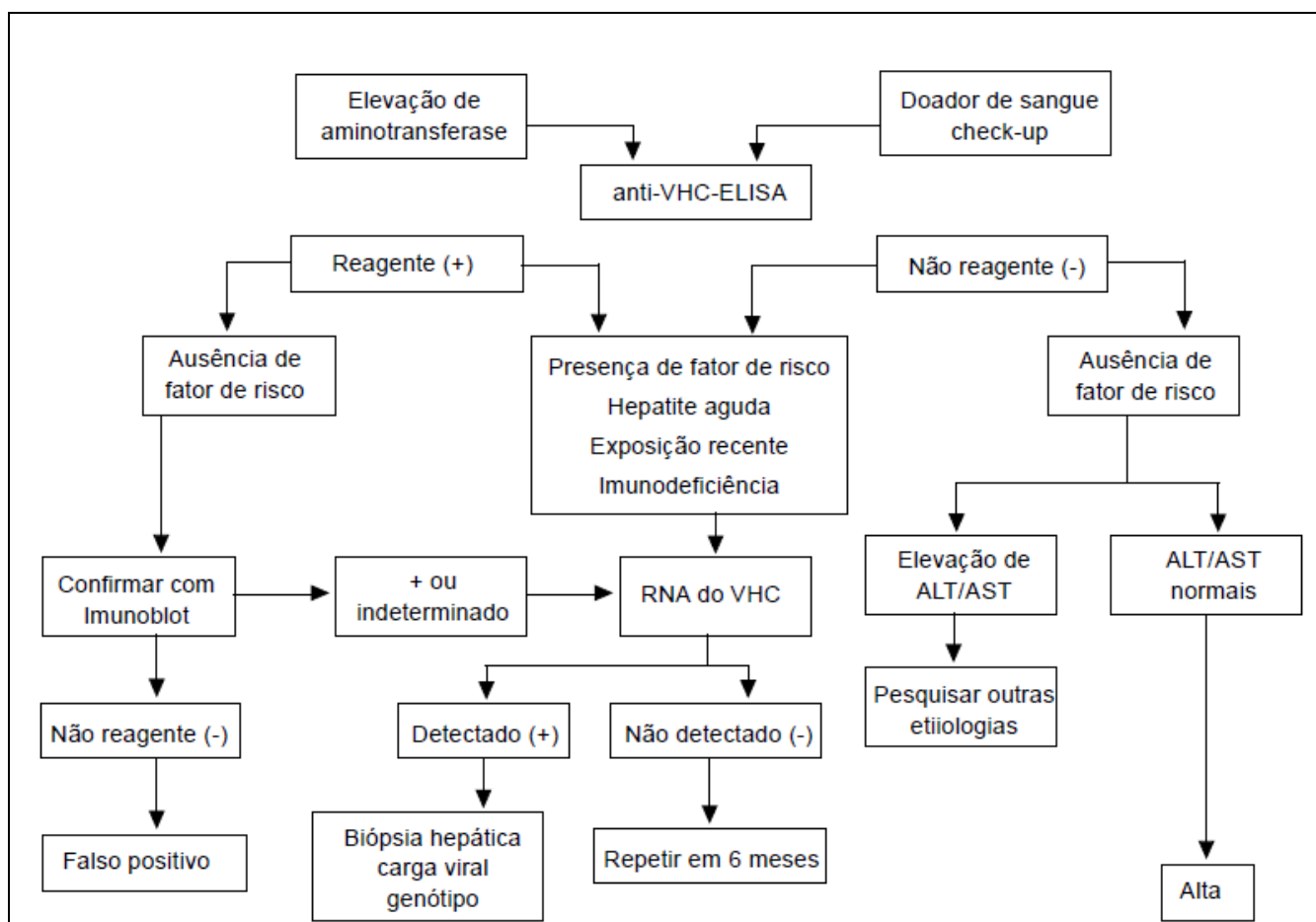
agudos das hepatites virais são muito diversificados, variando desde formas subclínicas ou oligossintomáticas até formas fulminantes (Ministério da Saúde, 2010).

As aminotransferases (ALT/TGP e AST/TGO) são marcadores sensíveis de lesão do parênquima hepático, porém não são específicas para nenhum tipo de Hepatite. A elevação da ALT/TGP geralmente é maior que da AST/TGO e já é encontrada durante o período prodromico. Níveis mais elevados de ALT/TGP quando presentes não guardam correlação direta com a gravidade da doença (LAUER, 2001; HEINTGES, 1997).

### **1.6. Diagnóstico e Tratamento**

A maior disponibilidade de ferramentas para o desenvolvimento de testes diagnósticos ocorre desde 1989 (KUO, 1989), quando foi decodificado o genoma do HCV por Choo e colaboradores (1989). Para confirmação diagnóstica de Hepatite C aconselha-se a determinação qualitativa do RNA-VHC, de preferência pelo método da PCR. As determinações quantitativas (carga viral), por outro lado, mostram-se muito interessantes antes do início do tratamento, juntamente com a determinação do genótipo, para definir-se a duração do tratamento. Elas também são utilizadas para monitorar a resposta terapêutica ou para acompanhamento de casos não tratados. O desenvolvimento de testes imunoenzimáticos para detecção do antígeno Core do HCV apresenta como principal vantagem sua realização em laboratórios não especializados, com diminuição de custos e a possibilidade de substituir a complexa determinação do RNA-HCV. A (Figura 8), apresenta um algoritmo com os exames a serem solicitados em cada etapa, de acordo com a análise conjunta dos dados clínicos e laboratoriais. (SCHIFF, et al., 1999).

**Figura 8. Algoritmo para confirmação diagnóstica da Hepatite C**



Esquema de diagnóstico clínico - laboratorial utilizado para confirmação da Hepatite C (SCHIFF, et al., 1999).

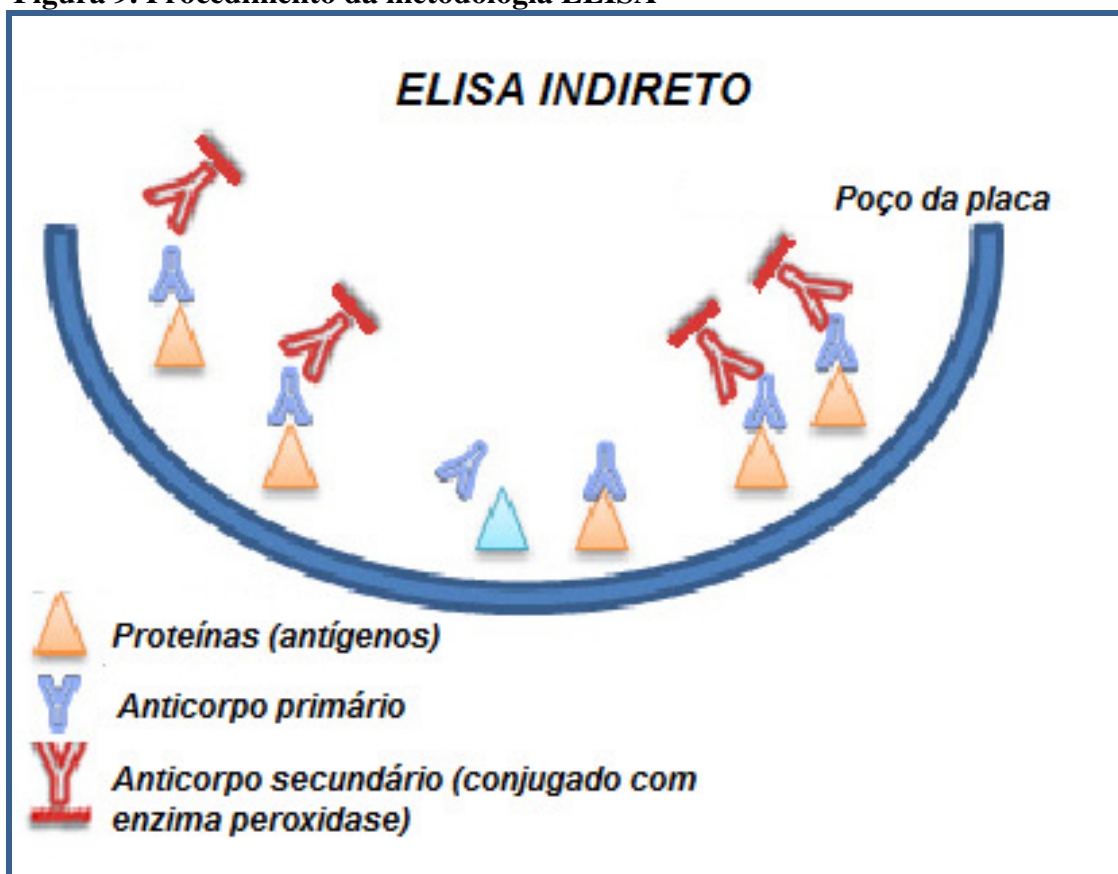
O tratamento indicado para Hepatite C como primeira escolha é a combinação de injeções semanais de Interferon alfa peguilhado (PEG-IFN) combinado com Ribavirina durante o período de 24 semanas para genótipos 1 e 4 e para os genótipos 2 e 3 são de 48 semanas. O tratamento com Interferon isoladamente também é possível, porém com pior resultado (HALLIDAY et al., 2011).

O tratamento é considerado efetivo quando há resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, negatização para o vírus HCV mantida por 6 meses após término do tratamento, sendo utilizada a técnica de PCR (polymerase chain reaction), para identificação do antígeno por amplificação do DNA em amostra de sangue do paciente. A indicação do tratamento depende de fatores variados como idade, estado geral de

saúde, probabilidade de resposta terapêutica e contra-indicações ao uso do Interferon e/ou Ribavirina (STRADER, 2004; BRUNO, 2007).

O ELISA é o diagnóstico de triagem mais utilizado em laboratórios, o princípio básico da técnica se baseia na imobilização de um dos reagentes (Antígeno ou Anticorpo) na fase sólida, enquanto o outro reagente (Antígeno ou Anticorpo) está ligado a uma enzima, como mostra na (Figura 9). A fase sólida pode ser placas de 96 poços de poliacrilamida, agarose e poliestireno, as microplacas de 96 poços permitem a realização de múltiplos ensaios e automação (GRETCH, 1997; SCHIFF, 1999).

**Figura 9. Procedimento da metodologia ELISA**



Na figura acima é possível verificar todas as etapas da metodologia do ensaio colorimétrico imunoenzimático - ELISA. (Fonte: imagem *adaptada* site: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types> data: 29/06/2015 as 17:20h).

A produção de antígenos e peptídeos sintéticos possibilitou o desenvolvimento do teste que permite a detecção de anticorpos contra o HCV (anti-HCV), o ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay), assim o primeiro ELISA desenvolvido foi o de primeira geração que tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3, da região não-estrutural NS4 do genoma viral. Esse método foi rapidamente abandonado devido a sua baixa sensibilidade e especificidade, surgindo o de segunda geração, que além da fração c100-3 incorporava as frações c33c (NS3) e c22-3 (core) (SAEZ-ALQUEZAR et al., 2001). Em 1993, surgiu o ELISA de terceira geração, contendo frações antigênicas das regiões não-estruturais NS3, NS4 e NS5 e da região estrutural Core. Além disso, grande parte dos testes de terceira geração substituíram algumas frações antigênicas (obtidas por recombinação genética), tais como a c100-3 e c33c, por peptídeos sintéticos correspondentes aos epítomos imunodominantes dessas frações, melhorando tanto a sensibilidade quanto a especificidade (SAEZ-ALQUEZAR et al., 2001).

Atualmente, já existe o ELISA de quarta geração que contém frações antigênicas do Core, NS3 e NS4, derivadas do genótipo 1, incluindo também antígenos NS3 e NS4 de genótipos diferentes do tipo 1, perfazendo um teste com aproximadamente 99,9% de sensibilidade e especificidade (SAEZ-ALQUEZAR et al., 2001). Este método detecta praticamente todos os portadores do vírus, além de indivíduos que foram infectados e não desenvolveram manifestações clínicas. Como vantagens apresentam rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo (GRETCH, 1997).

O ELISA é um dos testes de rastreamento mais utilizado, é um Ensaio Imunoenzimático que utiliza anticorpos marcados com enzimas, seguidos da adição de um substrato. Permite a detecção dos anticorpos anti-HCV. É um teste desenvolvido com alta sensibilidade, especificidade, rápido, de baixo custo, e pode ser adaptado a diferentes graus de automação. Ele é usado para definição da suspeita clínica, triagem sorológica em banco de sangue, seleção de doadores e receptores de órgãos para transplante, prognóstico da doença, critérios de cura, avaliação / monitoramento da terapêutica, estabelecimento da prevalência da doença, verificação de erradicação da doença e verificação de reintrodução de novos casos em áreas consolidadas. (GRETCH, 1997; SCHIFF, 1999). A metodologia ELISA pode ser qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa. Qualitativo, mais usado para o diagnóstico de HCV, os seus resultados informam apenas se houve ou não reação / detecção (positivo ou negativo). Semi-quantitativo, se a amostra testada (soro) foi diluída, a maior diluição a apresentar reação

é o seu título. Quantitativo, se é capaz de informar a quantidade absoluta do material detectado. A segura interpretação do teste depende de algumas características e parâmetros que o definem, como: reprodutibilidade, validade, especificidade, sensibilidade e valor preditivo. (BARRERA, 1995; UYTTENDAELE, 1994).

A maior ou menor sensibilidade e especificidade de um teste sorológico dependem de qual a sua finalidade. Para diagnóstico é necessário a utilização de testes mais específicos. Nestes casos é importante que sejam evitados os resultados falso-positivos. Para triagem em Banco de Sangue (ou outras finalidades similares) os testes são usados com fins preventivos, ou seja, a função é prevenir a contaminação do receptor. Aqui se busca evitar os resultados falso-negativos (a repetição de um teste com resultado falso-positivo custa pouco, entretanto, a disseminação da doença em consequência de um resultado falso-negativo, tem que ser impedida a todo custo) (RICHTER et al., 2003).

O teste de ELISA para detecção do anti- HCV é o mais comercializado pois, apresenta vantagens, como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo (REIS, 1998). Para o controle da doença, há somente kits importados testados e validados com amostras da região que este foi desenvolvido, os quais nem sempre apresentam a mesma especificidade em todo o mundo, devido à alta heterogeneidade do vírus da Hepatite C (HCV) (DIPTI et al., 2006). Em geral, pode-se dizer que na última década houve grandes avanços no diagnóstico laboratorial da Hepatite C. Nesse período houve progressiva melhora na sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para detecção de anticorpos contra o HCV, sendo possível identificar pessoas infectadas com o vírus de maneira rápida e relativamente barata. Contudo, é necessário que sejam desenvolvidos testes de maior acurácia na avaliação de determinados grupos de enfermos, como os imunossuprimidos ou Hepatite aguda (BRANDÃO, 2001).

Assim, considerando que a preocupação com a detecção da Hepatite C aumenta a cada dia, principalmente em bancos de sangue é de grande relevância o desenvolvimento de um Kit diagnóstico de alta especificidade, sensibilidade, baixo custo e menor tempo de ensaio. Portanto, esse trabalho propôs avaliar a ligação e reconhecimento dos anticorpos anti-HCV de amostras positivas e positivas e genotipadas de pacientes portadores de Hepatite C, através da padronização da técnica de ELISA qualitativo com uso de proteínas recombinantes quimérica.

O teste mais comercializado para detecção do anti- HCV é o ELISA, que apresenta vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo (REIS, 1998). O teste ELISA de terceira geração (ELISA III) incluiu antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e adicionado um antígeno da região NS5 (GRETCH, 1997). Assim, houve um aumento na sensibilidade para detectar infecção pelo HCV, tanto em doadores de sangue quanto em hepatopatas (BARRERA, 1995; UYTTENDAELE, 1994). Para o controle da doença, há somente kits importados, os quais nem sempre apresentam a mesma especificidade em todo o mundo, devido à alta heterogeneidade do vírus da Hepatite C (HCV) (DIPTI et al., 2006). Em geral, pode-se dizer que na última década houve grandes avanços no diagnóstico laboratorial da Hepatite C. Nesse período houve progressiva melhora na sensibilidade e especificidade dos testes utilizados para detecção de anticorpos contra o HCV, sendo possível identificar pessoas infectadas com o vírus de maneira rápida e relativamente barata. Contudo, é necessário que sejam desenvolvidos testes de maior acurácia na avaliação de determinados grupos de enfermos, como os imunossuprimidos ou Hepatite aguda (BRANDÃO, 2001).

Assim, considerando que a preocupação com a detecção da Hepatite C aumenta a cada dia, principalmente em bancos de sangue é de grande relevância o desenvolvimento de um Kit diagnóstico de alta especificidade, sensibilidade, baixo custo e menor tempo de ensaio.

Portanto, esse trabalho propôs avaliar a ligação e reconhecimento dos anticorpos anti-HCV de amostras positivas e positivas e genotipadas de pacientes portadores de Hepatite C, através da padronização do ELISA qualitativo com uso de proteínas recombinantes quimérica.

## 2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico inicial da Hepatite C pode ser realizado pela pesquisa de anticorpos anti-HCV, através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando testes comerciais, que empregam antígenos virais recombinantes. A metodologia utilizada para o desenvolvimento desses ensaios está baseada na organização genômica do HCV. O ELISA disponível no mercado é bastante útil para análises laboratoriais, possibilitando a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo, sendo, por isso um teste mais rápido e de fácil execução. (GRETCH, 1997; SCHIFF, 1999).

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais exigida e reconhecida, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Resultados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas, prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que método analítico desenvolvido gere informações confiáveis interpretáveis sobre a amostra ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. Para tanto, foi feito estudos em bulas de kits presentes no mercado e avaliou-se a sensibilidade e especificidade, assim realizaram-se experimentos e validação do teste a fim de, melhorar ou chegar o mais próximo de tais valores, utilizando amostras de pacientes brasileiros positivos para o HCV. De acordo com os critérios citados acima, desenvolveu-se a técnica padronizada de ELISA que os resultados obtidos neste trabalho poderão auxiliar no desenvolvimento de Kits comerciais de ELISA para a população brasileira, de baixo-custo, sensível, específico e boa detecção.



### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Determinar e avaliar a interação entre os anticorpos anti-HCV, presentes em amostras sabidamente positivas para o vírus da Hepatite C, com proteína recombinante quimérica por meio da metodologia Ensaio Imunoenzimático - Elisa Qualitativo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Padronizar e determinar a melhor concentração da proteína recombinante quimérica durante a adsorção no poço da placa;
- ✓ Definir a solução bloqueio a ser utilizada, escolhendo o Leite em pó 10% e BSA 10% como base para este bloqueio;
- ✓ Determinar a diluição ideal da amostra sorológica;
- ✓ Determinar a diluição ideal do conjugado;
- ✓ Fabricar microplacas com concentração da proteína recombinante-antígeno padronizada;
- ✓ Analisar a validade, reprodutibilidade, valor preditivo, sensibilidade e especificidade;
- ✓ Comparar o ELISA padronizado com kit de referência no mercado;
- ✓ Comparar a sensibilidade e especificidade de kits referência no mercado com a sensibilidade e especificidade do ELISA padronizado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção da proteína viral

As proteínas recombinantes e conjugado foram gentilmente doados pela FAPON BIOTECH INC (Shenzhen/Guangdong - China) com a finalidade de utilizá-las na sensibilização das microplacas de ELISA, para detecção de anticorpos anti-HCV. Alguns resultados desse trabalho não puderam ser descritos devido a sigilo empresarial.

O fornecedor nos doou as seguintes proteínas e conjugado para realização dos testes:

- Conjugado, anticorpos anti- IgG peroxidase;
  
- Proteína quimérica (multiepitopo) recombinante constituída pelos antígenos do Vírus da Hepatite C: core, NS3, NS4 e NS5 com aproximadamente 42 kDa, 1mg/mL e 95% de pureza;
  
- Proteína individual NS3 com aproximadamente 31 kDa, 1,32mg/mL e 98% de pureza;
  
- Proteína Core com aproximadamente 14 kDa, 3,1 mg/mL e 95% de pureza.

Tais proteínas foram expressas em *E.coli*. Utilizou-se as proteínas no processo de sensibilização (adsorção) das microplacas de poliestireno com 96 poços.

## 4.2. Delineamento Experimental



Fonte: (SOUZA, 2016)

## 4.3 Amostras sorológicas

As 388 amostras sorológicas negativas, positivas e positivas genotipadas para Hepatite C utilizadas neste trabalho foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Adriana Malheiro – HEMOAM (Hemocentro do Amazonas – Manaus), estas foram obtidas de projetos anteriores, com assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e concordância do Participante de pesquisa para sua utilização em pesquisas futuras. Projeto avaliado em comitê de ética: FMT- HVD – CAAE: 00330114000-09.

#### **4.4. Padronização da concentração da proteína- antígeno na placa**

Realizou-se o processo de sensibilização das microplacas de poliestireno (Greiner Bio-one) com três concentrações das proteínas recombinantes quimérica 25, 50 e 100 ng/poço. Utilizou-se a solução de Tampão carbonato 0,1M pH 9,6 para o preparo das soluções de sensibilização com as concentrações selecionadas das proteínas. Identificou-se as microplacas com 96 poços de fundo chato, com alta capacidade de ligação, de cada concentração de proteína-antígeno e pipetou-se 100 µL/poço das respectivas soluções de sensibilização previamente preparadas, feito a sensibilização estas foram incubadas *overnight* em temperatura ambiente 22 a 25 °C em uma incubadora úmida.

Após o período *overnight*, adicionou-se a solução bloqueio BSA 10% (Sigma) e Leite em pó 10% (Molico) nas microplacas de cada concentração de proteína e incubou-se duas horas a temperatura ambiente. Percorrido o tempo de incubação, descartou-se a solução de bloqueio e fez-se a lavagem na lavadora de microplacas - BrasSerum modelo: BSII, com solução de lavagem (PBS 0,01M+Tween 20 0,1% (Vetec)), retirou-se o excesso da solução de cada microplaca com papel absorvente e pipetou-se as amostras sorológicas (em todo os ensaios foram pipetadas em duplicatas) positivas e negativas para Hepatite C diluídas 1/160, 1/80, 1/40 e 1/10 em tampão PBS 0,01M e incubou-se por 30 minutos a 37 °C.

Fez-se 3 lavagens após o tempo de incubação e retirou-se o excesso da solução em papel absorvente e adicionou-se o conjugado (FAPON) diluído 1/8.000, 1/10.000, 1/12.000 e 1/15.000 e incubou-se as placas por 30 minutos a 37°C. Fez-se 3 lavagens após o tempo de incubação e retirou-se o excesso da solução em papel absorvente e adicionou-se a solução substrato TMB (Sigma) e incubou-se por 15 min ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Adicionou-se o inibidor da reação STOP (ácido sulfúrico 2N (Vetec)), homogeneizou-se e fez-se a leitura em leitora de microplaca no comprimento de onda de 450 nm.

##### **4.4.1. Junção das proteínas Core e NS3 individuais com a Quimérica**

Fabricou-se microplacas sensibilizadas com a junção da proteína recombinante Quimérica com as individuais NS3 e Core na concentração de 25ng/cada, totalizando 75ng de proteína/poço, utilizando o mesmo procedimento técnico do item 4.3, assim

testaram-se amostras positivas e amostras negativas em paralelo com a microplaca sensibilizada com 25ng/poço de proteína recombinante quimérica, para avaliar se houve melhor exposição aos sítios de ligação.

#### **4.5.Fabricação das microplacas: avaliação do processo produtivo e teste de homogeneidade do lote**

Definiu-se a concentração de proteína recombinante quimérica e soluções, então fabricou-se microplacas com 96 poços sensibilizadas. Utilizou-se os critérios de “processo produtivo” e teste de homogeneidade utilizado na empresa de desenvolvimento de Kits diagnósticos - ELISA, Wama Diagnóstica situada na cidade de São Carlos-SP, no processo de fabricação das microplacas.

Fez-se a identificação de cada microplaca e pesou-se antes e após a pipetagem da solução de sensibilização e bloqueio e fez-se o cálculo do processo produtivo (Pesagem final - Pesagem inicial / 96 \*1000), sendo eficaz as placas que apresentaram resultados 100% (+/-) 2.

A homogeneidade da solução de sensibilização e bloqueio serviu para avaliar o processo de pipetagem no momento da fabricação das microplacas, assim coeficientes até 20% representaram que todas as placas tiveram a mesma distribuição das soluções.

#### **4.6.Validação**

Fez-se a validação com amostras negativas e positivas para Hepatite C, o teste consistiu na união da acuidade, acurácia ou exatidão, grau em que o exame foi apropriado para medir o verdadeiro valor daquilo que foi medido, observado ou interpretado. Capacidade de obtermos valores muito próximos aos obtidos num ensaio de referência no mercado (SILVA E OLIVEIRA, 2007).

Utilizou-se o cálculo abaixo:

$$\text{Validade: } \frac{\text{Número de resultados corretos}}{\text{Número total de resultados}} \times 100$$

#### **4.7. Reprodutibilidade**

Fez-se a análise da reprodutibilidade utilizando amostras positivas e negativas, foram repetidas 20 vezes e fez-se a média das DOs, desta forma seguiu-se os critérios de

união da confiabilidade, fidedignidade e precisão; termos usados para testes qualitativos tem por finalidade avaliar a capacidade da obtenção dos resultados com valores muito próximos entre si. Fez-se a média das amostras sabidamente positivas e negativas repetidas 20 vezes em um mesmo ensaio fez-se cálculo da reprodutibilidade (SILVA E OLIVEIRA, 2007).

Utilizou-se a expressão abaixo:

$$\text{Reprodutibilidade (\%)} = \frac{\text{Número de resultados concordantes}}{\text{Número total de resultados}} \times 100$$

#### **4.8. Avaliação da Sensibilidade**

Fez-se o cálculo da sensibilidade, que serviu para avaliar a capacidade que foi detectada as amostras verdadeiramente positivas, esta foi avaliada através da seguinte expressão (SILVA E OLIVEIRA, 2007):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Amostras Verdadeiras Positivas}}{\text{Amostras Verdadeiras Positivas} + \text{Amostra Falso Negativa}} \times 100$$

#### **4.9. Avaliação da Especificidade**

Fez-se o cálculo da especificidade, que serviu para avaliar a capacidade que foi detectada as amostras verdadeiramente negativas. O seu valor foi obtido através da seguinte expressão (SILVA E OLIVEIRA, 2007):

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Amostra Verdadeira Negativa}}{\text{Amostra Verdadeira Negativa} + \text{Amostra Falso Positiva}} \times 100$$

#### **4.10. Valor Preditivo**

Os valores preditivos de um teste variam de acordo com a prevalência da doença ou infecção, a prevalência corresponde ao número total de casos de uma doença ou infecção numa determinada população, num período de tempo. Temos Valor preditivo

positivo (VPP) e Valor preditivo negativo (VPN). O VPP é a probabilidade de que um resultado positivo seja verdadeiramente positivo e o VPN é a probabilidade de que um resultado negativo seja verdadeiramente negativo (SILVA E OLIVEIRA, 2007).

Utilizou-se a expressão abaixo para calcular os valores preditivos:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Amostra Positiva}}{\text{Amostra Positiva} + \text{Amostra Falso Positiva}} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Amostra Negativa}}{\text{Amostra Negativa} + \text{Amostra Falso Negativa}} \times 100$$

#### **4.11. Comparação com Kit de referência no mercado**

Utilizou-se um kit de referência no mercado para Hepatite C para avaliarmos a eficácia do ELISA padronizado com as proteínas recombinantes. Assim fez-se os ensaios em paralelo, pelo mesmo analista e mesmas condições ambientais, utilizou-se a bula do fabricante do kit de referência para realizarmos o procedimentos do ensaio. Após realizou-se a análise comparativas entre os kits de referência e o ELISA padronizado com as proteínas recombinantes.

#### **4.12. Análise comparativa da sensibilidade especificidade**

Realizou-se uma busca na internet dos principais kits utilizados na detecção de anticorpos anti-HCV, encontrou-se 04 marcas mais competitivas no mercado e fez-se a análise comparativa da sensibilidade e especificidade destes kits com o ELISA padronizado com proteínas recombinantes-antígenos.

#### **4.13. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em porcentagem e com média SEM utilizado o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (San Diego, Califórnia, USA) no qual, foram analisados através da Densidade Óptica (DO) obtida em cada teste e feito os cálculos das expressões para Validação, Reprodutibilidade, Sensibilidade, Valor Preditivo e Coeficiente de Variação (CV).

## **5.0. RESULTADOS**

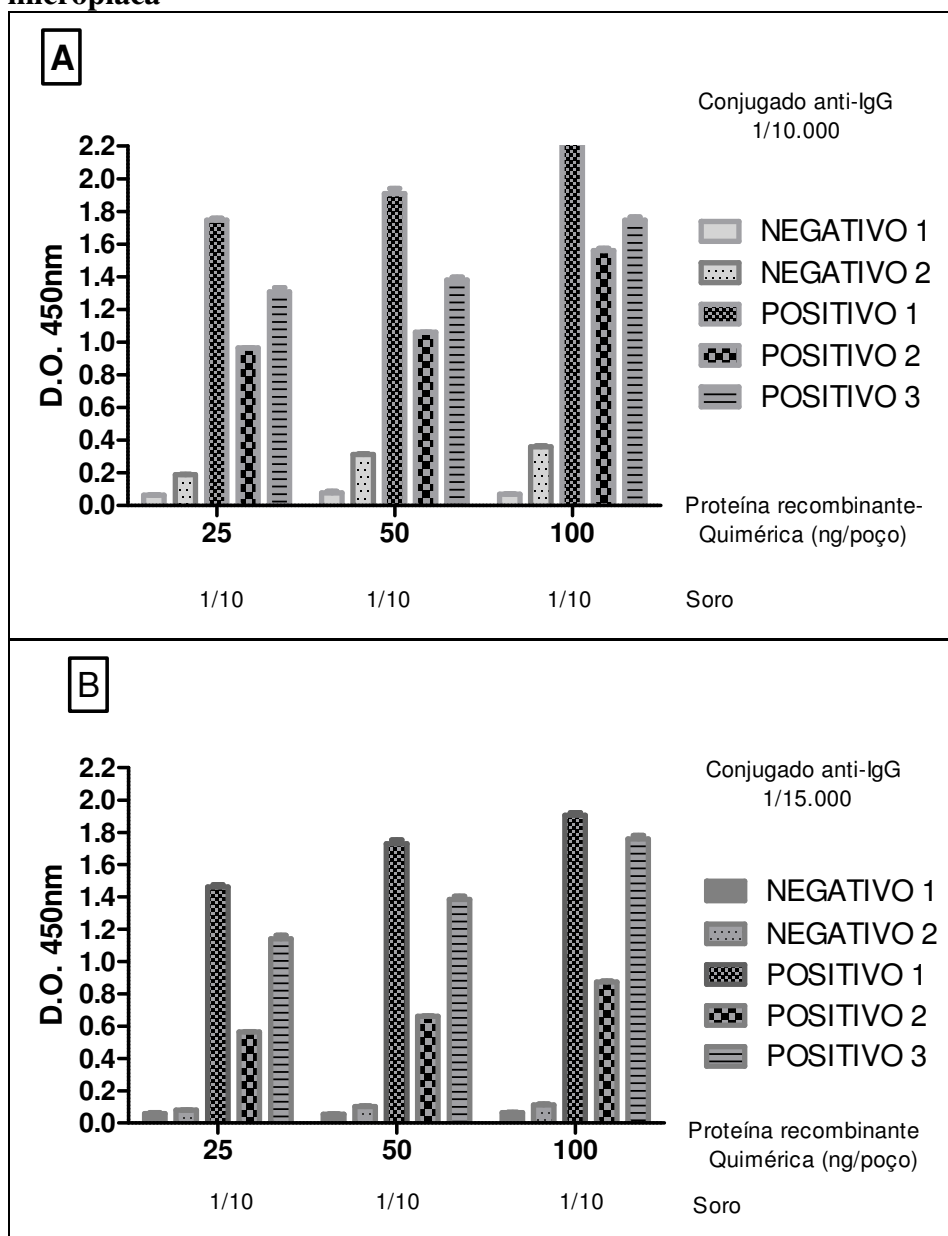
### **5.1. Concentração de proteína recombinante quimérica**

Foram fabricadas microplacas com concentrações de 25, 50 e 100 ng/poço de proteína recombinante quimérica-antígeno. Realizou-se o ELISA com 03 amostras positivas, 01 amostra negativa diluídas 1/10 na solução PBS 0,01 M e conjugado diluído 1/10.000 e 1/15.000.

Foram observados que, nas três concentrações testadas as amostras positivas apresentaram DOs acima 0,5 (Figura 10 A e B) e reproduziram como positivas e as negativas DOs abaixo 0,2 e reproduziram como negativa, houve discreto aumento de DO, aproximadamente 0,02 DO, nas concentrações de 50 e 100 ng/poço quando comparados com a de 25ng/poço (Figura 10 A e B). Já em relação à diluição do conjugado podemos observar que, ambas apresentaram-se satisfatórias, com resultados fidedignos das amostras testadas, houve um discreto aumento na DO na diluição 1/10.000 (Figura 10 A) comparado com a diluição 1/15.000 (Figura 10 B). Definiu-se utilizar a concentração de 25ng/poço para a sensibilização devido à diferença entre as concentrações não serem significativas.



**Figura 10. Padronização da concentração da proteína de sensibilização na microplaca**



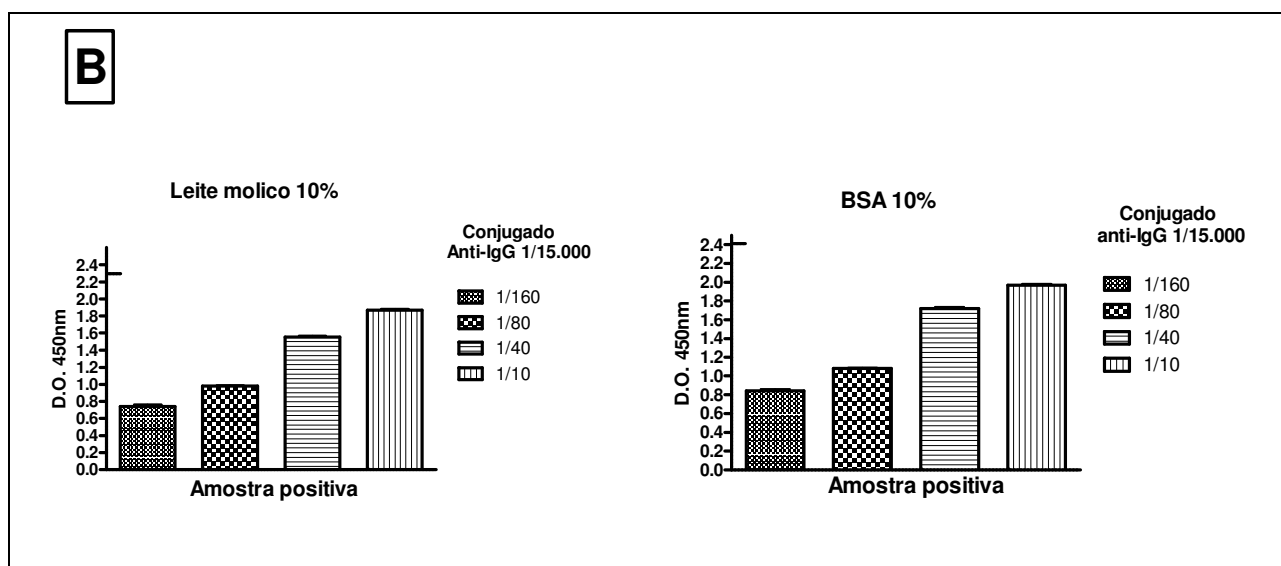
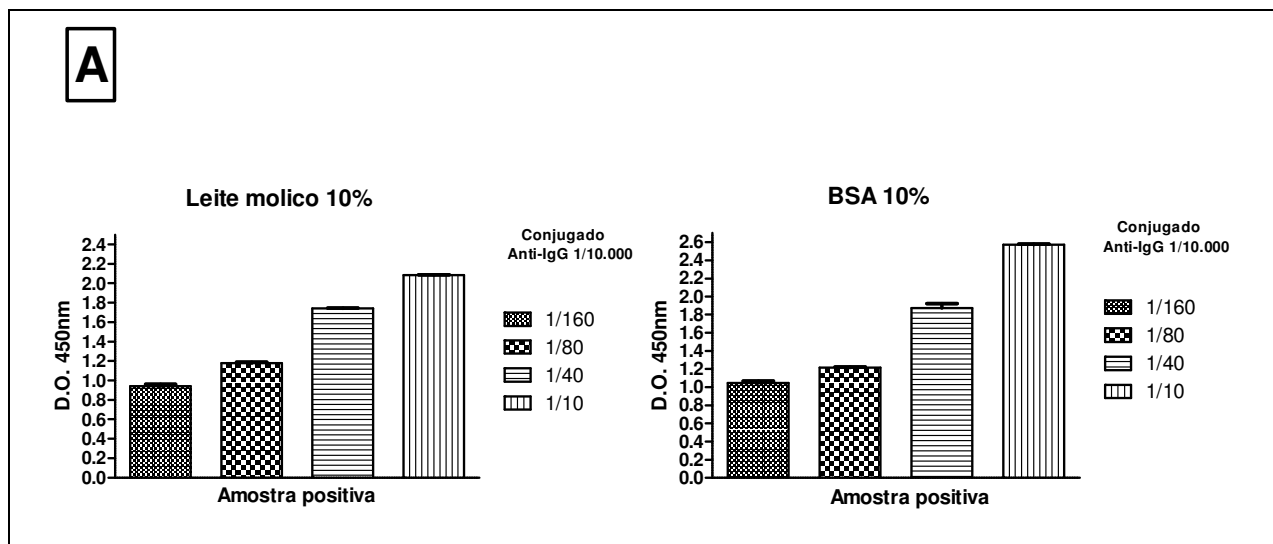
(A) Média da DO das amostras de soro nas diluições de 1/10, conjugado anti-IgG 1/10.000 e concentração das proteínas recombinantes-antígenos 25, 50 e 100 ng/poço.  
 (B) Média da DO das amostras de soro nas diluições de 1/10, conjugado anti-IgG 1/15.000 e concentração das proteínas recombinantes-antígenos 25, 50 e 100 ng/poço.  
 Os dados representam a média com SEM utilizado o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (San Diego, Califórnia, USA).

## 5.2. Escolha da solução Bloqueio e diluição da amostra

Realizou-se o teste com a microplaca sensibilizada na concentração padronizada de 25ng/poço de proteína recombinante quimérica, conjugado anti-IgG diluído 1/10.000 e 1/15.000 e quatro amostras positivas diluídas 1/160, 1/80, 1/40 e 1/10. Assim, foram fabricadas as microplacas com as soluções de bloqueio leite em pó 10% e BSA 10%, em seguida realizou-se o ELISA com 01 amostra sabidamente positiva nas diluições descritas acima.

Podemos observar que, a diluição 1/10 das amostras apresentou-se com melhor resultado, com DOs acima de 1,5 indicando alta positividade, podemos observar também que, em ambas diluições do conjugado perfizeram resultados com DOs acima de 0,5, o que demonstrou positividade da amostra em ambas diluições. Já em relação às soluções bloqueio os resultados foram satisfatórios utilizando Leite ou BSA na concentração de 10%, notou-se que as DOs estão discretamente elevadas nas microplacas bloqueadas com BSA 10% na diluição da amostra 1/10 com uma diferença de DO de 0,004, mas, levando em consideração que, todos os resultados das DOs foram de 0,5, nas duas soluções testadas, assim devido o custo da solução de BSA ser relativamente maior ao do leite em pó, decidiu-se utilizar o leite em pó 10% como bloqueio das microplacas (Figura 11 A e B).

**Figura 11. Escolha da solução de bloqueio e diluição da amostra**



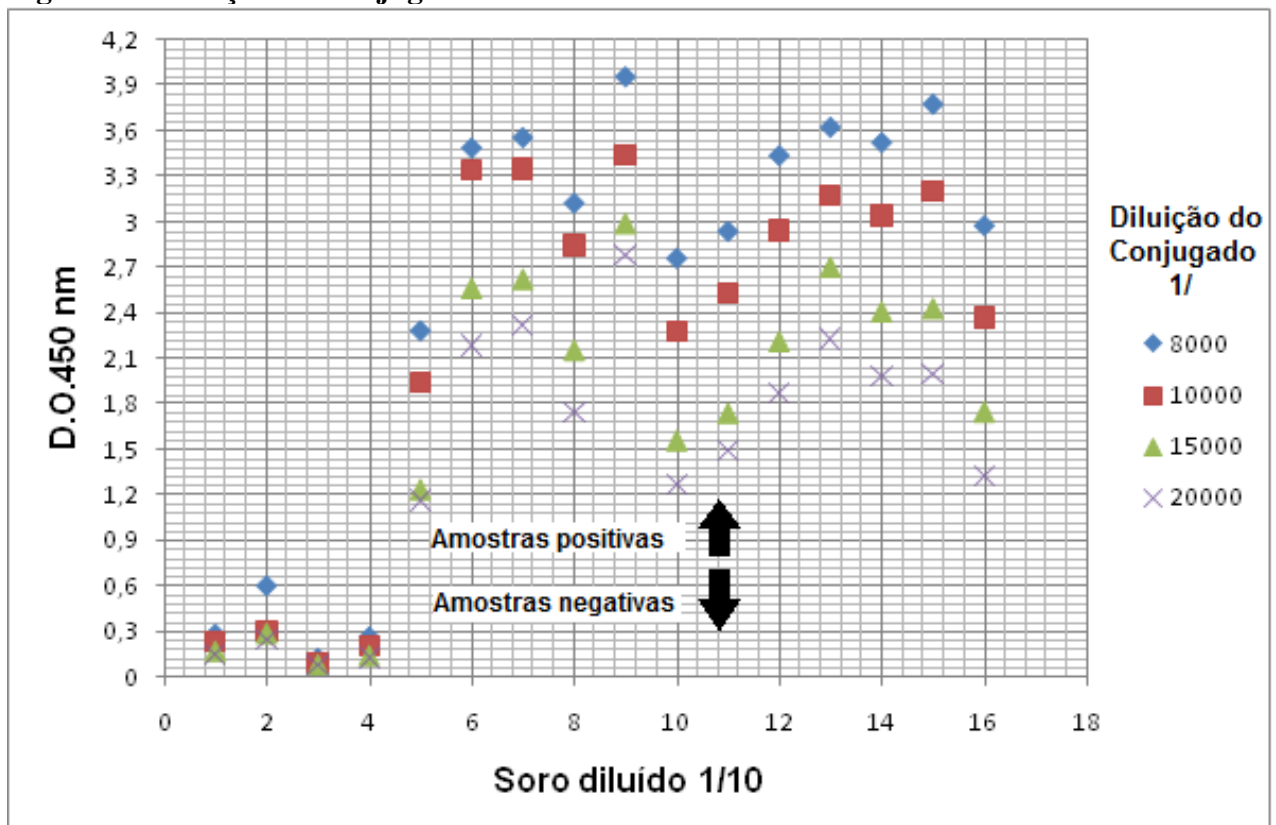
(A) Soluções de Bloqueio Leite em pó e BSA 10%, concentração das proteínas recombinantes-antígenos 25 ng/poço, média das DOs das diluições das amostras de soro 1/160; 1/80; 1/40 e 1/10 e conjugado anti-IgG 1/10.000. (B) Soluções de Bloqueio Leite em pó e BSA 10%, concentração das proteínas recombinantes-antígenos 25 ng/poço, média das DOs das diluições das amostras de soro 1/160; 1/80; 1/40 e 1/10 e conjugado anti-IgG 1/15.000. Os dados representam a média com SEM utilizado o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (San Diego, Califórnia, USA).

### **5.3. Definição da diluição ideal do Conjugado**

Fez-se um ensaio para escolha da diluição ideal do conjugado, utilizou-se as diluições sugeridas pelo fabricante 1/10.000 e 1/15.000 e mais duas. Realizou-se o ELISA com as seguintes diluições 1/8.000, 1/10.000, 1/15.000 e 1/20.000 do conjugado anti-IgG com quatro amostras negativas e doze amostras positivas.

Podemos observar que, os resultados foram satisfatórios (Figura 12) para as diluições 1/10.000, 1/15.000 e 1/20.000 sendo que, a diluição 1/8.000 e 1/10.000 não foram satisfatórios apresentou-se com resultados de DOs muito elevados, acima de 3,0 para amostra positiva e 1/20.000 apresentou-se com DOs baixa para amostra positiva quando comparadas com as da diluição 1/15.000. Definiu-se que, a diluição 1/15.000 do conjugado foi ideal, pois demonstrou DOs das amostras positivas com intervalos entre 1,2 a 3,0, assim perfazendo uma distância de 0,8 de DO das amostras negativas para positivas isto favorece uma zona de indeterminados satisfatória com melhor distribuição entre as amostras sorológicas positivas e negativas, portanto a diluição de 1/15.000 foi considerada como padrão.

**Figura 12. Diluições do conjugado**



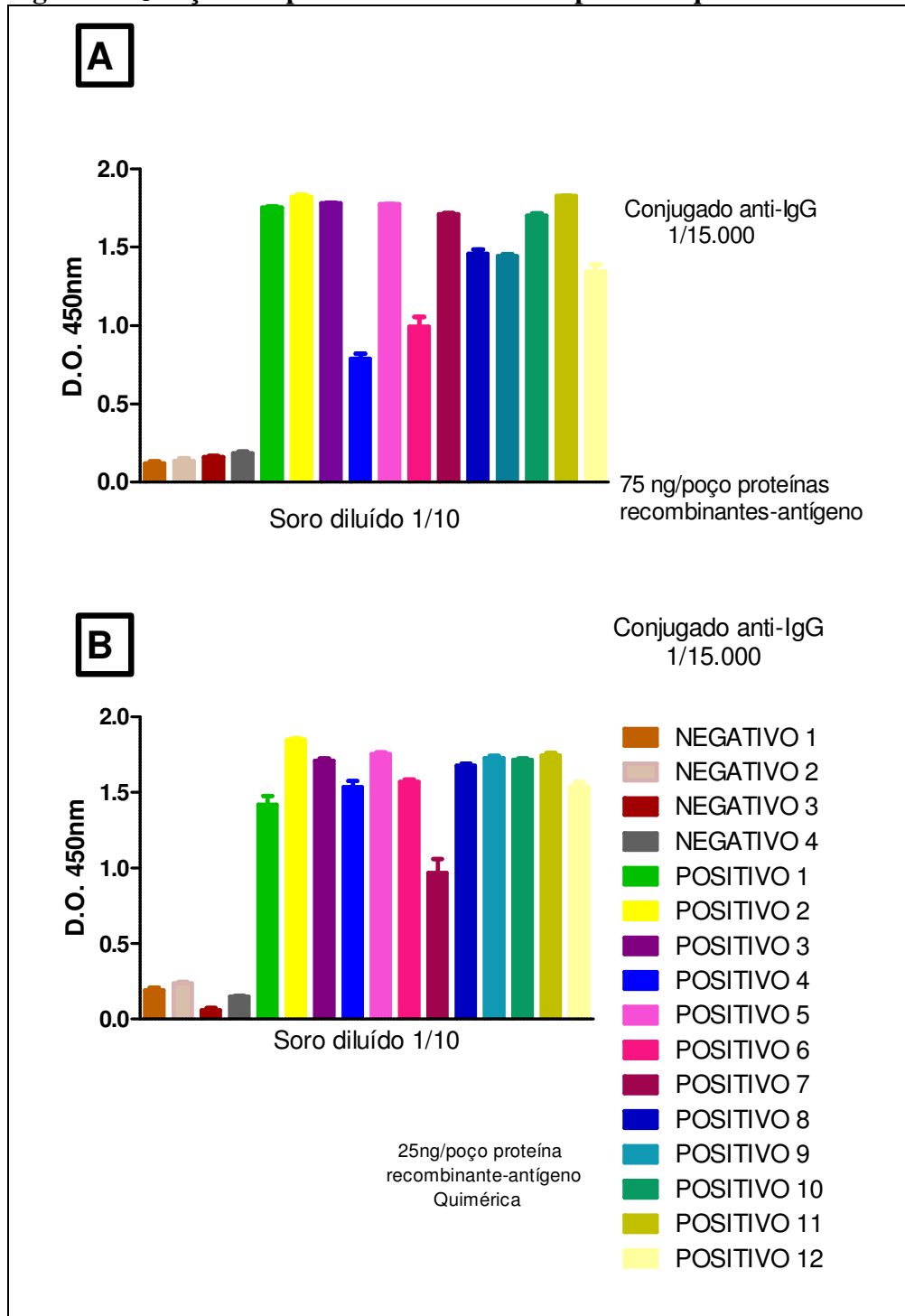
Concentração das proteínas recombinantes-antígenos quimérico 25 ng/poço, soluções de bloqueio leite em pó 10%, diluição da amostra de soro positivas e negativas 1/10 e média das diluições de conjugado anti-IgG 1/8.000, 1/10.000, 1/15.000 e 1/20.000. Os dados representam a média com SEM utilizado o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (San Diego, Califórnia, USA).

#### **5.4. Análise da junção das proteínas Core e NS3 individuais com a Quimérica**

Fabricou-se microplacas sensibilizadas com a junção da proteína recombinante Quimérica as individuais NS3 e Core na concentração de 25ng/cada, totalizando 75ng de proteína/poço, assim testou-se doze amostras positivas e quatro amostras negativas em paralelo com a microplaca sensibilizada com 25ng/poço de proteína recombinante quimérica.

Podemos observar que, as amostras positivas apresentaram-se com DO acima de 0,5. Destacou-se duas amostras positivas, Positivo 4 e 6, na junção das proteínas individuais NS3 e Core, ocorreu a diminuição do sítio de ligação assim, obtivemos uma DO mais baixa do que na placa com 25ng de proteína quimérica, e, a positivo 7 apresentou-se maiores exposições de sítio de ligação, apresentou-se com DOs mais altas do que quando a microplaca sensibilizada com 25ng de proteína quimérica (Figura 13 A e B), assim não foram satisfatórios os resultados da junção das proteínas individuais a proteína quimérica.

**Figura 13. Junção das proteínas individuais a proteína quimérica**



(A) Sensibilização da microplaca com 75 ng/poço (25ng de NS3, 25ng de Core e 25ng de Quimérica) de proteínas recombinantes-antígenos, solução de bloqueio Leite em pó 10%, média das DOs das amostras de soro diluídas 1/10 e conjugado anti-IgG 1/15.000. (B) Sensibilização da microplaca com 25 ng/poço de proteína recombinante-antígeno Quimérica, solução de bloqueio Leite em pó 10%, média das DOs das amostras de soro diluídas 1/10 e conjugado anti-IgG 1/15.000. Os dados representam a média com SEM utilizado o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (San Diego, Califórnia, USA).

### **5.5. Fabricação de placas: análise do processo produtivo e homogeneidade**

Padronizou-se as soluções de bloqueio, antígeno, conjugado e diluição da amostra fabricou-se um lote com 10 microplacas utilizando a análise do processo produtivo e homogeneidade do lote produzido.

Para análise do processo produtivo pesou-se as microplacas identificadas como 1, 5 e 10 vazias e cheias, antes da pipetagem e após a pipetagem, das soluções de sensibilização (Tabela 2) e bloqueio (Tabela 3), no qual, estes dados foram utilizados para análise do processo produtivo.

Utilizou-se para analisarmos a homogeneidade do lote 3 tiras (1, 6 e 12) com 8 poços de cada microplaca fabricada identificada como 1, 5 e 10 e duas amostras, uma positiva (Tabela 4) e outra negativa (Tabela 5), assim realizou-se o ELISA e comparou-se as DOs entre as tiras.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas abaixo, estes se apresentaram satisfatórios, os valores encontrados de vol/poço na análise do processo produtivo estão dentro do esperado 100% (+/-) 2, e, no teste de homogeneidade a amostra positiva teve CV 0,9% e a negativa CV 3,18%, ambos os coeficientes de variação estão abaixo de 20% perfazendo a qualidade da fabricação das placas.



**Tabela 2. Análise do processo produtivo-sensibilização**

<b>Placas</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>P0</b>	47,71g	47,69g	47,69
<b>P1</b>	57,29g	57,26g	57,21
<b>VOL/POÇO</b>	<b>99,8 uL</b>	<b>99,7uL</b>	<b>99,2uL</b>

Placas identificadas de 1, 5 e 10 com P0 = peso inicial, P1 = peso final e Vol/poço = 100% (+/-) 2.

**Tabela 3. Análise do processo produtivo-bloqueio**

<b>Placas</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>P0</b>	47,87g	47,97g	47,93g
<b>P1</b>	57,51g	57,58g	57,55g
<b>VOL/POÇO</b>	<b>100,4uL</b>	<b>100,1uL</b>	<b>100,2uL</b>

Placas identificadas de 1, 5 e 10 com P0 = peso inicial, P1 = peso final e Vol/poço = 100% (+/-) 2.

**Tabela 4. Análise do CV do teste de homogeneidade com Soro HCV Positivo 2**

	Placas	Tira 1	Tira 6	Tira 12	Média	DP	CV(%)
<b>Soro HCV Positivo 2</b>	1	1,860	1,830	1,890	1,860	0,030	1,61
	5	1,965	1,814	1,960	1,889	0,086	4,54
	10	1,870	1,860	1,850	1,860	0,010	0,54
	<b>Média entre as placas</b>				<b>1,870</b>	<b>0,017</b>	<b>0,90</b>

Análise dos resultados da amostra positiva testada 8 vezes nas tiras 1, 6 e 12 das placas fabricadas 1, 5 e 10. Feito cálculo da média = 1,870, desvio padrão (DP) = 0,017 e coeficiente de variação (CV) = 0,90.

**Tabela 5. Análise do CV do teste de homogeneidade com Soro HCV Negativo 4**

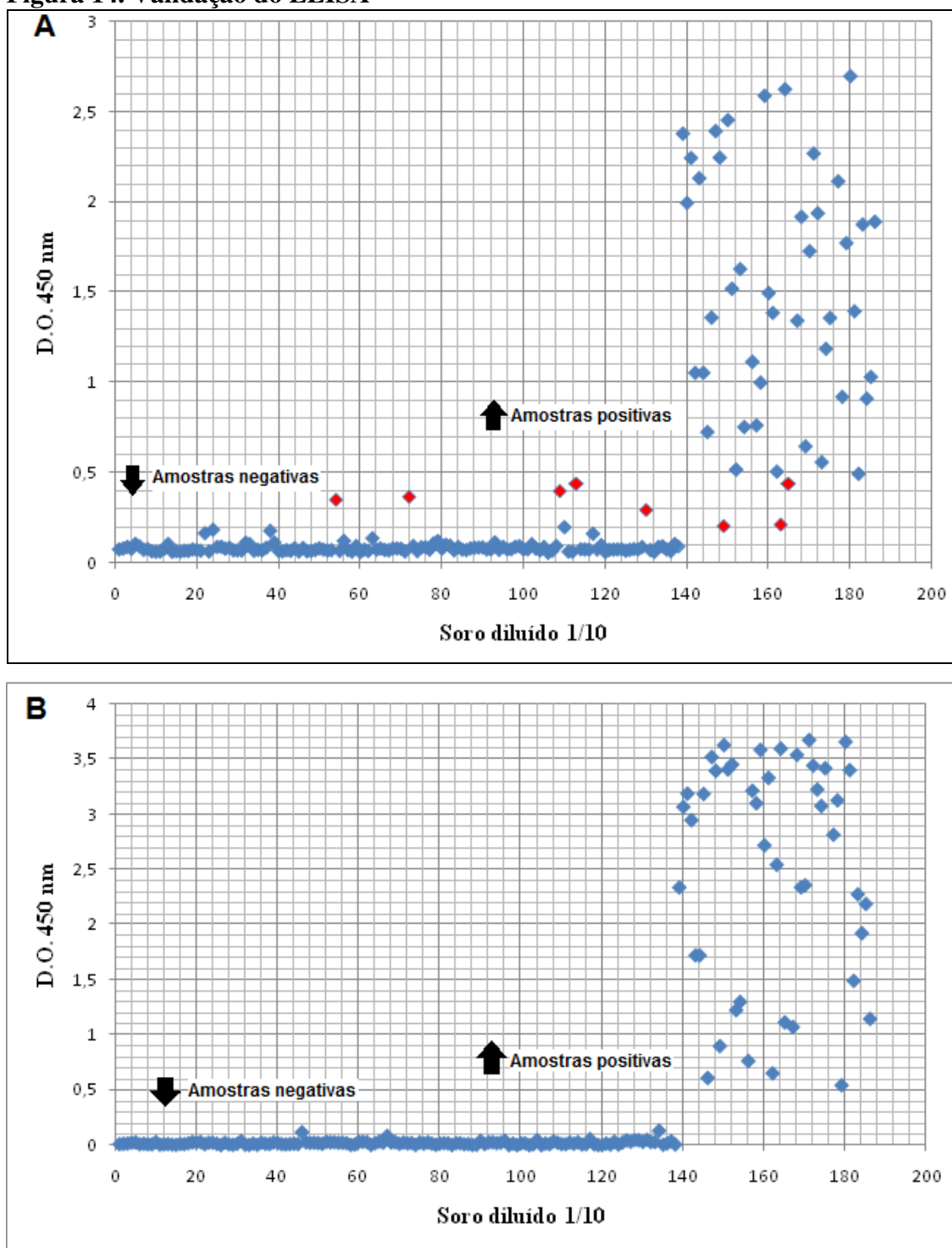
	Placas	Tira 1	Tira 6	Tira 12	Média	DP	CV(%)
<b>Soro HCV Negativo 4</b>	1	0,073	0,069	0,065	0,069	0,004	5,80
	5	0,065	0,065	0,066	0,065	0,001	0,88
	10	0,065	0,065	0,066	0,065	0,001	0,88
	<b>Média entre as placas</b>				<b>0,067</b>	<b>0,002</b>	<b>3,18</b>

Análise dos resultados da amostra negativa testada 8 vezes nas tiras 1, 6 e 12 das placas fabricadas 1, 5 e 10. Feito cálculo da média = 0,067, desvio padrão (DP) = 0,002 e coeficiente de variação (CV) = 3,18.

## 5.6. Validação

A validação foi feita com 186 amostras, destas 138 eram negativas e 48 positivas, foi feito os testes nas placas fabricadas e em paralelo com kit referência de mercado, após realizou-se análise dos gráficos e o cálculo de validade.

Podemos observar (Figura 14 A e B) destacado em vermelho oito amostras (4,3%) foram discordantes quando comparados com os resultados obtidos com kit de referência no mercado. O cálculo feito para avaliar a validade obteve resultado de 95,69%, este valor nos mostra que, está dentro do valor de referência 90 a 100%, assim as placas fabricadas mesmo apresentando 4,3% de discordância apresentaram-se validadas, apropriadas para medir o verdadeiro valor daquilo que foi medido com a capacidade de produzir valores muito próximos aos obtidos num ensaio de referência.

**Figura 14. Validação do ELISA**

(A) ELISA padronizado com 25ng/poço de proteína recombinante-antígeno quimérico, testado com 186 amostras, destas 138 eram negativas e 48 positivas, podemos observar destacadas em vermelho as amostras discrepantes. (B) ELISA HCV Kit de referência no mercado, testado com 186 amostras, destas 138 eram negativas e 48 positivas, podemos observar que não houve resultados discrepantes.

Cálculo da Validade:

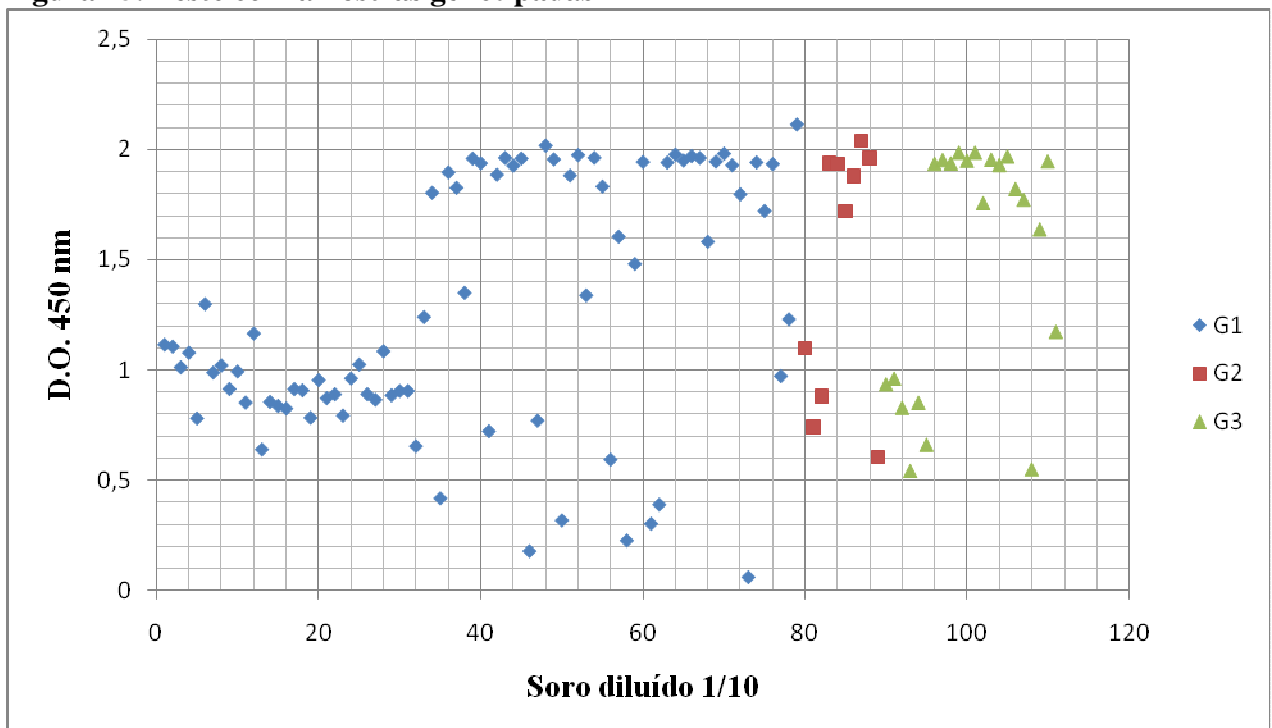
$$\text{Validade: } \frac{\text{Número de resultados corretos} = 178}{\text{Número total de resultados} = 186} \times 100$$

$$\text{Validade} = 95,69\%$$

### **5.7. Análise das amostras HCV positivas genotipadas**

Realizou-se testes com 79 amostras genotipadas com genótipos 1, 2 e 3 para o vírus HCV, e verificou-se afinidade e ligação dos anticorpos anti-HCV nas microplacas sensibilizadas com a proteína recombinante-antígeno quimérica.

Podemos observar que, houve maior prevalência de portadores do vírus HCV genótipo 1, destes 7 (8,9%) amostras dentre as 79 apresentaram-se com valores abaixo 0,5 de DO, sendo estas consideradas discordantes. As amostras com genótipo 2 e 3 apresentaram-se em menor prevalência, porém todas com resultados satisfatórios, DOs acima de 0,5. Assim observamos que, das amostras genotipadas com genótipo 1, 2 e 3 apenas 8,9% das amostras caracterizadas com genótipos 1 apresentaram-se resultados não satisfatórios, não apresentou anticorpos anti-HCV com afinidade e ligação com a proteína recombinante-antígeno quimérica (Figura 15).

**Figura 15. Teste com amostras genotipadas**

Amostras genotipadas G1 azul = genótipo 1, G2 marron = genótipo 2, G3 verde = genótipo 3. Amostras G1 apresentou-se 8,9 % de amostras discrepantes, com D.O. abaixo 0,5.

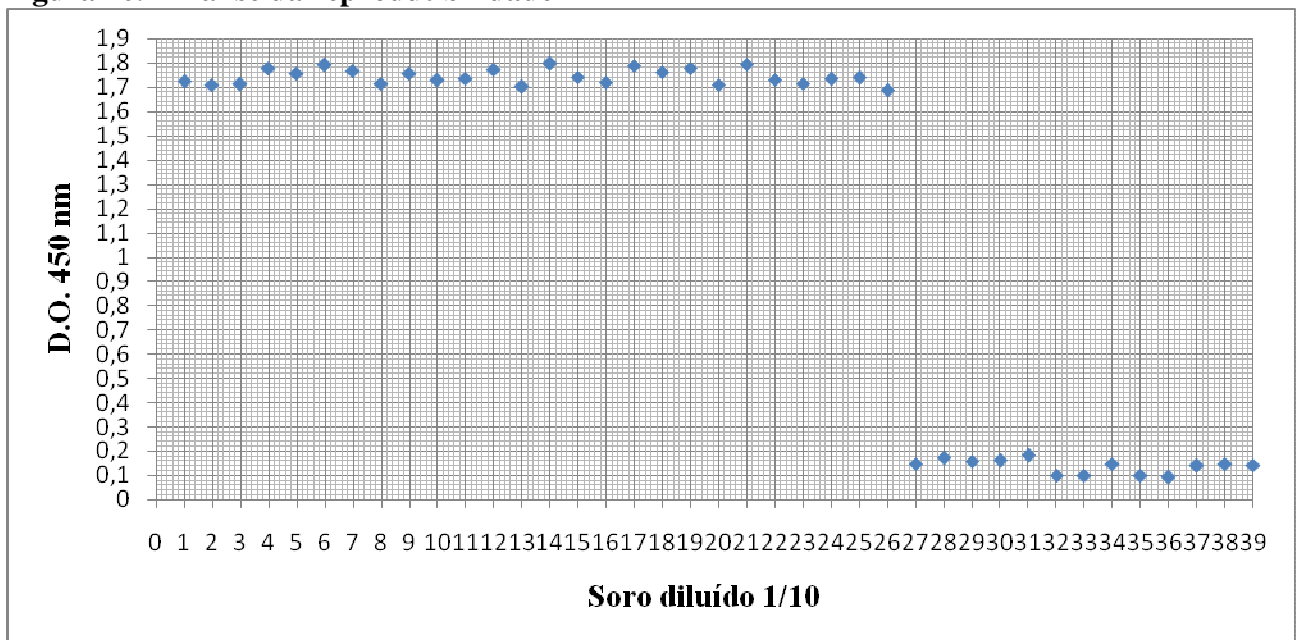
### **5.8.Reprodutibilidade**

A análise da reprodutibilidade foi feita com 26 amostras positivas e 13 amostras negativas, os resultados foram plotados no gráfico abaixo e avaliou-se em porcentagem a reprodutibilidade obtida no teste com o cálculo demonstrado na expressão abaixo.

De acordo com os resultados (Figura 16) observamos que, as DOs tanto da amostras positivas como das amostra negativas apresentaram-se com valores muito próximos entre si, sendo que, as amostras positivas permaneceram na faixa de 1,7 a 1,79 de DOs e as amostras negativas de 0,1 a 0,2 de DOs, assim, de acordo com o cálculo feito houve 100% de reprodutibilidade no ensaio.



**Figura 16. Análise da reprodutibilidade**



A análise de reprodutibilidade foi feita o ELISA com 26 amostras positivas e 13 amostras negativas e plotadas no gráfico. Podemos observar que as amostras positivas permaneceram com DOs de 1,7 a 1,79 e as amostras negativas com DOs de 0,1 a 0,2.

Cálculo de reprodutibilidade foi feito pela expressão:

$$\text{Reprodutibilidade (\%)} = \frac{\text{Número de resultados concordantes} = 39}{\text{Número total de resultados} = 39} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Número total de resultados} = 39$$

$$\text{Reprodutibilidade (\%)} = 100\%$$

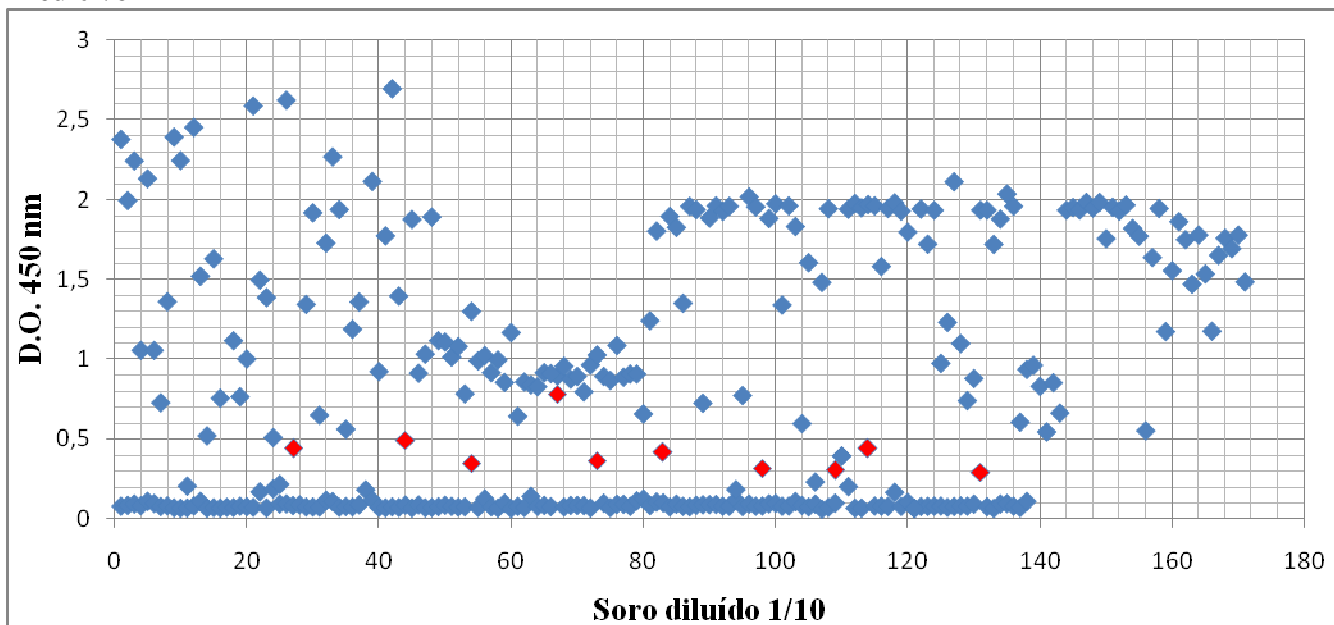
### **5.9. Avaliação da Sensibilidade, Especificidade e Valor Preditivo**

Realizou-se a análise da sensibilidade, especificidade e valores preditivos com 309 amostras, destas 138 negativas e 171 positivas.

De acordo com os resultados apresentados (Figura 17) podemos observar que, das 309 amostras testadas, em vermelho, destacou-se 10 (3,23%) amostras caracterizadas no ensaio como discordantes, destas, 10 apresentaram-se Falso negativo e 1 apresentou-se como Falso positivo.

Em relação à sensibilidade e especificidade do teste fez-se os cálculos e observamos que, o ELISA padronizado apresentou-se 94,5% sensível e 99,3% específico. Foi possível caracterizar que 99,4% das amostras definidas como positivas foram verdadeiramente positivas e 93,2% das amostras negativas foram verdadeiramente negativas.

**Figura 17. ELISA para a Análise da Sensibilidade, Especificidade e Valor Preditivo**



Para os cálculos da análise da sensibilidade, especificidade e valores preditivos fez-se ELISA com 309 amostras, destas 138 negativas e 171 positivas. Os resultados apresentados no gráfico mostram que, das 309 testadas, em vermelho destacou-se 10 (3,23%) amostras discrepantes caracterizadas no como Falso positivo e Falso Negativo.

O cálculo do Valor Preditivo para amostras positivas foi feito pela expressão:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Amostra Positiva} = 171}{\text{Amostra Positiva} + \text{Amostra Falso Positiva} = 172} \times 100 =$$

$$\text{VPP} = 99,4\%$$

O cálculo do Valor Preditivo para amostras negativas foi feito pela expressão:

$$\text{VPN} = \frac{\text{Amostra Negativa} = 138}{\text{Amostra Negativa} + \text{Amostra Falso Negativa} = 148} \times 100 =$$

$$\text{VPN} = 93,2 \%$$

O cálculo da Sensibilidade foi feito pela expressão:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Amostras Verdadeiras Positiva} = 171}{\text{Amostras Verdadeiras Positiva} + \text{Amostra F N} = 181} \times 100 =$$

$$\text{Sensibilidade} = 94,5\%$$

O cálculo da Especificidade foi feito pela expressão:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Amostra Verdadeiras Negativa} = 138}{\text{Amostra Verdadeiras Negativa} + \text{Amostra F P} = 139} \times 100 =$$

$$\text{Especificidade} = 99,3\%$$

### **5.10. Comparação da Sensibilidade e Especificidade com kits de referência no Mercado**

Os resultados de sensibilidade e especificidade obtidos nesta pesquisa foram comparados com sensibilidades e especificidades de 04 kits de referências disponíveis no mercado.

Podemos observar que, a placa fabricada com proteína quimérica apresentou-se com 94,5% de sensibilidade e 99,3% de especificidade, já os dados levantados de bulas dos fabricantes dos kits referências disponíveis no mercado apresentaram-se com sensibilidade de 99,5 a 100% e especificidade de 99,5 a 99,7% (Tabela 6).

Assim os resultados obtidos na placa fabricada foram possíveis observar que, a especificidade possui valores próximos aos de mercado já a sensibilidade, está relativamente baixa quando comparados aos valores das sensibilidades dos kits referências do mercado.

**Tabela 6. Análise da Sensibilidade e Especificidade**

	<b>KIT01</b>	<b>KIT02</b>	<b>KIT03</b>	<b>KIT04</b>	<b>QUIMÉRICA</b>
<b>SENSIBILIDADE %</b>	100	99,5	99,9	100	94,5
<b>ESPECIFICIDADE %</b>	99,5	99,6	99,8	99,7	99,3

Valores de sensibilidade e especificidade obtidos nas bulas dos fabricantes de kits de HCV referência no mercado comparados com o ELISA padronizado com proteína recombinante-antígenos quimérico.

## 6. DISCUSSÃO

Como não há trabalhos de comparação para o nosso ELISA qualitativo para detecção de anticorpos anti-HCV com uso de proteína recombinante quimérica FAPON, partimos de valores na padronização (tipo de bloqueio, diluição dos soros, concentração do antígeno) citados pelo fornecedor FAPON e da dissertação desenvolvida pelo autor SILVA e OLIVEIRA, (2007) que utiliza proteína multiepítipo para o desenvolvimento do ELISA *in house*.

Obtivemos a partir dos ensaios de padronização do ELISA com proteínas recombinantes um protocolo capaz de ter um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) com boa resolução.

De acordo com a (Figura 10), das amostras utilizadas na padronização observou-se que, houve o mesmo padrão das amostras de soro negativo, apresentando baixa reatividade e as amostras soro positivos para HCV, apresentando alta reatividade com as concentrações de 25, 50 e 100 ng/poço de proteínas recombinantes quimérica, mas, a concentração da proteína de 25ng/poço apresentou-se com DO de 0,02 mais baixas do que as concentrações de 50 e 100 ng/poço, porém diferença não é considerada significativa. A concentração 25ng/poço permite teoricamente, a fabricação de aproximadamente 400 placas totalizando 38 mil testes com a quantidade de 1mg/mL de proteína fornecida, assim esta concentração é uma ótima candidata a fabricar microplacas com baixo custo e relativamente mais rentável.

Dipti e colaboradores (2006) relataram que, o uso de proteína multiepítipo leva a uma considerável redução nos custos de produção dos kits de detecção do HCV, recentemente, expressaram com sucesso uma proteína multiepítipo consistindo de vários epítipos imunodominantes lineares de proteínas estruturais e não-estruturais do principal sorotipo HCV presente na Índia. O gene sintético foi expresso com sucesso em *E. coli* e a proteína recombinante purificada foi eficientemente testada em um kit de diagnóstico para hepatite C.

A escolha do melhor bloqueio para diminuir as reações inespecíficas e a diluição dos soros foram os principais fatores analisados (Figura 11). Os testes de diluição demonstraram que, a diluição 1/10 seria a mais indicada, de acordo com levantamento

das bulas de quatro marcas de fabricantes de kits para Hepatite C, sendo que três destes fabricantes utilizam a diluição 1/10. A solução bloqueio com leite em pó 10% apresentou diferença de 0,04 DO quando comparado ao teste utilizando BSA 10%. O leite foi escolhido como melhor solução para o bloqueio, por apresentar preço mais baixo do que BSA e não haver diferenças significativas entre as duas soluções testadas.

Estudos realizados para desenvolvimento do método de ELISA qualitativo para detecção e titulação de anticorpos de camundongos antigamaglobulina bovina (GGB) demonstraram que, o uso de leite em pó desnatado na concentração de 10% é um excelente bloqueio das microplacas de poliestireno (MONTASSIER, 2015).

As microplacas foram fabricadas utilizando os critérios de análise do processo produtivo e teste de homogeneidade da fabricação do lote das microplacas de ELISA, critérios estes adotados por empresas que fabricam microplacas para ELISA. As análises do processo produtivo da sensibilização (Tabela 2) e bloqueio (Tabela 3) das microplacas apresentaram-se com eficiência de 100%, sendo este resultado satisfatório. O teste de homogeneidade do lote foi conferido pelo coeficiente de variação até 20%, a amostra soro positivo apresentou CV: 0,9% (Tabela 4) e a amostra soro negativo apresentou CV: 3,18% (Tabela 5) assim, apresentaram-se com resultados satisfatórios.

Várias indústrias adotam o teste de homogeneidade, pois este garante a certificação do lote produzido, como no caso silício metálico, possui quatro etapas para obtenção de materiais de referência sólidos, consistem em preparar o material na granulometria desejada, distribuí-lo em frascos e verificar se a homogeneidade do material nos frascos é confirmada, e, como consequência, obter a certeza de homogeneidade do lote preparado. (VAN DER VEEN, et al., 2001). O planejamento do experimento para verificar a homogeneidade de um lote de material preparado para fins de certificação deve indicar as variabilidades devido a amostras dentro de frascos e as variabilidades de amostras entre os frascos que contêm os materiais que compõem o lote, devidamente envasados (LINSINGER, et al., 2001).

Trabalhos com anticorpos monoclonais são de alto custo (ZORZETTO, 2014), o conjugado utilizado nos kits de ELISA consiste no reagente que mais encarece o kit devido utilizar anticorpos monoclonais, assim quanto menor a alíquota utilizada, menor será os custos, baseados nestas informações foram feitos testes com o conjugado de acordo com as diluições indicadas pelo fabricante e definiu-se que, a diluição 1/15.000 do conjugado (Figura 12) apresentaram DOs das amostras positivas satisfatórias, com



intervalos entre 1,2 a 3,0, desta forma houve uma distância de 0,8 de DO das amostras negativas para positivas, isto favoreceu uma zona de indeterminados, com melhor distribuição entre as amostras sorológicas positivas e negativas.

Para avaliarmos se os sítios de exposição aumentariam, realizamos a sensibilização da microplaca com a junção das proteínas quiméricas e individuais NS3 e Core, e então testou-se as amostras positivas e negativas e observou-se que, em duas amostras positivo 4 e 6 houve menor exposição dos sítios de reconhecimento e ligação assim diminuindo o reconhecimento e ligação dos anticorpos anti-HCV presentes nas amostras positivas (Figura 13). SILVA e OLIVEIRA, (2007) relatou em seu trabalho que, a concentração da proteína multiepítipo-MEHCV utilizada foi aumentando de um ensaio para o outro, isto, possivelmente, demonstra que, quanto mais pura estiver a proteína, maior será a concentração da mesma a ser utilizada para sensibilização de microplacas. Assim, podemos sugerir que, a concentração de 25ng/poço das proteínas individuais foram consideradas baixas visto que, o grau de pureza da proteína Core é 95% e NS3 é de 98%.

A distribuição dos genótipos e subtipos do HCV apresenta significativa variação geográfica e na frequência em que são observados. Assim, os genótipos 1, 2 e 3 distribuem-se pelo mundo (ZIEN, 2000). O trabalho mais recente sobre genótipos analisou 1.688 pacientes de diversas regiões geográficas do Brasil. O genótipo 1 foi encontrado em 64,9% dos paciente; genótipo 2 em 4,6%; genótipo 3 em 30,2%; genótipo 4 em 0,2% e genótipo 5 em 0,1% (CAMPIOTTO et al., 2005).

Podemos observar em nosso estudo que, o ELISA feito com 79 amostras de HCV positivas genotipadas (Figura 15) com genótipo 1, 2 e 3, houve maior prevalência das amostras com genótipo 1, destas encontramos 8,9% das amostras positivas caracterizadas com genótipo 1 discordantes, com DOs abaixo de 0,5.

Além dos genótipos caracterizados de 1 a 6, temos mais de 100 subtipos que foram identificados e são classificados através de letras minúsculas do alfabeto por exemplo 1a. Os genótipos podem diferir de 30 a 35% entre suas sequências nucleotídicas, enquanto que entre os subtipos essas diferenças podem variar de 15 a 20% (SIMMONDS et al., 1994). De acordo com os resultados encontrados, podemos sugerir que as amostras discordantes podem pertencer ao subtipo no qual, os anticorpos anti-HCV não reconheceram as estruturas da proteína quimérica utilizada em nosso estudo.

Apresentando uma fácil automação, rapidez no processamento, alta confiabilidade e custo relativamente baixo (BRANDÃO et al., 2001), o ELISA é o teste de triagem para detecção de anticorpos contra o HCV mais utilizado (CARITHERS et al., 2000). Apesar do ELISA ser um ótimo teste de triagem e o RIBA apresentar uma maior especificidade, estes ensaios para detecção de anticorpos possuem limitações (MARCELLIN, 1999; SILVA; ROSSETTI, 2001). Indivíduos imunocomprometidos, como renais crônicos e portadores de HIV, podem ter infecção crônica sem expressar anticorpos em concentrações detectáveis, gerando resultados falso-negativos. Resultados assim também ocorrem em recém-nascidos infectados durante a gestação, visto que estes podem apresentar soroconversão tardia; e em indivíduos que estão no período de janela imunológica (LHP, 2005), pois o tempo de incubação médio do vírus para o aparecimento de anticorpos anti-HCV ocorre entre 7 e 8 semanas, podendo essa faixa variar entre 2 e 26 semanas (DI BISCEGLIE, 1998; MARCELLIN, 1999; SILVA; ROSSETTI, 2001). Portanto, esses indivíduos devem ser avaliados por testes qualitativos detectores de RNA viral (WONG; LEE, 2006).

O presente estudo apresentou ELISA com validade 95,69% (Figura 14), reprodutibilidade 100% (Figura 16), sensibilidade 94,5% e especificidade 99,3% (Figura 17), superior aos ensaios realizados com a proteína multiepitopo MEHCV SILVA e OLIVEIRA, (2007) apresentaram uma sensibilidade (92,86%) e especificidade (82,89%).

Um estudo de Houghton e colaboradores (2002), utilizando as proteínas multiepitótopo TbF6 e TbF6-DPEP para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium tuberculosis*, obtiveram sensibilidade de 78,1% e especificidade de 53,8% para a proteína TbF6, e de 85,7% e 64,1% para a TbF6-DPED, respectivamente.

Baseados nos trabalhos descritos sugerem que, o ELISA padronizado com a proteína quimérica possui valores de sensibilidade e especificidade satisfatórios e próximos aos kits de referência disponíveis no mercado (Tabela 6).

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O ELISA desenvolvido demonstra ser uma técnica sorológica qualitativa com boa capacidade de detecção de anticorpos anti-HCV, com reatividades em soros de pacientes com infecção viral confirmada pela técnica de biologia molecular. Desse modo, nosso protocolo desenvolvido complementa o diagnóstico qualitativo para Hepatite C em laboratórios clínicos.

A técnica sorológica qualitativa demonstra uma melhor detecção de anticorpos anti-HCV séricos com ótima reatividade na soroteca testada. No entanto seria interessante um número maior de ensaios para que a sensibilidade deste método seja mais próximo possível dos valores de referência dos kits de mercado.

## 9.REFERÊNCIAS

ALTER, M. J., et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. **N Engl J Med.**, v. 62, p.341:556, 1999.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol.**, v. 13, p.2436-41, 2007.

AMORIM, R. M. S.; et al. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99(8), p.895-897, 2004.

ANZOLA, M.; BURGOS, J. J. Hepatocelular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C vírus and p53 in hepatocarcinogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, p.1-16, 2003.

ARAÚJO, A. R. et al. Characterization of hepatitis C virus in chronic hepatitis patients: genotypes in the State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 44, n.5, p.638-640, 2011

BARRERA, J. M.; et al. Improved detection of anti-VHC in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. **Vox Sang**, v. 68(1), p. 15–18, 1995.

BARTENSCHLAGER, R.; AHLBORN, L. L.; MOUS, J.; JACOBSEN, H. Non-structural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. **J Virol**, v. 67(7), p.3835-3844, 1993.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **J Gen Virol**, v. 81(7), p. 1631-1648, 2000.

BARTENSCHLAGER, R.; COSSET, F.-L.; LOHMANN, V. Hepatitis C virus replication cycle. **Journal of hepatology**, v. 53 (3), p. 583-5, 2010.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Infectious hepatitis C pseudo particles containing functional E1 e E2 envelope protein complexes. **J Exp Med**, v. 197, p. 633-642, 2003.

BARTOSCH, B; et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, (43), p. 41624-30, 2003.

BASSIT, L.; et. al. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: Rare subtype found. **Hepatology**, v. 29, p. 994-995, 1999.

BEHRENS, S. E.; TOMEI, L.; DEFRANCESCO, R. Identification and properties of the RNAdependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 15, p. 12-22, 1996.

BENENSON, A. S; Control of communicable diseases in man, Ed.16, Washington (DC): American Public Health Association; **Viral hepatitis**; p.217-33, 1995.

BENVEGNO, L.; et al. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus related cirrhosis. **Hepatology**, v. 25, p.211-215, 1997.

Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais no Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>, Acesso: 04/02/2012 às 13h.

Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais no Brasil, 2015. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>, Acesso: 04/04/2016 às 15h

BRANDÃO, A. B. M.; et al. Diagnóstico da Hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Rev Pan Sal Pub**, v.9(3), p.161-8, 2001.

BRUNO, S.; et al. Sustained virological response to interferon  $\alpha$  is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study. **Hepatology**, v.45, p.579-87, 2007.

CAMPIOTTO, S.; et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 38(1), p. 41-49, 2005.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J. M. Virology of hepatitis C virus infection. Best practice & research. **Clinical gastroenterology**, v. 26 (4), p. 381-9, 2012.

CHISARI, F. V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. **J Clin Invest**, v.100, p. S19-S24, 1997.

CHOO, Q. L.; et al. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis. **Science**, v. 244(4902), p. 359–369, 1989.

CHUTAPUTTI, A. Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.15 (1), p.E156-E163, 2000.

CONITEC- Ministério da Saúde. Relatório: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções, 2015.

COSTI, C. Desenvolvimento de um método molecular colorimétrico para detecção e genotipagem do vírus da Hepatite C. **Dissertação de mestrado**, Porto Alegre, 2008.

DIPTI, C.A.; JAIN, S. K., NAVIN, K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Prot Expr Purif**, v. 47(1), p. 319-328, 2006.

ENOMOTO, N.; et al. Mutations in the nonstructural protein 5a gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N Engl J Med**, v. 334(2), p. 7-81, 1996.

EVANS, M.; HAHN, T. VON; TSCHERNE, D. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, (7137), p. 801-5, 2007.

FÉRAY, C.; et. al. European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 117, p. 619-625, 1999.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Bras Epidemiol**; v.7(4), p. 473-487, 2004.

FOCACCIA, R.; e. al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, p.269-284, 1998.

GALE, M. J.; et al. Control of PKR protein Kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of Kinase regulation. **Mol Cell Biol**, v.18(9), p. 5208-5218, 1998.

GAYOTTO, L. C. C., Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, v. 19, p.137-140, 2000.

GRAKOU, A.; et al. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. **J Virol**, v. 67(5), p. 2832-2843, 1993.

GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**, v. 26(3 Suppl 1), p.43S-47S, 1997.

GUZ, B.; et. al. Spontaneous disappearance of serum HCV-RNA in chronic hepatitis. **Hepatology**, v. 30, p.203A, 1999.

HOOFNAGLE, J. H., et. al. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. **New England Journal of Medicine**, v.315, p.1575- 1578, 1986.

HOUGHTON, R. L., et. al. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9 (4), p.883-91, 2002.

JARVIS, S. M.; THORN, J. A.; GLUE, P. Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosinesensitive (es)-nucleoside transporters. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p.1587-1592, 1998.

JOO, M.; HAHN, Y. S. Animal models for immune defects caused by hepatitis C virus. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p.167-177, 2000.

KATO, N., et. al. Activation of intracellular signaling by Hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. **Hepatology**, v. 32, p.405-412, 2000.

KENNY-WALSH, E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 1228-1233, 1999.

KIM, C. W.; CHANG, K. M. Hepatitis C virus: virology and life cycle. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19 (1), p. 17-25, 2013.

KIYOSAWA, K., et. al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 12, p.671-675, 1990.

KOUTSOUDAKIS, G. et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. **Journal of virology**, v. 80(11), p. 5308, 2006.

KUO, G.; et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, 244(4902), p.362–364, 1989.

LAI, M. M.; WARE, C. F. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 242, p.117-134, 2000.

LAM, N. P.; et. al. Dose- dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. **Hepatology**, v. 26, p.226-231, 1997.

LAUER G.; WALKER B. Hepatitis C virus infection. **N Eng J Med**, v.345, p.41-51, 2001.

LERAT, H.; et. al. Inchauspe G. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in haematopoietic cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p.845-851, 1996.

LEVI, J. E.; et. al. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2645-2647, 2002.

LINSINGER, T.; et. al. *Accreditation and Quality Assurance*. v., 6 (20), **2001**.

LOHMANN, V.; KORNER, F.; HERIAN, U.; BARTENSCHLAGER, R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. **J Virol**, v. 71(11), p.8416-8428, 1997.

LUPBERGER, J. et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. **Nature medicine**, v. 17(5), p. 589-95, 2011.

MARCELLIN P. Hepatitis C: clinical spectrum of the disease. **Journal of Hepatology**, v.31 (1), p.9-16, 1999.

MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**, v.36, p. S47-S56, 2002.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Artigo de revisão da Universidade do Sul de Santa Catarina**, 2011.

MCOMISH, F.; et. al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors an international collaborative survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32 (4), p. 884-892, 1994.

MENDES-CORREA, M. C.; et. al. Genotypic distribution of hepatitis C and HIV co-infected patients in Brazil. **International Journal of STD & AIDS**, v.19, p. 595-599, 2008.

Mesquita, F. XVII Congresso Médico Amazônico. Apresentação. Belém-PA, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hepatites Virais: O Brasil está atento. Série B Textos Básicos de Saúde, Brasília: 2 Ed, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hepatites Virais: Desafios para o período de 2011 a 2012. Brasília, 2010.

MISSALE G; et.al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection associated with diferent vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p.706-714, 1998.

MONAZAHIAN, M. et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. **Journal of medical virology**, v. 57 (3), p. 223-9, 1999.

MONTASSIER, H. J. Práticas laboratoriais em imunologia básica e aplicada. **UNESP Jaboticabal**, 2015.

NAINAN, O. V.; et. al. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. **Gastroenterology**, v. 131 (2), p. 478-484, 2006.

National Institutes of Health. Management of Hepatitis. **NIH Consensus Statement Online**, p. 24-26, 1997.

NGUYEN, M. H.; KEEFE, E. B. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3 (2), p. 97-101, 2005.

PAVLOVIC, D.; et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100 (10), p. 6104-6108, 2003.



PESSIONE, F., et. al. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 27, p.1717-1722, 1998.

PERZ, J. F.; et. al.. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. In: 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. **Abstract Boston**, 2004.

PILERI, P.; et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science, New York**, v. 282, n. 5390, p. 938, 1998.

PLOSS, A. et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, v. 457 (7231), p. 882-6, 2009.

PREMKUMAR, A.; WILSON, L.; EWART, G. D.; GAGE, P. W. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. **FEBS Lett**, v. 557(1), p. 99-103, 2004.

RICHTER, E. et. al. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. **Journal of clinical microbiology**, v.41, n.6, p.2672 - 2675, 2003.

REIS, M. M. Testes imunológicos. Manual ilustrado para profissionais da saúde. Porto Alegre (RS): AGE Editora; 1998.

RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. Retirado do site: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm), 23/05/2014 as 16:43h.

SAEZ-ALQUEZAR, A.; BASSIT, L.; SABINO, E. C. Hepatites virais. In: FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara; p. 74-91, 2001.

SAKAI, A.; et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100(20), p. 11646- 11651, 2003.

SANTOS, J. C. Proteína multiepitopo recombinante para o desenvolvimento de kit de diagnóstico para Hepatite C. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. p.63, 2011.

SBH. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. **GED**, v. 18, p.53-58, 1999.

SCHEEL, T. K. H.; RICE, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. **Nature medicine**, v. 19, (7), p. 837-49, 2013.

SCHIFF, E. R.; MEDINA, M.; KAHN, R. S. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. **Seminars in Liver Diseases**, v. 19(suppl.1), p.3-15, 1999.

SCHWIMMER, J. B.; BALISTRERI, W. F. Transmission, natural history, and treatment of hepatitis C virus infection in the pediatric population. **Seminars in Liver Diseases**, v. 20, p.37-46, 2000.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis.**, v.5, p.558-67, 2005

SILVA e OLIVEIRA, M. Z. Padronização de um Ensaio Imunoenzimático (Elisa) utilizando uma proteína multiepítipo recombinante para produção de kit para diagnóstico da Hepatite C. **Dissertação de Mestrado da Universidade Católica de Goiás**, 2007.

SIMMONDS, P., Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **J Gen Virol**, v.74, p.661-8. 1993

SORIANO, V., et al. Hepatitis C and HIV infection: biological, clinical and therapeutic implications. **Journal of Hepatology**, v. 31 (suppl. 1), p.119-123, 1999.

STRADER, D. B.; WRIGHT, T.; THOMAS, D. L.; SEEF, L.B. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. **Hepatology**, v.4, p.1147-71 2004.

STRAUSS, E. HEPATITE C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34(1), p.69-82, 2001.

TOMEI, L.; et al. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. **J Virol**, v. 67(7), p. 4017-4026, 1993.

TRIYATNI, M.; et al. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. **J Virol**, v. 76 (18), p. 9335-9344, 2002.

UYTTENDAELE, S.; et al. Evaluation of thirdgeneration screening and confirmatory as- says for HCV antibodies. **Vox Sang**, v. 66(2), p. 122–129, 1994.

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T.; PAUWELS, J.; *Accreditation and Quality Assurance*, v.6 (26), 2001.

YEN, T.; KEEFFE, E. B.; AHMED, A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. **J Clin Gastroenterol.**, v. 36, p.47-53, 2003.

WASLEY, A.; ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis.**, v.20, p.1-16, 2000.

WONG, T.; LEE, S. S. Hepatitis C: a review for primary care physicans. **CMAJ**, v.174 (5), p.649-59, 2006.

ZAMPIERON, A.; et al. European study on epidemiology and the management of HCV in the haemodialysis population--Part 1: centre policy. **EDTNA ERCA J.**, v. 30, p. 84-90, 2004.

ZEIN, N. N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin Microbiol**, v. 13(2), p. 223-235, 2000.

ZEISEL, M. B. et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. **Hepatology, Baltimore**, v. 46 (6), p. 1722-31, 2007.

ZORZETTO, R. A construção de um medicamento: Anticorpos contra tumor de ovário desenvolvidos por instituições de pesquisa e empresa nacionais estão prontos para ser testados em humanos, **REVISTA FAPESP**, v. 223, 2014.