



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)
UTILIZANDO UMA PROTEÍNA MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE PARA
PRODUÇÃO DE KIT PARA DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C**

Marcelo Zanini de Oliveira e Silva

Goiânia – Goiás
Julho de 2007



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde



**MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE**

**PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)
UTILIZANDO UMA PROTEÍNA MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE PARA
PRODUÇÃO DE KIT PARA DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C**

Marcelo Zanini de Oliveira e Silva

Orientadora: Prof^ª. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Pesquisa em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Goiânia – Goiás

Julho de 2007

*“A morte do homem começa no instante
em que ele desiste de aprender.”*

Albino Teixeira

DEDICATÓRIA

Aos meus pais *Joaquim e Darcy*, meus grandes incentivadores, que sempre estiveram ao meu lado nas fases de minha vida. Obrigado pela educação – peça fundamental na construção do meu caráter – e por tudo que fizeram pela minha pessoa.

Ao meu irmão *Fernando*, pelo companheirismo e pela amizade.

À minha namorada *Lauandda*, pelo amor, paciência e incentivo durante essa árdua, porém gratificante caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora *Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer*, do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, pelos ensinamentos passados, atenção, dedicação, amizade, espírito de luta e perseverança; além da valiosa orientação.

Ao Professor Doutor *Fernando Araripe Gonçalves Torres*, do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, pela co-orientação prestada, apoio, confiança e incentivo.

À amiga *Marielle de Oliveira Castro*, pela amizade, companheirismo, apoio e compreensão durante toda etapa da pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, *Alexsandro Galdino, Andrelisse Arruda, Ângela Souza da Fonseca Ramos, Carolina Brêttas, Davi Loures, Janice de Marco, Juliana Amorim, Karen Rapp, Pollyanna Pfrimer, Saulo Siqueira e Viviane Castelo*, pela paciência, esclarecimento e colaboração; essenciais na parte experimental do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular, *Josefa Ivonildes Santos e Maria de Fátima Lopes*, pela presteza e paciência.

Aos meus pais, *Darcy de Fátima e Joaquim Augusto*, pelo incentivo, otimismo e ajuda financeira na minha viagem à Brasília.

Ao meu primo *Lédison Zanine*, pela hospedagem, disponibilidade, amizade e companheirismo durante todo período de trabalho em Brasília.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, *Artur Bartasson, Bibiana Kumner, Bruna Jorge, Camila Gonçalves, Ciro de Souza, Danuza de Sousa, Felipe Maia, Fernanda Bastos, Maria Clara Bizinoto e Natália Alberto*, pela colaboração, incentivo e amizade.

Aos funcionários *Camila Barbosa e Carlos Lopes*, do Departamento de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Saúde, por toda ajuda prestada.

RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV), descrito em 1989, pertence ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae* e possui um RNA genômico contendo aproximadamente 9.600 nucleotídeos. Devido à sua alta variabilidade genética foi classificado em genótipos (1-6) e subtipos (a, b, c etc.). Os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3a, têm distribuição cosmopolita; enquanto que no Brasil, os genótipos 1 e 3 são os mais prevalentes. O período de incubação para hepatite C aguda varia em torno de 6 a 10 semanas e aproximadamente 80% das infecções agudas são assintomáticas. Entre 10 e 20 anos, cerca de 20% das infecções crônicas evoluem para cirrose e estas podem evoluir para óbito devido a complicações. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 3% da população mundial, cerca de 180 milhões de indivíduos, está infectada pelo HCV. A hepatite C pode ser diagnosticada laboratorialmente por meio de testes sorológicos e por meio de análises baseadas em técnicas de biologia molecular. O ensaio mais comumente utilizado para detecção de anticorpos anti-HCV é o ELISA. Esse teste consiste de antígenos virais que são fixados nas cavidades de uma placa de microtitulação. Anticorpos específicos contra esses antígenos irão se aderir à placa e serão detectados por anticorpos anti-imunoglobulina humana contendo marcadores colorimétricos. Esse estudo tem como objetivo a confecção de um ELISA utilizando uma proteína multiepitopo (MEHCV). As amostras utilizadas nos ensaios vieram de bancos de sangue. Foram realizados testes com MEHCV purificada em resina e em coluna de níquel (dessalinizada e não-dessalinizada). Os testes consistiam em padronizar a concentração da proteína por cavidade e as diluições dos soros; avaliar reações inespecíficas através de testes com soros positivos para outras infecções (anti-HBV e HAV positivos) e com soros negativos; e comparar o ELISA *in house* com um ELISA comercial. De acordo com os resultados dos testes de padronização, quanto maior o grau de pureza da proteína, maior foi a concentração de proteína necessária na sensibilização das microplacas para avaliar possíveis reações cruzadas. Os testes para avaliar reações inespecíficas utilizando a proteína purificada em coluna

apresentaram sensibilidade (92,86%) e especificidade (82,89%) superior aos realizados com a proteína purificada em coluna (Sensibilidade = 80%; Especificidade = 47,5%). Ao contrário do ELISA *in house*, o ELISA comercial apresentou somente um resultado falso-positivo para a amostra 5 (anti-HBV positiva). Para avaliar a interferência de outras proteínas, foi realizado ainda, um ensaio utilizando microplacas sensibilizadas com proteínas inespecíficas. Esses resultados sugerem que a proteína MEHCV ainda não possui o grau de pureza ideal para ser utilizada como antígeno e que possivelmente, as reações falso-positivas ocorridas foram causadas por proteínas inespecíficas presente junto à proteína recombinante MEHCV.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV), described in 1989, belongs to the *Hepacivirus* genus and the *Flaviviridae* family and possess a genomic RNA content 9,600 nucleotides approximately. Due to its high genetic variability was classified in genotypes (1-6) and subtypes (a, b, c etc.). The genotypes 1a, 1b, 2a, 2b and 3a, have cosmopolitan distribution; whereas in Brazil, genotypes 1 and 3 are the most prevalent. The incubation period for acute hepatitis C varies around 6 to 10 weeks and approximately 80% of the acute infections are asymptomatic. Between 10 and 20 years, about 20% of the chronic infections evolve for cirrhosis and these can evolve for death due to complications. In accordance with the World Organization of Health, 3% of the world-wide population (about 180 million individuals) is infected for the HCV. Hepatitis C can be diagnosed by means of serological tests and analyses-based techniques of Molecular Biology. The assay more commonly used for detection of antibodies anti-HCV is ELISA. This test consists of antigens fixed in the wells of a microtiter plate. Specific antibodies against these antigens will adhere to the plate and will be detected by antibodies anti-human immunoglobulin colorimetric markers. This study aims the confection of ELISA using a multi-epitope protein (MEHCV). The samples used in the assays are from blood banks. Tests with nickel resin-purified MEHCV and column-purified MEHCV (desalting and non-desalting) had been carried through. The tests aimed standardize the concentration of the protein for well and the dilutions of the serum; to evaluate unspecific reactions through tests with positive serum for other infections (positive anti-HBV and HAV) and with negative serum; and to compare ELISA in house with commercial ELISA. In accordance with the standardization results tests, how much bigger the protein pureness degree biggest was the protein concentration necessary in the microplates sensitization to evaluate possible crossed-reactions. The tests to evaluate unspecific reactions using the resin-purified MEHCV had presented higher sensitivity (92.86%) and specificity (82.89%) than the column-purified MEHCV (Sensitivity = 80%; Specificity = 47.5%). In contrast of ELISA in house, commercial ELISA only presented a

result false-positive for sample 5 (anti-HBV positive). To evaluate the interference of other proteins, it was carried through, an assay using microplates sensitized with unspecific proteins. These results suggest that MEHCV protein don't possess yet the ideal pureness degree to be used as antigen and that possibly, the false-positive reactions occurred had been caused by unspecific proteins present with the recombinant protein MEHCV.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

b-DNA	<i>Branched DNA</i>
cDNA	DNA Complementar
E1	Proteína Estrutural do Envelope 1
E2	Proteína Estrutural do Envelope 2
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HAV	Vírus da Hepatite A
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HBV	Vírus da Hepatite B
IFN	Interferon
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> ou Sítio de Entrada Interno do Ribossomo
MEHCV	Proteína Multiepítipo do HCV
NS	Proteínas não-estruturais
NS2	Proteína não estrutural 2
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4a	Proteína não estrutural 4a
NS4b	Proteína não estrutural 4b
NS5a	Proteína não estrutural 5a
NS5b	Proteína não estrutural 5b
NTPase	Nucleotidetrifosfatase
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ou Fragmento de Leitura Aberta
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIBA	<i>Recombinant Immunoblot Assay</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
TMA	<i>Transcription-Mediated Amplification</i>
Tris-HCl	Trizma base ajustado com ácido clorídrico

UI

Unidades Internacionais

UTR

Untranslated Regions ou Regiões não

traduzidas

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Siglas e Abreviaturas

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da hepatite C.....	01
1.2 Diagnóstico Laboratorial.....	06
1.2.1 <i>Enzyme Linked Immnosorbent Assay</i> (ELISA).....	09

2 OBJETIVOS

2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos.....	11

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 Protocolo Geral.....	12
3.2 Obtenção da proteína MEHCV (Antígeno).....	13
3.3 Padronização da concentração de proteína por cavidade e da diluição do soro.....	14
3.4 Comparação do ELISA utilizando uma concentração de 50ng da proteína MEHCV purificada em resina de níquel <i>versus</i> ELISA Wiener Lab.....	18
3.5 Parâmetros de validação do ELISA utilizando uma concentração de 50ng de proteína MEHCV purificada em resina de níquel.....	20
3.6 Purificação da proteína MEHCV em coluna de níquel.....	21
3.7 Testes realizados com a proteína MEHCV purificada.....	24
3.7.1 Padronização da concentração de proteína por cavidade e da diluição do soro.....	24
3.7.2 MEHCV nas concentrações de 100 e 200ng e soros nas diluições 1/10 e 1/20.....	26

3.8 Testes realizados com a proteína MEHCV purificada e dessalinizada.....	28
3.8.1 Padronização da concentração de proteína por cavidade e da diluição do soro.....	28
3.8.2 MEHCV na concentração de 200ng e soros nas diluições 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40.....	29
3.8.3 MEHCV nas concentrações de 400e 600ng e soros nas diluições 1/10 e 1/20.....	31
3.9 Teste realizado com o kit comercial Wiener Lab.....	33
3.10 Parâmetros de validação do ELISA <i>in house</i>	35
3.11 Avaliação de interferência por proteínas inespecíficas.....	36
4 DISCUSSÃO.....	38
5 CONCLUSÃO.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Hepatite C

Na década de 70, com os avanços no diagnóstico das hepatites A e B, ficou claro que a maioria das hepatites decorrentes de transfusões sanguíneas não era causada nem pelo vírus da hepatite A (HAV) e nem pelo vírus da hepatite B (HBV). Esse agente etiológico foi então chamado de vírus da hepatite não-A não-B (HNANB). Em 1989, através da clonagem desse agente por meio de técnicas de biologia molecular, Choo *et al.* detectaram e caracterizaram o genoma viral e o denominaram de vírus da hepatite C (HCV).

O HCV, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*, possui um diâmetro de aproximadamente 50nm (Major & Feinstone, 1997; Valente, 2002). Como outros vírus dessa família, o HCV é envelopado com um capsídeo icosaédrico e possui uma hélice simples de RNA genômico com polaridade positiva contendo cerca de 9.600 nucleotídeos (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993).

O genoma do HCV é composto por duas regiões altamente conservadas e não codificadoras denominadas UTR (Untranslated Regions) 5' e 3'. A região 5'UTR é altamente conservada e possui 341 nucleotídeos com estrutura secundária complexa que funciona como uma IRES (Internal Ribosome Entry Site) permitindo a ligação direta do RNA viral ao ribossomo da célula infectada e possibilitando a tradução das proteínas virais. A 3'UTR é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U variável em extensão e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, essencial para replicação *in vivo* (Di Bisceglie, 1999; Bartenschlager & Lohmann, 2000; Rosenberg, 2001).

Entre a UTR 3' e 5' existe um longo *open reading frame* (ORF) que codifica uma poliproteína com pouco mais de 3000 resíduos de aminoácidos. Esta poliproteína possui duas regiões: uma amino-terminal e uma carboxi-terminal. A primeira região é clivada em 3 proteínas estruturais: o nucleocapsídeo (*core*), o envelope 1 (E1) e o envelope 2 (E2), envolvidas na organização da arquitetura viral; enquanto que a região carboxi-terminal é

clivada em 6 proteínas não estruturais (NS): NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b, responsáveis pelo ciclo biológico do HCV (SPI, 2004).

A proteína do *core* possui uma seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados do HCV (Kato *et al.*, 1990; Choo *et al.*, 1991; Mikawa, 2006), sendo utilizada em vários testes diagnósticos como importante alvo antigênico para a detecção de anticorpos anti-HCV. De acordo com estudos realizados, possui função primária de empacotar o genoma viral dentro de um capsídeo (Kato *et al.*, 1990; Yasui *et al.* 1998). Além disso, a proteína do *core* parece estar associada a várias funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir no metabolismo lipídico e deprimir a resposta imune do hospedeiro por meio de mecanismos ainda não conhecidos (McLauchlan, 2000; Mikawa, 2006).

As proteínas E1 e E2 são intensamente glicosiladas e formam um complexo heterodímero não-covalente o qual se acredita ser o principal componente do envelope viral. Estudos demonstram que as duas glicoproteínas de envelope apresentam funções importantes em diferentes etapas do ciclo de replicação do HCV, atuando de forma essencial na ligação ao receptor e fusão com a membrana da célula hospedeira (Bartenschlager & Lohmann, 2000; Bartosch *et al.*, 2003). A região genômica E2 codifica ainda, uma pequena proteína hidrofóbica remanescente de um grupo de proteínas conhecidas como *viroporins*, denominada p7, localizada na junção das proteínas estruturais e não-estruturais e cuja função ainda é desconhecida (Brecht, 1996; Op de Beeck *et al.*, 2001). Estudos recentes apontam que a p7 possa atuar na mediação da permeabilidade de cátions e possa apresentar importante função na maturação e liberação da partícula viral (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003).

A proteína NS2, juntamente com a região amino-terminal da NS3, constituem a NS2-NS3 protease, responsável pela auto-clivagem do sítio NS2-NS3, separando os dois componentes da protease (Roingard *et al.*, 2004). A NS3 é uma molécula bifuncional: possui na extremidade amino-terminal uma serina protease, responsável pela clivagem dos sítios NS3/4a, NS4a/b, NS4b/5a e NS5a/b; e na carboxi-terminal, atividades nucleotidotrifosfatase (NTPase) e helicase, essenciais para tradução e replicação viral (Di Bisceglie, 1999; Bartenschlager & Lohmann, 2000; Taylor *et al.*, 2000). Além disso, a

expressão de NS3 interfere no sinal da transdução (Borowski *et al.*, 1999a; Borowski *et al.*, 1999b), promove a proliferação (Ishido & Hotta, 1998) e a transformação celular (Zemel *et al.*, 2001). A NS4a é uma proteína de 54 aminoácidos que atua como co-fator, formando um complexo estável com a NS3, o qual é requerido para um eficiente processamento das proteínas NS (Bartenschlager *et al.*, 1994; Kato, 2001). Já a proteína de membrana hidrofóbica NS4b possui função ainda desconhecida, porém parece participar na replicação viral. A NS5a é uma proteína hidrofílica associada à membrana que existe em múltiplos estados de fosforilação (Roingeard *et al.*, 2004). Embora a função da NS5a não seja ainda conhecida, estudos revelam a associação entre os aminoácidos 2209 a 2248 e a sensibilidade ou resistência ao interferon (IFN), podendo esta região ser utilizada para se estabelecer um prognóstico quanto à terapia (Enomoto *et al.*, 1996). A proteína NS5b apresenta 591 aminoácidos e foi identificada como RNA polimerase RNA dependente (Lohmann *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1998).

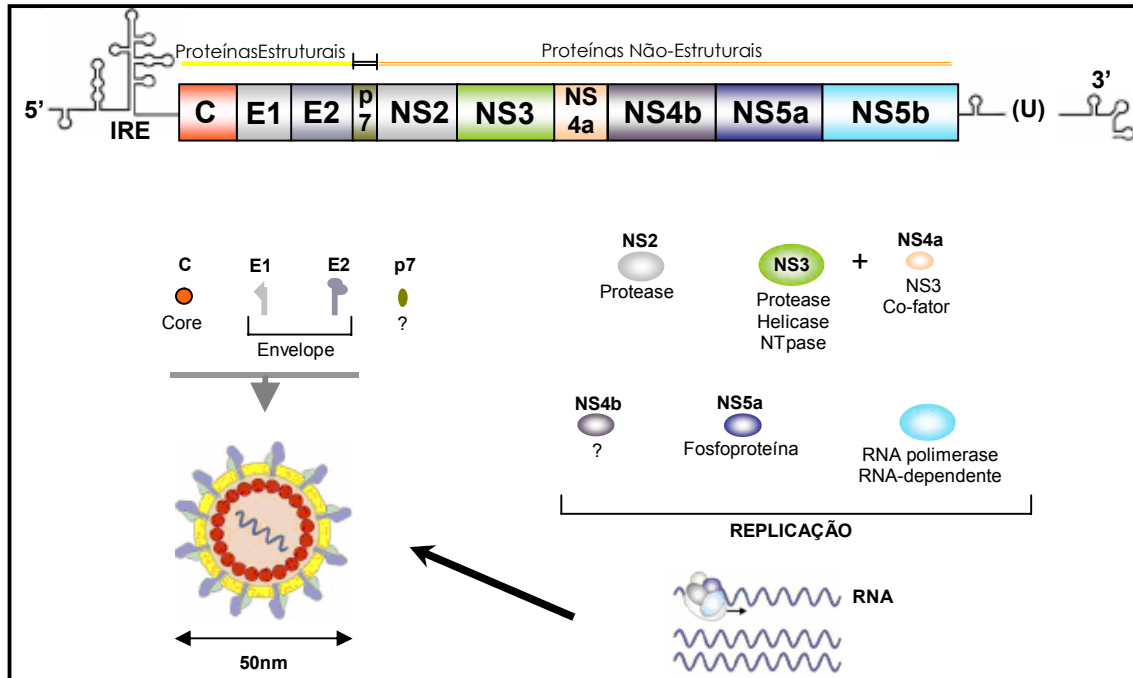


Fig. 1 – Esquema do genoma do HCV. Baseado em: Roingeard P *et al.*, 2004. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis.

O HCV exibe grande variabilidade genética devido às mutações espontâneas que ocorrem durante sua replicação (cerca de 10^{-3} substituições/sítio/ano). Em consequência dessa alta variabilidade, Simmonds *et al.* (1994), baseando-se nas similaridades nucleotídicas, propuseram um sistema de nomenclatura. Os principais grupos do vírus, denominados genótipos, foram representados por numerais arábicos (designados 1-6), enquanto que os subtipos, por letras minúsculas em ordem de descoberta (a, b, c etc.) (Simmonds *et al.*, 1994). Além dos genótipos e subtipos, o HCV também possui variantes denominadas *quasispecies*. O termo se refere a uma mistura heterogênea de vírus, diferindo somente por poucos nucleotídeos, em um mesmo hospedeiro infectado com o HCV. Essas variantes contribuem para o escape do vírus à resposta imunitária, estabelecendo uma infecção crônica no hospedeiro e, para a resistência do hospedeiro às drogas utilizadas no tratamento (Mikawa, 2006).

A distribuição dos diferentes genótipos do HCV varia de acordo com a região geográfica (Smith *et al.*; 1997). Alguns genótipos do HCV, como 1a, 1b, 2a, 2b e 3a, têm distribuição cosmopolita (Smith *et al.*, 1997; Stumpf & Pybus, 2002). Outros são encontrados em regiões específicas, como o genótipo 4, prevalente no norte do continente africano e no Oriente Médio; e os genótipos 5 e 6, predominantes no sul da África e em Hong Kong, respectivamente (Cha *et al.*, 1992; Simmonds *et al.*, 1993; Chamberlain *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Abdulkarim *et al.*, 1998; Stumpf & Pybus, 2002). No Brasil, vários estudos mostram uma maior prevalência do genótipo 1 seguido pelo genótipo 3 (Martins *et al.*, 1998; Silva & Rossetti, 2001; Amorim *et al.*, 2004).

A influência do genótipo viral na patogenia da doença hepática é bastante controversa (Mondelli & Silini, 1999). Estudos conduzidos na Europa, Ásia e América do Norte, têm demonstrado que alguns parâmetros epidemiológicos como a idade, fatores de risco e duração da infecção podem estar associados aos genótipos do HCV (Pawlotsky *et al.*, 1995; Lau *et al.*, 1996; Feucht *et al.*, 1997). Porém, existem dados que propõem que os genótipos do HCV não possuem nenhum efeito significativo na gravidade da doença hepática (Lau *et al.*, 1996; Benvegnù *et al.*, 1997).

O período de incubação para hepatite C aguda varia em torno de 6 a 10 semanas (WHO, 2003) e aproximadamente 80% das infecções agudas são

assintomáticas (Mast *et al.*, 1999). O início da doença geralmente é insidioso, com anorexia, desconforto abdominal, náusea e vômito, febre e fadiga, evoluindo para icterícia em cerca de 25% dos casos (EASL, 1999; Marcellin, 1999; WHO, 2003). Os tipos de hepatite fulminante raramente são observados. Em 50-80% dos casos em adultos, o sistema imunitário não consegue eliminar o vírus e a doença torna-se crônica, com astenia persistente e vasculites, porfiria cutânea, glomerulonefrite e outros. (MS, 2003). Cerca de 20% das infecções crônicas evoluem para cirrose em 10-20 anos e estas podem evoluir para óbito em decorrência de complicações da cirrose ou devido ao hepatocarcinoma celular (Marcellin *et al.*, 2002).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 180 milhões de pessoas, cerca de 3% da população mundial, estejam infectadas pelo vírus da hepatite C. Destes, 130 milhões são portadores de hepatite C crônica com risco de desenvolvimento de cirrose hepática e/ou câncer hepático. Estima-se que, a cada ano, 3 a 4 milhões de pessoas são recém infectadas, das quais 70% desenvolverão hepatite crônica (WHO, 2006). As áreas de maior prevalência incluem os países do Oriente, países do Mediterrâneo e algumas áreas na África e a Europa Oriental (WHO, 1999; WHO, 2003).

Não se conhece ao certo a prevalência da infecção pelo HCV no Brasil (MS, 2003), entretanto estima-se que existam cerca de 3 milhões de portadores crônicos desse vírus (Valente *et al.*, 2005). Em estudo transversal realizado em bancos de sangue, a prevalência de doadores com sorologia positiva para anticorpos anti-HCV foi de 1,23%. Entretanto, como nem todos os pacientes com anticorpos portam o vírus, se estima que a prevalência da infecção crônica pelo HCV esteja ao redor de 1% da população em geral (MS, 2003), e que, segundo estudos realizados em doadores de sangue, esta prevalência pode variar de 1 a 10% de acordo com a região (Valente *et al.*, 2005). Dados de estudos realizados em pacientes hemodialisados, mostraram taxas de prevalência de 20,3% em Santa Catarina (Moraes, 2001), 23,8% na Bahia (Santana *et al.*, 2001), 33,4% em Minas Gerais (Busek *et al.*, 2002) e de 39% em Goiás (Carneiro *et al.*, 2001).

1.2 Diagnóstico Laboratorial

A hepatite C pode ser diagnosticada laboratorialmente por meio de testes sorológicos, como o ELISA e o RIBA; e por meio de análises baseadas em técnicas de Biologia Molecular (análise qualitativa, análise quantitativa e genotipagem) (Silva & Rossetti, 2001).

O diagnóstico se inicia com a detecção de anticorpos anti-HCV, sendo o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) o ensaio mais comumente utilizado (Silva & Rossetti, 2001). Nesse teste, antígenos virais são fixados nas cavidades de uma placa de microtitulação. Os anticorpos contra esses antígenos, presentes no soro do paciente, irão se aderir à cavidade da placa e serão detectados pela adição de anticorpos anti-imunoglobulina humana contendo marcadores colorimétricos (Carithers *et al.*, 2000).

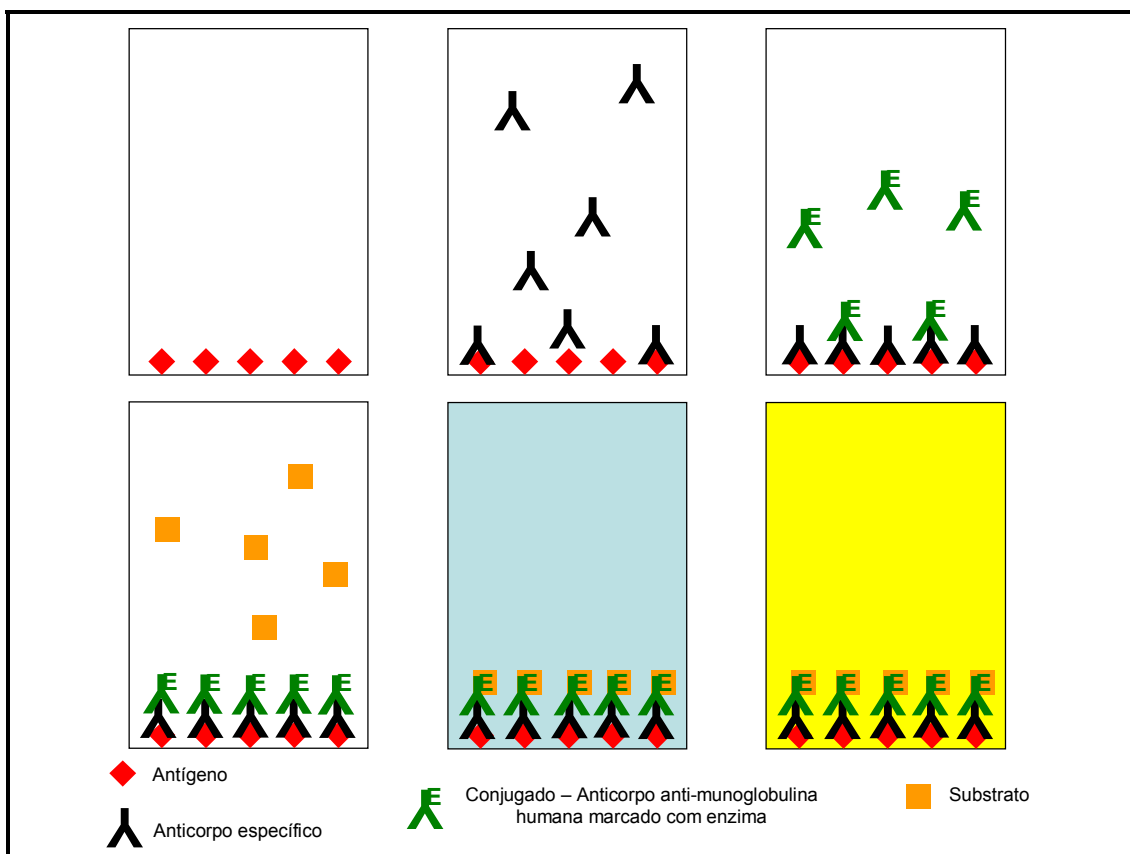


Fig. 2 – Esquema da metodologia do ensaio de ELISA.

Embora houvesse um aumento da sensibilidade e especificidade a cada geração do ELISA, resultados falso-positivos continuavam sendo observados, principalmente em bancos de sangue onde a prevalência por HCV é baixa (Carithers *et al.*, 2000; Al Dhahry *et al.*, 2003). Foi desenvolvido então, paralelamente ao ELISA, um teste suplementar ou confirmatório denominado RIBA ou *Recombinant Immunoblot Assay*. Neste ensaio, antígenos recombinantes ou peptídicos do HCV são fixados em uma tira de nitrocelulose ladeados por uma faixa de controle positivo fraco e uma de controle positivo moderado. Embora exija uma maior técnica do operador, para sua realização, do que para o ELISA, o RIBA captura anticorpos específicos contra diferentes antígenos do HCV, tendo uma maior especificidade em relação ao ELISA (Al Dhahry *et al.*, 2003). Por essa razão, pacientes com resultados falso-positivos no ELISA, geralmente apresentam resultados negativos no RIBA (Carithers *et al.*, 2000).

Apesar de o ELISA ser um ótimo teste de triagem e o RIBA apresentar uma maior especificidade, estes ensaios para detecção de anticorpos possuem limitações (Di Bisceglie, 1998; 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).

Em caso de sorologia positiva ou indeterminada no ELISA, a infecção deve ser confirmada pela detecção qualitativa do RNA viral (LHP, 2005) por meio da técnica de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction). Essa técnica, considerada *gold standard* no diagnóstico da hepatite C (Schiff *et al.*, 1999), consiste na transformação do RNA viral em um DNA complementar (cDNA) que servirá de molde para a amplificação de milhares de cópias da seqüência genômica viral esperada (Silva & Rossetti, 2001). Sob

condições ótimas, a RT-PCR possui uma sensibilidade de 100 moléculas/mL (Carithers *et al.*, 2000), sendo capaz de detectar o RNA viral 1 a 3 semanas após a exposição ao HCV (Wong & Lee, 2006). Existem ainda duas outras técnicas de amplificação: a *nested-PCR* e a *Transcription-Mediated Amplification* (TMA). A primeira utiliza uma segunda etapa de amplificação empregando oligonucleotídeos internos ao primeiro produto da PCR, aumentando de forma significativa a sensibilidade e a especificidade. A segunda técnica é um ensaio ultra-sensível capaz de detectar mínimas quantidades do RNA viral, aproximadamente 6UI/mL (Silva & Rossetti, 2001; LHP, 2005).

Existe uma variedade de testes capazes de quantificar o RNA viral circulante em pacientes com hepatite C. As técnicas mais comumente utilizadas são a PCR quantitativa e o b-DNA (*Branched DNA*) quantitativo (Carithers *et al.*, 2000), ambas úteis na avaliação da resposta terapêutica e no acompanhamento da infecção por HCV. A PCR possui um valor mínimo quantificável de 600UI/mL, sendo cada UI correspondente a 2,7 cópias do RNA viral, enquanto que o b-DNA, uma técnica de amplificação de sinal (Schiff *et al.*, 1999; LHP, 2005), possui uma sensibilidade de 615UI/mL, com cada UI equivalendo a 4,8 cópias do RNA do HCV. Valores acima de 800.000UI/mL tanto na PCR quanto no b-DNA indicam um mau prognóstico (Beld *et al.*, 2002; Germer *et al.*, 2002; LHP, 2005).

A genotipagem tem importante papel no auxílio ao prognóstico e na conduta terapêutica do paciente com infecção por HCV (LHP, 2005). As técnicas de biologia molecular que utilizam seqüências do genoma viral para genotipagem são: a *nested-PCR* (Okamoto *et al.*, 1992), a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Simmonds *et al.*, 1993), a hibridização reversa (Stuyver *et al.*, 1993) e o seqüenciamento direto da 5'UTR. Entre as principais vantagens desses métodos estão a informação direta sobre a seqüência nucleotídica do genoma viral, a alta sensibilidade e a possibilidade da identificação do subtipo do HCV (Brandão *et al.*, 2001).

1.2.1 *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

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).

A primeira geração de ELISA, disponível em 1990, continha um único antígeno recombinante derivado da região NS4 do genoma do HCV, o polipeptídeo c100-3 (Carithers *et al.*, 2000; Al Dhahry *et al.*, 2003). Esse ensaio representou o principal atalho no rastreamento da hepatite C em doadores de sangue, além de ajudar no esclarecimento de diagnósticos da maioria dos indivíduos com hepatite C. Entretanto, a alta porcentagem de resultados falso-positivos em grupos onde a prevalência da hepatite C é baixa, como por exemplo, em doadores de sangue; e as ocasionais reações falso-positivas inespecíficas em doenças auto-imunes, mostraram que o ELISA-1 possuía sérias limitações (Carithers *et al.*, 2000).

Muitas dessas limitações foram superadas pela segunda geração do ELISA, surgido em 1992, nos Estados Unidos (Carithers *et al.*, 2000). Nessa geração foram incorporadas outras duas proteínas recombinantes do HCV: a c22-3, derivada do *core*; e a c33-c, oriunda da região NS3 e fusionada ao antígeno c100-3, formando a proteína c-200 (Aach *et al.*, 1991; Alter, 1992; Kleinman *et al.*, 1992; Brandão *et al.*, 2001). Comparada à geração anterior, o ELISA-2 apresentou uma maior sensibilidade e uma maior especificidade, reduzindo o risco de transmissão da hepatite C pós-transfusional e o número de resultados falso-positivos entre doadores de sangue. O ensaio demonstrou também ser totalmente confiável como teste de rastreamento em indivíduos pertencentes ao grupo de risco da hepatite C; e, além disso, reduziu o tempo de janela imunológica, detectando anticorpos anti-HCV em doadores de sangue em 10 semanas, ao invés das 16 semanas do ELISA-1 (Carithers *et al.*, 2000). Muitos resultados falso-negativos ainda ocorrem em indivíduos imunossuprimidos, como pacientes transplantados ou co-infectados pelo HIV (Gretch *et al.*, 1995), porém o ELISA-2 continua sendo rotineiramente usado pelos laboratórios clínicos (Carithers *et al.*, 2000).

A terceira geração do ELISA foi introduzida na Europa em 1993; e nos Estados Unidos, no ano de 1996 (Schiff *et al.*, 1999). Esse ensaio continha as cavidades das placas de microtitulação recobertas por antígenos da região *core* e NS3 reconfigurados; e um antígeno adicional da região NS5 do genoma do HCV (Carithers *et al.*, 2000). O ELISA-3 apresentou maior sensibilidade em comparação às gerações anteriores. Entretanto, essa sensibilidade foi creditada às novas configurações dos antígenos já presentes no ELISA-2 e não ao antígeno da região NS5 (Lee *et al.*, 1995; Brandão *et al.*, 2001). Outra vantagem do ELISA-3 foi a redução do tempo de soroconversão para um intervalo de 7-8 semanas. Sua especificidade, em doadores de sangue, demonstrou ser equivalente ou superior ao ELISA-2; contudo, em grupos de alto risco, ela não está estabelecida (Brandão *et al.*, 2001).

Atualmente já existe a quarta geração do ELISA (*Innogenetics, Belgium*) que incorpora frações antigênicas melhoradas das regiões *core*, NS3 e NS4 do genótipo 1 do HCV, além de antígenos NS3 e NS4 de genótipos diferentes do 1 (Ferreira & Ávila, 2001).

Devido à ampla distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite C, os kits de ELISA para detecção de anticorpos anti-HCV não apresentam o mesmo rendimento em todas as partes do mundo (Pawlotsky *et al.*, 1998; Dipti *et al.*, 2006; Chien *et al.*, 1999). Portanto, os exames realizados no Brasil teriam uma maior especificidade se os kits de ELISA fossem confeccionados a partir de frações antigênicas com genótipos do HCV prevalentes no Brasil. Além disso, a obtenção de uma proteína multiepítopo demanda menos tempo e dinheiro, o que contribui para o desenvolvimento de um kit para detecção de anticorpos anti-HCV menos oneroso. Dessa forma, o uso rotineiro do kit em países em desenvolvimento se tornaria mais fácil, tanto na saúde privada quanto pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

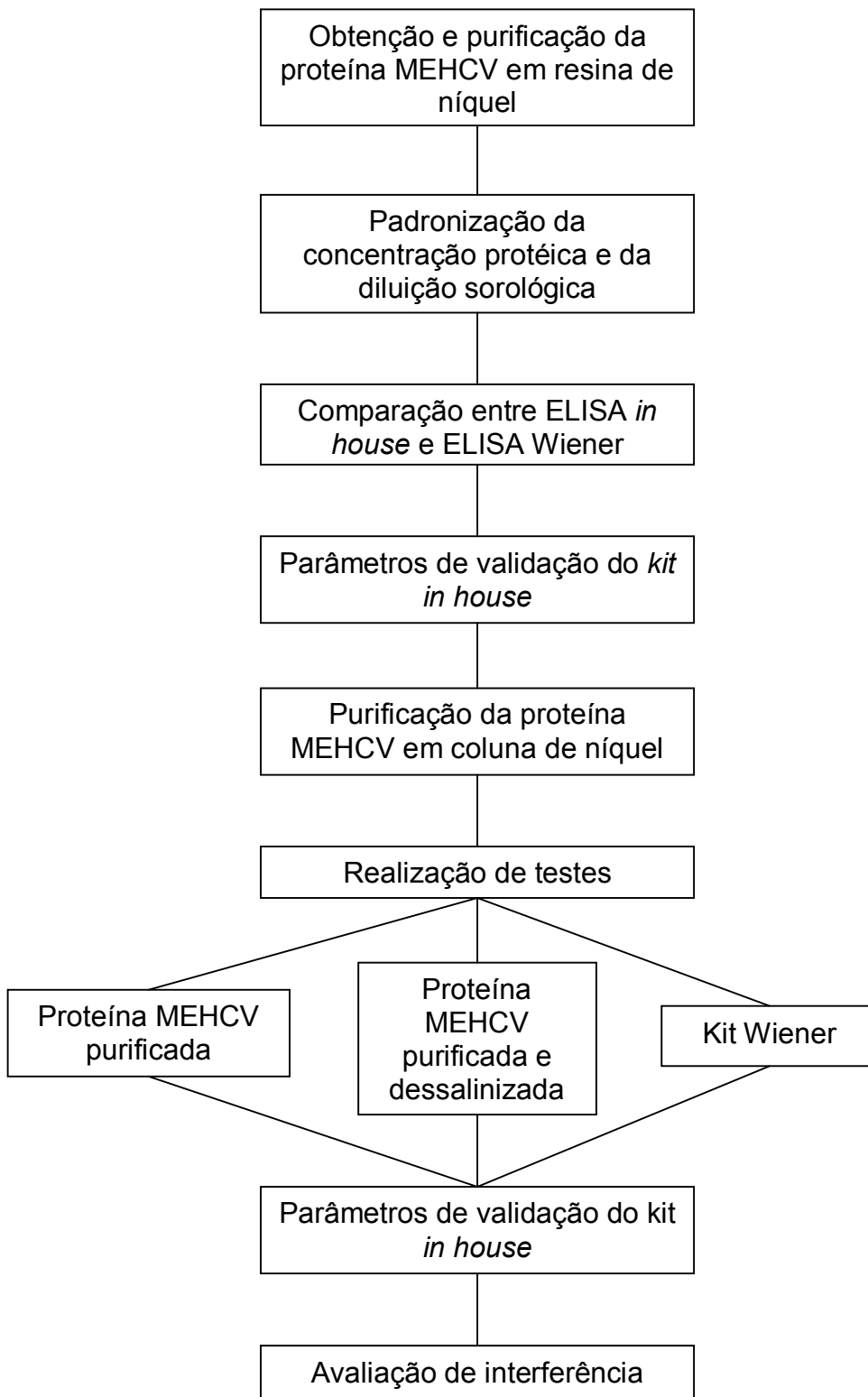
- ✓ Desenvolver um método imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra o HCV.

2.2 Específicos

- ✓ Padronizar a concentração da proteína recombinante por cavidade e a diluição do soro;
- ✓ Realizar ensaios para detecção de possíveis reações inespecíficas;
- ✓ Calcular os parâmetros de validação do kit.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 Protocolo Geral



3.2 Obtenção da proteína MEHCV (antígeno)

A proteína recombinante Multiepítipo do HCV (MEHCV) expressa por *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS a partir de 4 seqüências gênicas do HCV (*core*, NS3, NS4 e NS5) de alguns dos genótipos mais prevalentes no Brasil, 1a e 3a (Figura 3), foi purificada por cromatografia de afinidade em resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (Amershan Biosciences) pré-equilibrada em tampão de lise pH 8,0 (Guanidina HCl 6M; NaH₂PO₄ 0,1M; Tris-HCl 10mM) por meio de inversão e centrifugação. Posteriormente, ela foi analisada em gel de SDS_PAGE (Figura 4) e dialisada contra um tampão de pH 4,5 contendo uréia 8M, NaH₂PO₄ 0,1M e Tris HCl 10mM. A proteína foi então solubilizada em 25µL de tampão de bicarbonato de amônio (NH₄CO₃) 50mM, pH 6,5 e quantificada por meio da reação de Bradford. A concentração final foi 2,5mg/mL.

core (1a) - linker – core (3a) –linker- NS3 (1a) –linker- NS4a (1a) –linker- NS4b (1a) –linker-NS5 (1a)

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGSGSGMSTLPKPQR
KTKRNTIIRRPQDVKFPGGGQIVGGVYVLPARGPRLGSGSGYMSKAHGVDPNIRTGVRT
ITTGSPITYSTYGKFLADGGCSGGAYDIIIGSGSGIIPDREVLVYQEFDEMEECSQHLP
YIEQGMMLAEQFKQKALGLGSGSGIAFASRGNHVSPTHYVGS^{SG}GPPLVETWKKPDYE
PPVVH

Fig. 3 – Seqüência primária da proteína MEHCV. As partes sublinhadas são os linkers.

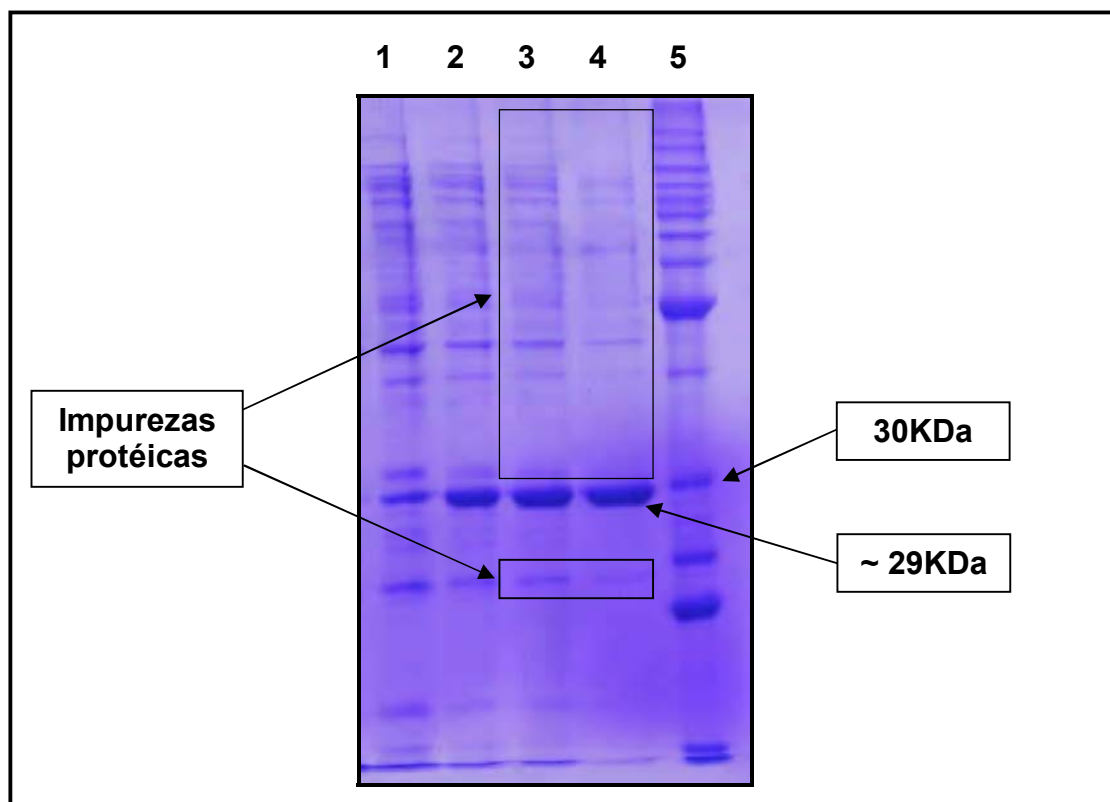


Fig. 4 – Purificação da proteína MEHCV por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA, analisada em gel SDS-PAGE 12%. Os poços 1 e 2 contêm as frações obtidas a partir da eluição com uréia 8M pH 5.9; os poços 3 e 4 contêm as frações da eluição com uréia 8M pH 4,5 e o poço 5 representa o marcador de massa molecular (Invitrogen-BenchMark Protein Ladder).

3.3 Padronização da concentração de proteína por cavidade e da diluição do soro

A proteína purificada MEHCV (2,5mg/mL) foi diluída em 3 diferentes concentrações (50, 100 e 200ng/cavidade) com tampão bicarbonato de amônio 50mM, pH 6,5. Foram adicionados às respectivas cavidades de fundo chato da microplaca de ELISA (*Corning Incorporated Costar; NY, USA*) 200 μ L das concentrações da proteína MEHCV conforme a figura 5. A microplaca foi então, coberta com tiras adesivas (devido o alto grau de volatilidade do tampão) e incubada *overnight* à 4°C. Após a incubação, foi lavada manualmente por 5 vezes com o tampão de lavagem do kit Hepatite C (anti-HCV) da Wiener Lab (Rosário, Argentina) e; em seguida, foi adicionado a cada cavidade revestida pela proteína, 200 μ L de solução de bloqueio composta por leite em pó desnatado (Molico) a 5% em tampão PBS (Biosystem) pH 7,4. A microplaca foi

recoberta com tiras adesivas, incubada em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o período de 1 hora e lavada novamente de forma manual com tampão de lavagem. Em seguida, foi adicionado à respectiva cavidade um volume de $200\mu\text{L}$ de 4 amostras anti-HCV positivas (obtidas em banco de sangue) previamente diluídas 1/5, 1/10 e 1/20 com diluente de amostra do kit da Wiener. Foi adicionado também um volume de $200\mu\text{L}$ do Controle Negativos (CN), testado em triplicata; e $200\mu\text{L}$ do Controle Positivos (CP), testado em duplicata; ambos previamente diluídos 1/20 em solução diluente e pertencente ao kit de Hepatite C (anti-HCV) da Wiener. Nas cavidades do Branco (B) foi adicionado somente $200\mu\text{L}$ de diluente de amostra (Figura 5). A microplaca foi recoberta com as tiras adesivas e incubada em estufa à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 ± 2 minutos. Após a incubação, foi adicionado às cavidades, $50\mu\text{L}$ (ou 1 gota) de conjugado pertencentes ao kit da Wiener. A microplaca foi novamente coberta pelas tiras adesivas e incubada em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 ± 2 minutos e; logo após a incubação, foram adicionados $50\mu\text{L}$ (ou 1 gota) de revelador A e de revelador B (Wiener) às cavidades. As soluções contidas na microplaca de ELISA foram homogeneizadas com leves batidas nas laterais da mesma por mais ou menos 10 segundos. Em seguida, a microplaca foi recoberta pelas tiras adesivas e incubada à temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$) por 30 ± 2 minutos. Foi adicionado às cavidades $50\mu\text{L}$ (ou 1 gota) de solução *stopper* (Wiener) e feita a homogeneização dos reagentes por meio de leves batidas nas laterais da microplaca durante mais ou menos 10 segundos. Em seguida foi realizada a leitura bicromática ($\lambda = 450/630\text{nm}$) em espectrofotômetro.

[] MEHCV		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50ng	A	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
50ng	B	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20						
	C												
100ng	D	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
100ng	E	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20						
	F												
200ng	G	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
200ng	H	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20						

Fig. 5 – Mapa da microplaca de ELISA para padronização da concentração de antígeno por cavidade e diluição das amostras. B – Branco, CN – Controle negativo, CP – Controle positivo.

Os valores das Densidades Ópticas (DO) do Branco, da média dos controles negativos e positivos, e das 4 amostras nas diferentes diluições, referentes às concentrações da proteína estão dispostos na figura 6. Juntamente a eles estão dispostos os valores do *cut-off* e da Zona de Indeterminação (ZI) também de acordo com a concentração protéica por cavidade. Esses valores foram calculados baseando-se nos critérios de validação do kit da Wiener:

$$\text{Média CN} \leq 0,150;$$

$$\text{Média CP} \geq 0,600;$$

$$\text{Cut-off} = \text{Média CN} + 0,150$$

$$\text{Zona de Indeterminação} = \pm 10\% \text{ cut-off}$$

[] MEHCV		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50ng	A	0,002	0,250		2,320		2,027	2,043	2,222	1,392	2,005	2,452	
50ng	B	2,774	2,536	2,402	2,538	1,782	1,757	<i>Cut-off</i> = 0,400 0,360 < Z.I. < 0,440					
	C												
100ng	D	0,005	0,316		2,402		2,505	2,358	2,564	2,128	1,653	1,795	
100ng	E	2,654	2,045	2,000	2,429	2,054	1,607	<i>Cut-off</i> = 0,466 0,4194 < Z.I. < 0,5126					
	F												
200ng	G	0,006	0,700		2,080		2,185	2,720	2,329	2,781	1,788	2,058	
200ng	H	2,566	2,789	1,928	2,010	2,188	1,526	<i>Cut-off</i> = 0,850 0,7650 < Z.I. < 0,935					

Fig. 6 – Resultado das DO's da microplaca de ELISA para padronização da concentração de antígeno por cavidade e diluição das amostras.

Os valores das DO's dos brancos, das médias dos controles positivos e das amostras se mostraram próximos nas várias concentrações da proteína e nas várias diluições dos soros, não sendo observado um padrão de resposta (valor da DO diretamente proporcional à concentração de antígeno e inversamente proporcional à diluição do soro) na variação desses valores. As DO's das médias dos controles negativos se mostraram um pouco mais divergentes, parecendo haver uma relação diretamente proporcional das DO's com as concentrações da proteína. De qualquer forma, optou-se em realizar os testes utilizando uma microplaca sensibilizada com 200µL da proteína viral MEHCV na concentração de 50ng/cavidade e utilizando os soros diluídos 1/20 (10uL de amostra + 190uL de diluente), a fim evitar desperdício da proteína MEHCV, amostras e reagentes a serem utilizados.

3.4 Comparação do ELISA utilizando uma concentração de 50ng da proteína MEHCV purificada em resina de níquel versus o kit padronizado da marca Wiener

Nesta comparação, 14 amostras anti-HCV positivas e 40 amostras negativas para hepatite C foram testadas em ambos os kits; enquanto que 36 amostras anti-HBV positivas foram testadas no ELISA *in house* e 12 no kit da Wiener. Todas as amostras foram obtidas em banco de sangue. O procedimento de sensibilização da microplaca de ELISA foi realizado de maneira idêntica ao realizado anteriormente, porém somente na concentração de 50ng/cavidade. O protocolo utilizado para a realização, tanto do teste do ELISA *in house* quanto do teste da Wiener, também foi igual ao descrito no tópico anterior. Os critérios de validação para cálculo do *cut-off* e Zona de Indeterminação foram os mencionados no kit da Wiener.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C3	C11	N5	N13	N21	N29	N37	B5	B13	B21	B29
B	CN	C4	C12	N6	N14	N22	N30	N38	B6	B14	B22	B30
C	CN	C5	C13	N7	N15	N23	N31	N39	B7	B15	B23	B31
D	CN	C6	C14	N8	N16	N24	N32	N40	B8	B16	B24	B32
E	CP	C7	N1	N9	N17	N25	N33	B1	B9	B17	B25	B33
F	CP	C8	N2	N10	N18	N26	N34	B2	B10	B18	B26	B34
G	C1	C9	N3	N11	N19	N27	N35	B3	B11	B19	B27	B35
H	C2	C10	N4	N12	N20	N28	N36	B4	B12	B20	B28	B36

Fig. 7 – Mapa da microplaca de ELISA *in house* e da Wiener Lab (amostras testadas até a posição H9). B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; C1 a C14 – Amostras anti-HCV positivas; N1 a N40 – Amostras negativas; B1 a B36 – Amostras anti-HBV positivas.

Algumas DO's do ensaio realizado com o ELISA *in house*, de acordo com os critérios de validação do kit da Wiener Lab, se mostraram alteradas. Os

resultados dos CN não ficaram dentro da regra de validação estabelecida pelo kit comercial Wiener. Além disso, devido às reações cruzadas ou inespecíficas, ocorreram resultados falso-positivos em 12 amostras anti-HBV positivas; resultados indeterminados em 5 amostras anti-HBV positivas. Houve também resultado falso-negativo em 1 amostra anti-HCV positiva. Todas as DO's do ensaio feito com o kit Wiener Lab obtiveram valores dentro do esperado.

		Média CN = 0,776 Média CP = 2,887		Cut-off = 0,926 0,8334 > ZI > 1,0186		Amostras Positivas > 1,0186 Amostras Negativas < 0,8334							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0,004	2,448	2,212	0,001	0,086	0,002	0,001	0,002	1,375	1,409	0,802	1,680
B		0,831	0,654	2,724	0,627	0,003	0,001	0,000	0,002	1,039	1,066	0,892	1,109
C		0,882	2,947	2,964	0,416	0,497	0,003	0,001	0,359	0,991	0,481	0,878	1,057
D		0,616	2,784	2,981	0,721	0,002	0,003	0,001	0,005	1,125	0,238	0,565	0,519
F		3,037	3,102	0,625	0,010	0,021	0,005	0,004	1,093	1,183	0,745	0,603	0,513
G		2,808	1,698	0,039	0,004	0,012	0,004	0,002	0,896	0,740	0,152	0,912	0,701
H		2,156	1,194	0,333	0,637	0,023	0,003	0,004	1,020	0,556	0,020	1,345	0,783

Fig. 8 – Valores das DO's da microplaca de ELISA *in house*. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

		Média CN = 0,000 Média CP = 2,799		Cut-off = 0,150 0,135 > ZI > 0,165		Amostras Positivas > 0,165 Amostras Negativas < 0,135							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0,001	2,534	2,079	0,000	0,002	0,000	0,001	0,002	0,001			
B		0,000	0,926	2,486	0,000	0,000	0,004	0,003	0,001	0,000			
C		0,001	2,639	2,501	0,001	0,000	0,004	0,007	0,004	0,007			
D		0,000	2,611	2,385	0,000	0,000	0,002	0,006	0,003	0,005			
F		2,788	2,820	0,009	0,003	0,001	0,013	0,015	0,011	0,012			
G		2,596	2,658	0,013	0,004	0,010	0,007	0,019	0,010	0,012			
H		2,629	2,446	0,011	0,002	0,002	0,016	0,012	0,009	0,012			

Fig. 9 – Valores das DO's da microplaca de ELISA da Wiener Lab.

3.5 Parâmetros de validação do ELISA utilizando uma concentração de 50ng da proteína MEHCV

Foram realizados vários parâmetros para a validação do MEHCV. Dentre eles foram calculados a sensibilidade, a especificidade, a eficiência e os Valores Preditivos Positivos (VPP) e Negativos (VPN), onde:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{VPP} = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$\text{Eficiência} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

$$\text{VPN} = \frac{VN}{VN + FN}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Tabela 1 – Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença

Teste	DOENÇA - Diagnóstico Verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN
Total	VP + FN	FP + VN

Tabela 2 – Combinação binária entre os resultados obtidos no ELISA utilizando uma concentração de 50ng da proteína MEHCV e o diagnóstico verdadeiro da doença

Teste	DOENÇA - Diagnóstico Verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	13	13
Negativo	1	63
Total	14	76

Os valores obtidos foram:

- ♦ Sensibilidade = 92,86%
- ♦ Especificidade = 82,89%
- ♦ Eficiência = 84,44%
- ♦ VPP = 50%
- ♦ VPN = 98,44%

Após a purificação da proteína MEHCV por cromatografia de afinidade em resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow (Amershan Biosciences)* por meio de inversão e centrifugação notou-se, através da análise em SDS-PAGE 12% (Figura 4), que ainda existiam proteínas inespecíficas. Por esse motivo, foi realizado um novo procedimento de purificação.

3.6 Purificação da proteína MEHCV em coluna de níquel

Depois de realizada a indução foi realizado o procedimento para extração dos corpos de inclusão: o material da indução foi centrifugado a 10.000 X g por 5 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, o *pellet* foi

ressuspensão em 20mL de tampão de lise (Tris 0,1M pH 8,5; EDTA 5mM; Tolueno 1%; Triton X-100 5%) e foi homogeneizado durante 24 horas à temperatura ambiente. Esse material foi centrifugado a 10.000 X g por 5 minutos à 4°C e o *pellet* ressuspensão em 10mL de tampão contendo NaH₂PO₄ e Tris, pH 8,0. Posteriormente, realizou-se a centrifugação do material a 10.000 X g durante 5 minutos à temperatura de 4°C e a ressuspensão do *pellet* em 8mL de tampão A (6M guanidina; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M Tris HCL; 0,01M imidazol; pH 8,0).

A coluna *HiTrap Chealing HP 1mL (Amershan Bioscience)*, de cromatografia de afinidade, foi preparada por meio de uma lavagem com 5mL de H₂O destilada, uma adição de 0,5mL de NiSO₄ e uma nova lavagem com H₂O destilada e; em seguida, foi pré-equilibrada em tampão A. Logo após adicionou-se aproximadamente 1mL do extrato bruto e coletou-se o *flow-through*. Foi então, realizada uma lavagem com 10mL de tampão C (8M uréia; 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, 0,02M imidazol, pH 8,0) e posteriormente foi adicionado 2mL de tampão D (8M uréia; 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, 0,25M imidazol, pH 8,0). O eluído do tampão D foi coletado em 4 alíquotas de aproximadamente 0,5mL e cada uma delas foi analisada em SDS-Page (Figura 10). Após a análise, parte do material foi quantificado por meio da reação de Bradford. A outra parte foi dessalinizada utilizando-se o kit *Centriplus Centrifugal Filter Devices* (Millipore, USA) e quantificada. A concentração final das amostras dessalinizada e não-dessalinizada foi de 34,1µg/mL e 251µg/mL, respectivamente.

Utilizando-se de recursos da informática, através dos *softwares*: Gimp 2.2.14, *Scion Image* e *Origin Pro 7.0*, foi realizada uma análise gráfica da imagem do gel de poliacrilamida para verificação do grau de pureza da proteína MEHCV (Figuras 11 e 12). Tomou-se por base, nessa análise, somente o poço 4, por apresentar uma maior concentração da proteína. De acordo com a análise computacional, através do cálculo das áreas total e da banda protéica, foi obtido um grau de pureza de aproximadamente 73,82%.

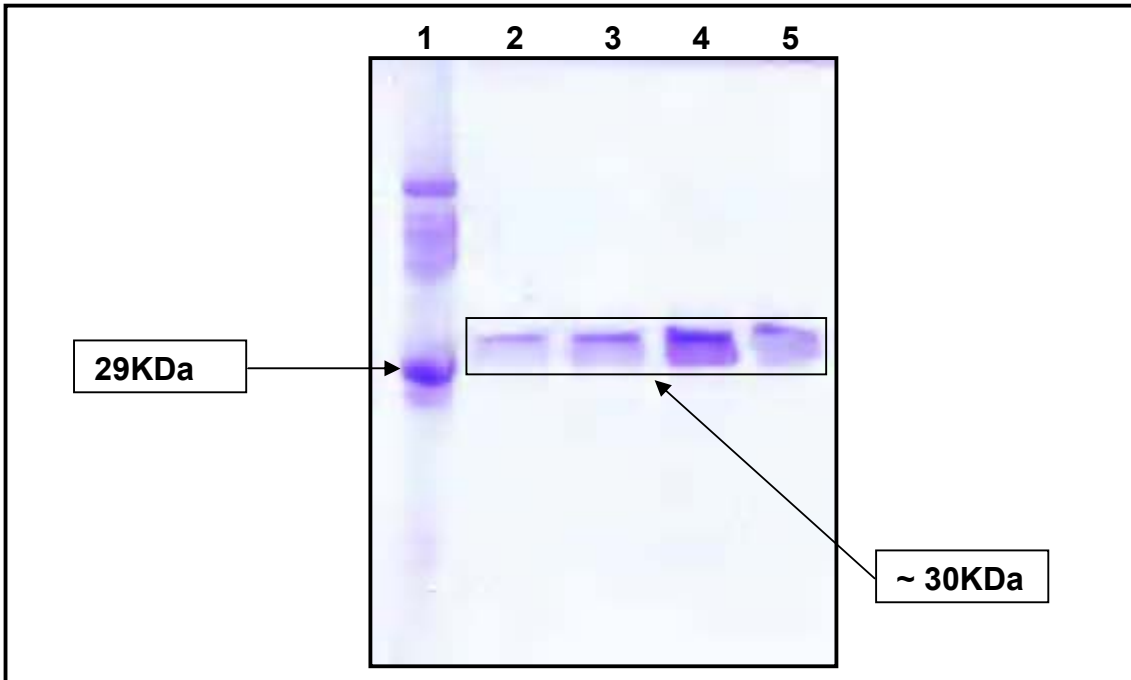


Fig. 10 – Purificação da proteína MEHCV por cromatografia de afinidade na coluna *HiTrap Chealing HP 1mL*, analisada em gel SDS-PAGE 12%. Os poços 2, 3, 4 e 5 contêm, respectivamente, as 4 alíquotas da eluição do tampão D (8M uréia; 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, 0,25M imidazol, pH 8,0). O poço 1 representa o marcador de massa molecular (Sigma SDS 6H).

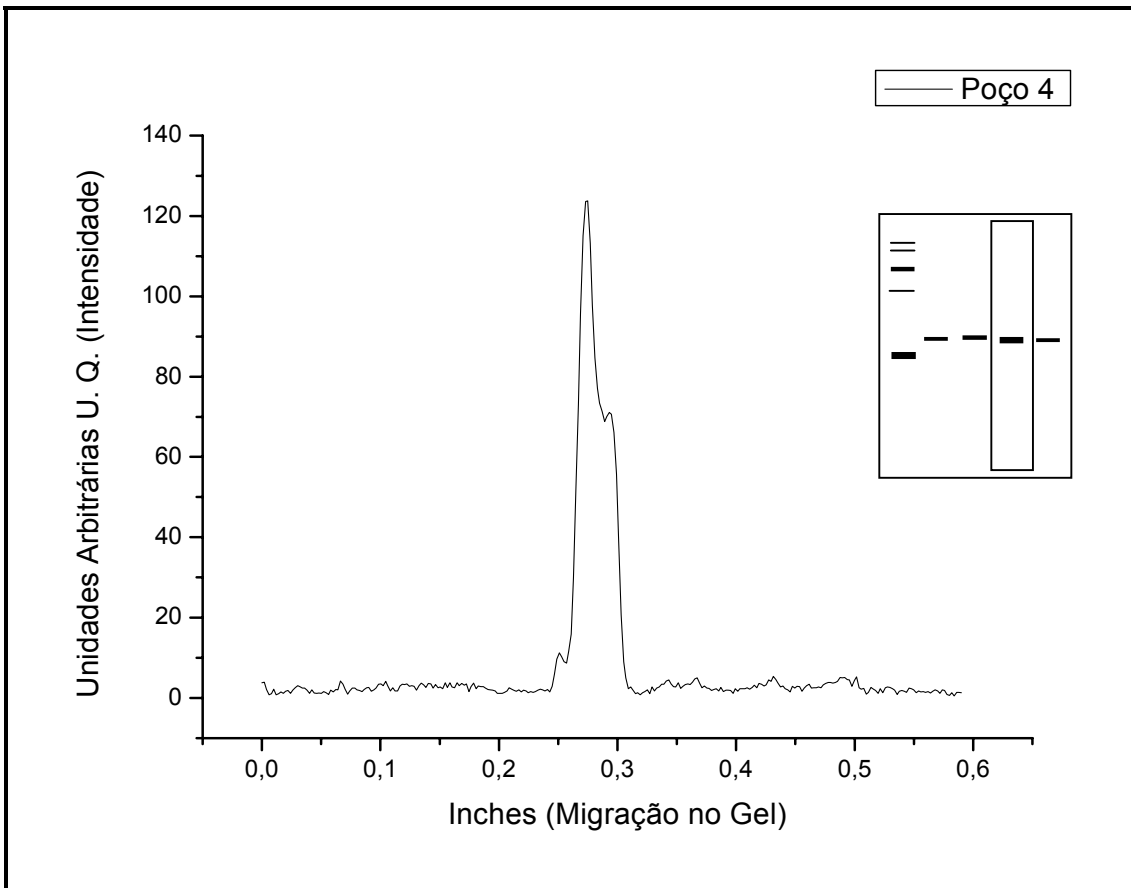


Fig. 11 – Gráfico representativo da área total do poço 4 ($A_T = 4,67745$).

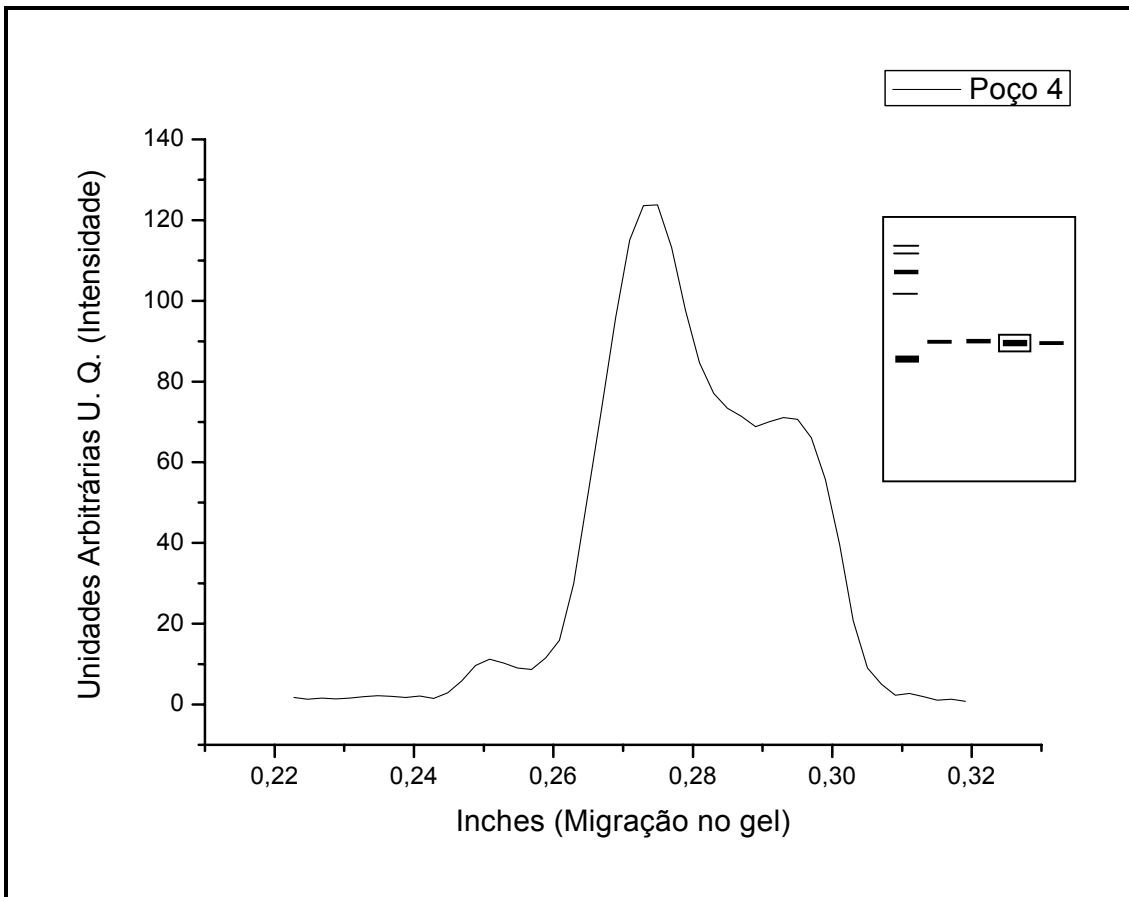


Fig. 12 – Gráfico representativo da área da banda da proteína MEHCV (AB = 3,45308).

3.7 Testes realizados com a proteína MEHCV purificada

3.7.1 Padronização da concentração de proteína por cavidade e da diluição do soro

A proteína MEHCV purificada foi diluída em 4 diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200ng/cavidade) com tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5. Foram adicionados às respectivas cavidades da microplaca de ELISA (*Corning Incorporated Constar; NY, USA*) 100 μ L das concentrações da proteína conforme a figura 13. A microplaca foi então, coberta e incubada *overnight* à 4°C. Após a realização desse procedimento, ela foi lavada manualmente por 5 vezes com o tampão de lavagem do kit Hepatite C (anti-HCV) da Wiener Lab

(Rosário, Argentina). Em seguida, foi bloqueada através da adição de 100µL, em cada cavidade, de uma solução composta por leite em pó desnatado (Molico) a 5% em tampão PBS (Biosystem) pH 7,4; e incubada em estufa à 37°C durante 3 horas. O restante do procedimento foi realizado de maneira idêntica ao item 3.3, exceto pelo uso do PBS como diluente de amostra. Os valores das DO's dos CN e CP, além do cálculo do *cut-off* e da Zona de Indeterminação também foram obtidos através dos critérios de validação do kit da Wiener.

[] MEHCV		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25ng	A	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
25ng	B	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut - off		ZI
50ng	C	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
50ng	D	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut - off		ZI
100ng	E	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
100ng	F	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut - off		ZI
200ng	G	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
200ng	H	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut-off		ZI

Fig. 13 – Mapa da microplaca de ELISA para padronização da concentração de antígeno por cavidade e da diluição das amostras. B – Branco; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; ZI – Zona de Indeterminação.

De acordo com a figura 14, as médias dos CN ficaram dentro dos critérios de validação em todas as concentrações de MEHCV. Porém, somente nas concentrações protéicas de 100 e 200ng, as médias dos CP ficaram dentro do critério de validação estabelecido pelo kit da Wiener. Em relação às amostras testadas, muitas não apresentaram um padrão de resposta e somente a amostra 5 apresentou reação falso-negativa em todas as concentrações (exceto na concentração de 100ng de MEHCV com diluição sorológica 1/5).

[] MEHCV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25ng A	0,000	0,001		0,008		0,002	1,080	0,705	0,401	0,032	0,001	
25ng B	1,608	1,389	1,268	2,541	2,321	2,329	0,001	0,001	0,000	Cut-off 0,151		0,136 < Z.I. < 0,166
50ng C	0,000	0,037		0,525		0,378	1,013	2,137	1,190	0,634	0,430	
50ng D	2,481	2,282	1,914	2,524	2,850	2,221	0,002	0,004	0,001	Cut-off 0,187		0,168 < Z.I. < 0,206
100ng E	0,000	0,012		1,195		1,256	2,574	1,903	1,804	1,554	0,804	
100ng F	2,330	2,769	2,289	3,111	2,561	2,430	0,362	0,003	0,009	Cut-off 0,162		0,146 < Z.I. < 0,178
200ng G	0,000	0,016		2,259		2,395	1,985	2,239	2,095	1,488	1,321	
200ng H	2,439	2,319	2,092	2,126	2,552	1,827	0,007	0,007	0,005	Cut-off 0,166		0,149 < Z.I. < 0,182

Fig. 14 – Resultado das DO's da microplaca de ELISA para padronização da concentração da proteína MEHCV salinizada por cavidade e diluição das amostras.

3.7.2 MEHCV nas concentrações de 100 e 200ng e soros nas diluições 1/10 e 1/20

As concentrações de 100 e 200ng de proteína MEHCV obtiveram os melhores resultados e, por esse motivo, foi sensibilizada uma placa para cada uma das concentrações para novos testes. Os ensaios utilizaram amostras anti-HCV, anti-HAV e anti-HBV positivas e amostras negativas nas diluições 1/10 e 1/20, distribuídas de acordo com a figura abaixo. Esses ensaios foram realizados de acordo com o protocolo presente no item 3.3, exceto pelo diluente de amostra (PBS).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C2 1/10	B1 1/10	B5 1/10	B9 1/10	B13 1/10	B17 1/10	A3 1/10	A7 1/10	A11 1/10	N3 1/10	N7 1/10
B	CN	C2 1/20	B1 1/20	B5 1/20	B9 1/20	B13 1/20	B17 1/20	A3 1/20	A7 1/20	A11 1/20	N3 1/20	N7 1/20
C	CN	C3 1/10	B2 1/10	B6 1/10	B10 1/10	B14 1/10	B18 1/10	A4 1/10	A8 1/10	A12 1/10	N4 1/10	N8 1/10
D	CN	C3 1/20	B2 1/20	B6 1/20	B10 1/20	B14 1/20	B18 1/20	A4 1/20	A8 1/20	A12 1/20	N4 1/20	N8 1/20
E	CP	C4 1/10	B3 1/10	B7 1/10	B11 1/10	B15 1/10	A1 1/10	A5 1/10	A9 1/10	N1 1/10	N5 1/10	N9 1/10
F	CP	C4 1/20	B3 1/20	B7 1/20	B11 1/20	B15 1/20	A1 1/20	A5 1/20	A9 1/20	N1 1/20	N5 1/20	N9 1/20
G	C1 1/10	C5 1/10	B4 1/10	B8 1/10	B12 1/10	B16 1/10	A2 1/10	A6 1/10	A10 1/10	N2 1/10	N6 1/10	N10 1/10
H	C1 1/20	C5 1/20	B4 1/20	B8 1/20	B12 1/20	B16 1/20	A2 1/20	A6 1/20	A10 1/20	N2 1/20	N6 1/20	N10 1/20

Fig. 15 – Mapa da microplaca de ELISA com as concentrações de 100 e 200ng de MEHCV e soros nas diluições 1/10 e 1/20. B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; C1 a C5 – Amostras anti-HCV positivas; B1 a B18 – Amostras anti-HBV positivas; A1 a A12 – Amostras anti-HAV positivas; N1 a N10 – Amostras negativas.

Em ambos os ensaios ocorreram resultados falso-negativos para apenas uma amostra anti-HCV positiva e vários resultados falso-positivos ou indeterminados para amostras anti-HBV e anti-HAV positivas e amostras negativas. Quase todos os valores das DO's dos CN não obedeceram ao critério de validação do kit comercial Wiener. A diferença entre os *cut-offs* dos ensaios foi relativamente pequena, com valor mais alto na concentração de 200ng.

		Média CN = 0,193 Média CP = 2,676		Cut-off = 0,343 0,309 > ZI > 0,377		Amostras Positivas > 0,377 Amostras Negativas < 0,309							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,618	0,001	1,277	2,248	0,001	1,550	2,784	2,707	0,003	2,694	2,588	
B	0,188	0,418	0,000	0,938	1,300	0,001	0,623	2,960	2,438	0,000	2,068	2,558	
C	0,197	2,913	0,020	1,144	0,001	0,165	0,003	2,044	0,967	0,566	0,001	2,831	
D	0,195	2,783	0,001	0,687	0,001	0,001	0,005	1,063	0,212	0,423	0,001	2,507	
E	2,624	2,351	0,546	0,040	2,626	0,002	2,416	2,659	2,914	1,983	0,006	2,439	
F	2,728	1,636	0,258	0,012	2,308	0,003	1,967	2,500	2,656	0,211	0,009	2,055	
G	2,203	0,170	2,606	2,611	0,221	0,516	1,801	2,397	2,493	1,834	0,767	1,882	
H	1,623	0,015	2,024	2,359	0,029	0,101	1,394	1,959	1,764	1,567	0,645	0,804	

Fig. 16 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 100ng. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

		Média CN = 0,255 Média CP = 2,743		Cut-off = 0,405 0,364 > ZI > 0,445		Amostras Positivas > 0,445 Amostras Negativas < 0,364							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	1,052	0,001	1,670	2,385	0,001	1,250	2,678	2,578	0,058	2,330	2,533	
B	0,335	0,737	0,001	0,143	1,267	0,002	0,653	2,819	2,711	0,001	1,665	2,581	
C	0,121	2,899	0,002	0,908	0,002	0,013	0,007	1,724	1,088	0,425	0,009	2,717	
D	0,308	2,873	0,001	0,110	0,002	0,005	0,004	0,946	0,433	0,012	0,007	2,461	
E	2,648	2,549	0,592	0,056	2,739	0,010	3,046	2,388	2,122	1,019	0,014	2,667	
F	2,837	1,582	0,054	0,002	3,041	0,015	2,719	1,755	1,769	0,070	0,011	2,890	
G	2,606	0,002	2,886	2,438	0,061	0,191	2,409	1,890	2,074	2,649	1,809	2,378	
H	2,171	0,011	1,521	1,703	0,009	0,014	1,540	1,469	1,437	2,262	0,306	0,792	

Fig. 17 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 200ng. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

3.8 Testes realizados com a proteína MEHCV purificada e dessalinizada

3.8.1 Padronização da concentração de proteína por cavidade e da diluição do soro

Realizado idem ao tópico 3.7.1 (Figura 18).

[] MEHCV		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25ng	A	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
25ng	B	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut - off		ZI
50ng	C	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
50ng	D	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut - off		ZI
100ng	E	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
100ng	F	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut - off		ZI
200ng	G	B	CN	CN	CN	CP	CP	1 1/5	1 1/10	1 1/20	2 1/5	2 1/10	2 1/20
200ng	H	3 1/5	3 1/10	3 1/20	4 1/5	4 1/10	4 1/20	5 1/5	5 1/10	5 1/20	Cut-off		ZI

Fig. 18 – Mapa da microplaca de ELISA para padronização da concentração de antígeno por cavidade e da diluição das amostras. B – Branco; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; ZI – Zona de Indeterminação.

Conforme a figura abaixo, os resultados das médias dos CN em todas as concentrações e as médias do CP nas concentrações protéicas de 25, 50 e 100ng ficaram fora do critério de validação estabelecido pelo kit Wiener. Houve resultados falso-negativos para as amostras 3, 4 e 5 em todas as concentrações de antígeno. A amostra 2 apresentou resultados verdadeiro-positivos apenas na concentração protéica de 100 e 200ng com diluição do soro 1/5. Já a amostra 1 apresentou resultados verdadeiro-positivos em todas as diluições e concentrações. Todas as amostras apresentaram um padrão de resposta.

[] MEHCV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25ng A	0,000	0,257			0,002		2,636	2,183	1,371	0,005	0,004	0,002
25ng B	0,007	0,002	0,002	0,022	0,002	0,002	0,007	0,001	0,001	Cut-off 0,407		0,366 < Z.I. < 0,448
50ng C	0,000	0,352			0,045		2,490	2,103	1,277	0,033	0,006	0,006
50ng D	0,004	0,001	0,000	0,064	0,002	0,001	0,004	0,001	0,000	Cut-off 0,502		0,452 < Z.I. < 0,552
100ng E	0,000	0,377			0,479		2,776	2,421	1,694	0,667	0,030	0,010
100ng F	0,014	0,012	0,008	0,083	0,009	0,001	0,012	0,008	0,003	Cut-off 0,527		0,474 < Z.I. < 0,580
200ng G	0,000	0,386			1,474		2,656	1,878	1,288	1,365	0,248	0,014
200ng H	0,025	0,010	0,010	0,137	0,006	0,002	0,012	0,002	0,001	Cut-off 0,536		0,482 < Z.I. < 0,590

Fig. 19 – Resultado das DO's da microplaca de ELISA para padronização da concentração da proteína MEHCV salinizada por cavidade e diluição das amostras.

3.8.2 MEHCV na concentração de 200ng e soros nas diluições 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40

Devido ao maior número de amostras com resultados verdadeiro-positivos, foram realizados novos testes com concentração de antígeno de 200ng com amostras anti-HCV, anti-HBV e anti-HAV positivas e amostras negativas. Foram sensibilizadas duas placas. Na primeira foram realizadas as diluições dos soros 1/5 e 1/10 e na segunda, 1/20 e 1/40 (Figuras 20 e 21). Foi utilizado o mesmo protocolo presente no item 3.3, exceto pelo diluente de amostra (PBS).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C2 1/5	B1 1/5	B5 1/5	B9 1/5	B13 1/5	B17 1/5	A3 1/5	A7 1/5	A11 1/5	N3 1/5	N7 1/5
B	CN	C2 1/10	B1 1/10	B5 1/10	B9 1/10	B13 1/10	B17 1/10	A3 1/10	A7 1/10	A11 1/10	N3 1/10	N7 1/10
C	CN	C3 1/5	B2 1/5	B6 1/5	B10 1/5	B14 1/5	B18 1/5	A4 1/5	A8 1/5	A12 1/5	N4 1/5	N8 1/5
D	CN	C3 1/10	B2 1/10	B6 1/10	B10 1/10	B14 1/10	B18 1/10	A4 1/10	A8 1/10	A12 1/10	N4 1/10	N8 1/10
E	CP	C4 1/5	B3 1/5	B7 1/5	B11 1/5	B15 1/5	A1 1/5	A5 1/5	A9 1/5	N1 1/5	N5 1/5	N9 1/5
F	CP	C4 1/10	B3 1/10	B7 1/10	B11 1/10	B15 1/10	A1 1/10	A5 1/10	A9 1/10	N1 1/10	N5 1/10	N9 1/10
G	C1 1/5	C5 1/5	B4 1/5	B8 1/5	B12 1/5	B16 1/5	A2 1/5	A6 1/5	A10 1/5	N2 1/5	N6 1/5	N10 1/5
H	C1 1/10	C5 1/10	B4 1/10	B8 1/10	B12 1/10	B16 1/10	A2 1/10	A6 1/10	A10 1/10	N2 1/10	N6 1/10	N10 1/10

Fig. 20 – Mapa da microplaca de ELISA na concentração de 200ng de MEHCV e soros nas diluições 1/5 e 1/10. B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; C1 a C5 –

Amostras anti-HCV positivas; B1 a B18 – Amostras anti-HBV positivas; A1 a A12 – Amostras anti-HAV positivas; N1 a N10 – Amostras negativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C2 1/20	B1 1/20	B5 1/20	B9 1/20	B13 1/20	B17 1/20	A3 1/20	A7 1/20	A11 1/20	N3 1/20	N7 1/20
B	CN	C2 1/40	B1 1/40	B5 1/40	B9 1/40	B13 1/40	B17 1/40	A3 1/40	A7 1/40	A11 1/40	N3 1/40	N7 1/40
C	CN	C3 1/20	B2 1/20	B6 1/20	B10 1/20	B14 1/20	B18 1/20	A4 1/20	A8 1/20	A12 1/20	N4 1/20	N8 1/20
D	CN	C3 1/40	B2 1/40	B6 1/40	B10 1/40	B14 1/40	B18 1/40	A4 1/40	A8 1/40	A12 1/40	N4 1/40	N8 1/40
E	CP	C4 1/20	B3 1/20	B7 1/20	B11 1/20	B15 1/20	A1 1/20	A5 1/20	A9 1/20	N1 1/20	N5 1/20	N9 1/20
F	CP	C4 1/40	B3 1/40	B7 1/40	B11 1/40	B15 1/40	A1 1/40	A5 1/40	A9 1/40	N1 1/40	N5 1/40	N9 1/40
G	C1 1/20	C5 1/20	B4 1/20	B8 1/20	B12 1/20	B16 1/20	A2 1/20	A6 1/20	A10 1/20	N2 1/20	N6 1/20	N10 1/20
H	C1 1/40	C5 1/40	B4 1/40	B8 1/40	B12 1/40	B16 1/40	A2 1/40	A6 1/40	A10 1/40	N2 1/40	N6 1/40	N10 1/40

Fig. 21 – Mapa da microplaca de ELISA na concentração de 200ng de MEHCV e soros nas diluições 1/20 e 1/40. B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; C1 a C5 – Amostras anti-HCV positivas; B1 a B18 – Amostras anti-HBV positivas; A1 a A12 – Amostras anti-HAV positivas; N1 a N10 – Amostras negativas.

Os CN e CP funcionaram de acordo com o critério de validação do kit comercial e as amostras 1 e 4 diluídas 1/10, 1/20 e 1/40 apresentaram resultados falso-negativos. Ocorreram também, vários resultados falso-positivos para as amostras anti-HBV, anti-HAV positivas e para as amostras negativas, demonstrando a presença de reações cruzadas ou inespecíficas (Figuras 22 e 23).

Média CN = 0,022		Cut-off = 0,172		Amostras Positivas > 0,189								
Média CP = 2,290		0,155 > ZI > 0,189		Amostras Negativas < 0,155								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	2,343	0,000	1,890	2,257	0,004	1,944	2,751	2,388	0,004	2,383	2,537
B	0,050	1,612	0,000	1,531	1,398	0,003	1,038	2,549	2,191	0,003	1,310	2,270
C	0,005	2,811	0,002	2,347	0,007	0,010	0,013	2,734	0,998	0,753	0,003	2,561
D	0,012	2,448	0,001	1,057	0,006	0,004	0,016	1,622	0,141	0,038	0,003	2,423
E	2,324	1,054	0,561	0,010	2,527	0,017	2,020	2,296	2,416	1,975	0,002	2,482
F	2,256	0,025	0,044	0,005	2,206	0,010	1,689	1,924	2,041	1,260	0,001	2,088
G	1,103	2,535	2,489	2,659	0,020	0,030	1,375	1,906	1,733	2,306	1,348	1,910
H	0,022	1,940	2,265	2,376	0,024	0,008	1,083	1,557	0,683	1,825	0,515	0,480

Fig. 22 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 200ng de antígeno e diluições dos soros 1/5 e 1/10. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

		Média CN = 0,001 Média CP = 1,752		Cut-off = 0,151 0,136 > ZI > 0,166		Amostras Positivas > 0,166 Amostras Negativas < 0,136							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	1,199	0,004	0,288	1,157	0,007	0,413	2,581	2,145	0,002	0,740	2,311	
B	0,001	0,247	0,006	0,138	1,001	0,004	0,133	2,858	2,276	0,004	0,292	2,094	
C	0,001	2,577	0,009	0,182	0,000	0,016	0,003	0,564	0,039	0,004	0,011	2,654	
D	0,001	1,871	0,009	0,127	0,000	0,014	0,004	0,305	0,002	0,010	0,011	2,295	
E	1,818	0,007	0,025	0,001	2,846	0,023	2,606	2,635	2,566	0,594	0,022	2,543	
F	1,685	0,006	0,034	0,000	2,677	0,032	2,057	2,117	2,182	0,275	0,034	2,306	
G	0,008	2,950	2,250	2,540	0,005	0,025	1,782	2,327	1,622	2,655	0,272	0,303	
H	0,000	2,684	1,708	1,494	0,005	0,043	0,662	1,670	0,766	2,139	0,290	0,002	

Fig. 23 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 200ng de antígeno e diluições do soro 1/20 e 1/40. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

3.8.3 MEHCV nas concentrações de 400e 600ng e soros nas diluições 1/10 e 1/20

Devido os resultados falso-negativos ocorridos nas placas com concentração de 200ng, optou-se em realizar o mesmo ensaio em placas sensibilizadas com 400 e 600ng e com as amostras diluídas 1/10 e 1/20. Esse procedimento foi realizado de acordo com o item 3.3, sendo utilizado agora, como diluente da amostra, o tampão PBS. A figura 24 mostra a disposição das amostras nas microplacas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C2 1/10	B1 1/10	B5 1/10	B9 1/10	B13 1/10	B17 1/10	A3 1/10	A7 1/10	A11 1/10	N3 1/10	N7 1/10
B	CN	C2 1/20	B1 1/20	B5 1/20	B9 1/20	B13 1/20	B17 1/20	A3 1/20	A7 1/20	A11 1/20	N3 1/20	N7 1/20
C	CN	C3 1/10	B2 1/10	B6 1/10	B10 1/10	B14 1/10	B18 1/10	A4 1/10	A8 1/10	A12 1/10	N4 1/10	N8 1/10
D	CN	C3 1/20	B2 1/20	B6 1/20	B10 1/20	B14 1/20	B18 1/20	A4 1/20	A8 1/20	A12 1/20	N4 1/20	N8 1/20
E	CP	C4 1/10	B3 1/10	B7 1/10	B11 1/10	B15 1/10	A1 1/10	A5 1/10	A9 1/10	N1 1/10	N5 1/10	N9 1/10
F	CP	C4 1/20	B3 1/20	B7 1/20	B11 1/20	B15 1/20	A1 1/20	A5 1/20	A9 1/20	N1 1/20	N5 1/20	N9 1/20
G	C1 1/10	C5 1/10	B4 1/10	B8 1/10	B12 1/10	B16 1/10	A2 1/10	A6 1/10	A10 1/10	N2 1/10	N6 1/10	N10 1/10
H	C1 1/20	C5 1/20	B4 1/20	B8 1/20	B12 1/20	B16 1/20	A2 1/20	A6 1/20	A10 1/20	N2 1/20	N6 1/20	N10 1/20

Fig. 24 – Mapa da microplaca de ELISA para as concentrações de 400 e 600ng de MEHCV e soros nas diluições 1/10 e 1/20. B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; C1 a C5 – Amostras anti-HCV positivas; B1 a B18 – Amostras anti-HBV positivas; A1 a A12 – Amostras anti-HAV positivas; N1 a N10 – Amostras negativas.

Os valores das DO's dos CN e CP ficaram dentro das regras de validação utilizado pelo kit comercial. O número de resultados falso-negativos diminuiu em relação à concentração de 200ng, enquanto que, os resultados falso-positivos continuaram ocorrendo em grande número, tanto para as amostras anti-HBV e anti-HAV positivas quanto para as amostras negativas.

Média CN = 0,087 Média CP = 2,877		Cut-off = 0,237 0,213 > ZI > 0,261		Amostras Positivas > 0,261 Amostras Negativas < 0,213								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	2,550	0,105	1,306	2,160	0,024	1,386	2,974	2,510	0,034	2,794	2,278
B	0,085	2,312	0,002	0,559	1,278	0,002	1,075	2,809	2,450	0,004	1,873	2,734
C	0,059	2,865	0,116	1,389	0,130	0,061	0,001	2,244	1,306	1,051	0,005	2,771
D	0,116	2,540	0,050	1,099	0,002	0,002	0,000	1,731	0,605	0,551	0,006	2,588
E	2,877	0,725	0,748	0,137	2,923	0,005	2,744	2,657	2,514	1,743	0,311	2,595
F	2,876	0,229	0,672	0,022	2,844	0,006	2,661	2,496	2,400	0,611	0,016	2,152
G	1,223	2,583	2,760	2,738	0,025	0,246	2,494	2,671	2,214	2,258	0,933	1,214
H	0,248	1,989	2,261	2,156	0,022	0,005	1,659	2,116	1,589	1,763	0,113	0,192

Fig. 25 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 400ng de antígeno e diluições do soro 1/10 e 1/20. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

		Média CN = 0,083 Média CP = 2,632		Cut-off = 0,233 0,210 > ZI > 0,256		Amostras Positivas > 0,256 Amostras Negativas < 0,233							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0,000	2,593	0,002	0,777	1,015	0,001	0,796	2,443	2,487	0,000	2,084	2,752
B		0,083	1,752	0,002	0,182	0,377	0,002	0,431	2,478	2,420	0,001	1,586	2,736
C		0,146	2,682	0,000	0,666	0,001	0,003	0,002	0,777	0,481	0,243	0,007	2,517
D		0,021	1,951	0,000	0,005	0,002	0,003	0,001	0,464	0,177	0,061	0,012	2,209
E		2,586	0,284	0,101	0,019	2,797	0,008	2,690	2,570	2,697	1,279	0,023	2,655
F		2,677	0,007	0,057	0,019	2,615	0,008	2,783	2,334	2,257	0,268	0,034	2,678
G		1,304	2,752	2,611	2,331	0,012	0,010	2,235	2,324	2,040	2,818	0,675	1,718
H		0,461	2,523	2,487	1,707	0,015	0,010	1,550	1,781	1,778	2,138	0,123	1,332

Fig. 26 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 600ng de antígeno e diluições do soro 1/10 e 1/20. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

3.9 Teste realizado com o kit comercial Wiener LAb

O teste com o kit comercial foi realizado para certificar de que as reações inespecíficas não estavam sendo causadas pelas amostras. Foram utilizadas somente as amostras anti-HBV e anti-HAV anteriormente testadas, diluídas 1/21 em solução diluente do kit comercial. A figura abaixo mostra o mapa da distribuição das amostras na microplaca. O procedimento foi realizado de acordo com o item 3.3, exceto a parte de sensibilização e bloqueio da microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B3	B11	A1	A11							
B	CN	B4	B12	A2	A12							
C	CN	B5	B13	A4								
D	CN	B6	B14	A6								
E	CP	B7	B15	A7								
F	CP	B8	B16	A8								
G	B1	B9	B17	A9								
H	B2	B10	B18	A10								

Fig. 27 – Mapa da microplaca de ELISA da Wiener Lab. B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; B1 a B18 – Amostras anti-HBV positivas; A1 a A12 – Amostras anti-HAV positivas.

De acordo com o resultado do teste (Figura 28), as amostras testadas não apresentaram reações inespecíficas com o teste comercial; portanto, são amostras anti-HCV negativas. A única exceção foi a amostra anti-HBV positiva de número 3, que apresentou um resultado falso-positivo, possivelmente por interferentes presentes na mesma.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,703	0,000	0,010	0,005							
B	0,006	0,008	0,096	0,020	0,007			Média CN = 0,011 Média CP = 2,210 Cut-off = 0,161 0,145 > ZI > 0,177 Amostras Positivas > 0,177 Amostras Negativas < 0,145				
C	0,009	0,017	0,012	0,030								
D	0,018	0,013	0,018	0,005								
E	2,352	0,017	0,014	0,004								
F	2,068	0,002	0,002	0,008								
G	0,002	0,014	0,057	0,006								
H	0,007	0,003	0,006	0,011								

Fig. 28 – Valores das DO's da microplaca de ELISA da Wiener Lab.

3.10 Parâmetros de validação do ELISA *in house*

Os parâmetros de validação foram realizados idem ao tópico 3.5. Para os cálculos desses parâmetros foram selecionados os resultados da microplaca de ELISA com concentração de 200ng da proteína MEHCV purificada e diluição do soro 1/20 e da microplaca com concentração de 600ng e diluição 1/20. Essas foram selecionadas por apresentarem um número menor de falso-resultados. Como o número de resultados falso-negativos e falso-positivos foi igual em ambas as concentrações, apenas uma foi escolhida.

Tabela 3 – Combinação binária entre os resultados obtidos no ELISA utilizando uma concentração de 200ng da proteína MEHCV purificada e diluição do soro 1/20 e o diagnóstico verdadeiro da doença

Teste	DOENÇA - Diagnóstico Verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	4	21
Negativo	1	19
Total	5	40

Os valores obtidos foram:

- ♦ Sensibilidade = 80%
- ♦ Especificidade = 47,5%
- ♦ Eficiência = 57,5%
- ♦ VPP = 16%
- ♦ VPN = 95%

3.11 Avaliação de interferência por proteínas inespecíficas

Devido ao grande número de reações cruzadas com amostras anti-HBV e anti-HAV positivas e amostras negativas, foi realizado um teste para avaliar se as proteínas inespecíficas traduzidas a partir da seqüência gênica do vetor plasmidial pET21a eram as responsáveis por esse tipo de reação.

A obtenção dessas proteínas foi realizada através da indução do vetor plasmidial pET21a em *E. coli* BL21 DE3 (pLysS). Em seguida, essas proteínas foram quantificadas através da reação de Bradford. A concentração final foi de 730µg/mL.

Uma microplaca de ELISA foi então sensibilizada com a concentração de 200ng/cavidade e foram testadas amostras anti-HCV, anti-HBV, anti-HAV positivas e amostras negativas, diluídas 1/20, conforme o mapa abaixo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C3	B1	B9	B17	A7	N3					
B	CN	C4	B2	B10	B18	A8	N4					
C	CN	C5	B3	B11	A1	A9	N5					
D	CN	C6	B4	B12	A2	A10	N6					
E	CP	C7	B5	B13	A3	A11	N7					
F	CP	C8	B6	B14	A4	A12	N9					
G	C1	C9	B7	B15	A5	N1	N10					
H	C2	C10	B8	B16	A6	N2	N11					

Fig. 29 – Mapa da microplaca de ELISA sensibilizada com 200ng de proteínas inespecíficas e com diluição sorológica 1/20. B – Branco; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; C1 a C10 – Amostras anti-HCV positivas; B1 a B18 – Amostras anti-HBV positivas; A1 a A12 – Amostras anti-HAV positivas; N1 a N10 Amostras negativas.

A figura 30 mostra os resultados desse ensaio. As médias das DO's dos CN e CP se mostraram fora dos critérios de validação; e devido à alta DO da média dos CN, o valor do *cut-off* se apresentou alto. De acordo com ele, ocorreram 1 resultado falso-positivo para amostras anti-HCV positiva, 6 e 9 falso-positivos para amostras anti-HBV e anti-HAV, respectivamente; e 4 falso-positivos para amostras negativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	2,342	0,355	1,562	1,044	1,872	1,756					
B	1,743	0,481	0,651	0,093	0,091	1,833	0,005		Média CN = 1,542 Média CP = 0,008 Cut-off = 1,692 1,523 > ZI > 1,861 Amostras Positivas > 1,861 Amostras Negativas < 1,523			
C	1,360	0,585	1,886	2,299	2,509	2,290	0,284					
D	1,524	0,057	2,332	1,636	1,477	1,528	0,688					
E	0,014	0,696	0,890	0,017	2,374	1,501	2,748					
F	0,002	1,147	0,729	0,920	1,846	0,997	2,014					
G	0,388	0,429	0,592	0,584	2,135	0,648	1,165					
H	0,914	0,099	2,078	1,219	1,660	1,925	1,203					

Fig. 30 – Valores das DO's da microplaca de ELISA sensibilizada com 200ng de proteínas inespecíficas e diluição do soro 1/20. Valores alterados de acordo com a validação do kit Wiener Lab, em negrito.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o desempenho do kit diagnóstico imunoenzimático *in house* para detecção de anticorpos contra o HCV utilizando a proteína recombinante MEHCV como antígeno e um pool de soros negativos, anti-HCV, anti-HBV e anti-HAV positivos. As microplacas de ELISA foram cobertas por três tipos de proteína MEHCV.

A primeira proteína usada foi purificada por inversão e centrifugação em resina de níquel, dialisada e diluída em tampão de bicarbonato de amônio 50mM pH 6,5, sendo utilizado na sensibilização das microplacas, um volume de 200µL por cavidade. Ishida *et al.* (1993) e Dipti *et al.* (2006) ao contrário, realizaram a sensibilização das microplacas aplicando 100µL de proteína recombinante diluída em tampão carbonato 0,1M pH 9,5 e 100µL de peptídeo sintético dissolvido em tampão bicarbonato de sódio 0,01M pH 9,55, respectivamente. Embora tenha sido utilizado um tampão de pH ácido, a sensibilização das microplacas foi adequada.

A segunda proteína utilizada na sensibilização das microplacas de ELISA foi purificada em coluna de níquel. A terceira, além de purificada em coluna, foi dessalinizada. Ambas as proteínas foram diluídas em tampão carbonato de sódio, pH 9,5 e o volume utilizado na sensibilização foi de 100µL por cavidade. A utilização do tampão e do volume de antígeno por cavidade foi devido às descrições presentes na literatura, por Dipti *et al* (2006). A mudança do diluente de amostra comercial para o PBS foi realizada devido os resultados das DO's das amostras diluídas com o segundo não apresentarem interferências.

Nas etapas de padronização da concentração da proteína e da diluição das amostras, bem como na de comparação do kit *in house* com o kit comercial, foram utilizados alguns reagentes da Wiener como: tampão de lavagem, diluente de amostra (em alguns casos), conjugado, reveladores A e B e solução *stopper*. A utilização dos mesmos foi realizada para que não fossem acrescentadas ao teste outras variáveis.

Dos ensaios com menor número de resultados errôneos para cada uma das proteínas utilizadas (figura 8, 17 e 26 com diluição do soro 1/20), se

observou que a concentração da proteína 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.

Em todos os ensaios ocorreram resultados errôneos: falso-negativos em amostras anti-HCV positivas e falso-positivos ou indeterminados em amostras anti-HBV e anti-HAV positivas e amostras negativas (exceto o ensaio da figura 8). O fato de a proteína MEHCV ter sido purificada por cromatografia de afinidade em resina por meio de inversão e centrifugação; e não em coluna, como realizado por Dipti *et al.* (2006), poderia explicar a falta de especificidade do teste, visto que após a purificação da proteína MEHCV ainda pôde-se observar em gel de poliacrilamida (Figura 4), consideráveis resquícios de proteínas inespecíficas. Porém, os ensaios subseqüentes, realizados com proteína MEHCV purificada em coluna de níquel, apresentaram resultados aquém dos ensaios utilizando a proteína purificada em resina de níquel. Isto porque os últimos ensaios realizados com a proteína mais pura, além de apresentarem resultados falso-positivos para amostras anti-HAV e anti-HBV positivas, também apresentaram para amostras negativas. A ocorrência de resultados falso-negativos pode ser explicada devido à baixa sensibilidade apresentada pelo kit, principalmente quando se utilizou a proteína MEHCV purificada em coluna.

O presente estudo realizou ensaios com a MEHCV purificada em resina. Esses ensaios apresentaram uma sensibilidade (92,86%) e especificidade (82,89%) superior aos ensaios realizados com a proteína purificada em coluna (Sensibilidade = 80%; Especificidade = 47,5%). O decréscimo do restante dos parâmetros de validação também foi observado.

Um estudo de Houghton *et al* (2002), utilizando as proteínas multiepítipo TbF6 e TbF6-DPEP para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium tuberculosis*, também apresentou sensibilidade e especificidade variáveis. Através de testes com 105 amostras positivas e 39 negativas, 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. Esse, porém, ao contrário do presente estudo, baseou a montagem da proteína multiepítipo de acordo com a reatividade individual de cada proteína.

Outros estudos, porém, apresentaram elevada sensibilidade e especificidade. Dipti *et al* (2006), testando a proteína multiepítipo r-HCV-F-MEP para detecção de anticorpos anti-HCV apresentaram sensibilidade (99,8%) e especificidade (100%) similares a kit comerciais. Foram testadas nesse estudo 200 amostras anti-HCV positivas, 100 anti-HCV negativas e 100 amostras de pacientes com tuberculose, HIV, hepatite B, sífilis, artrite reumatóide e proteína C reativa. AnandaRao *et al* (2005), utilizando a r-DME-G para auxiliar no diagnóstico da dengue através da captura de anticorpos específicos, apresentaram uma sensibilidade de 100%.

Em ambos os estudos, a purificação das proteínas foi realizada de maneira semelhante à proteína do presente estudo: em coluna, por cromatografia de afinidade. Entretanto, a proteína MEHCV não obteve um grau de pureza comparável às poliproteínas desses estudos, superior a 95%.

Portanto, as reações cruzadas nos ensaios com a proteína recombinante MEHCV podem ainda estar ocorrendo devido ao baixo grau de pureza da proteína. Os resultados do ensaio utilizando as proteínas inespecíficas expressas a partir da seqüência gênica do vetor pET21a ajudam a corroborar tal hipótese.

5 CONCLUSÃO

1 O kit *in house* para detecção de anticorpos anti-HCV ainda não foi padronizado, visto a falta de especificidade apresentada pela proteína recombinante MEHCV;

2 A proteína MEHCV, utilizada como antígeno para ensaios de detecção de anticorpos anti-HCV, não apresentou o grau de pureza ideal.

3 Como perspectiva, seria interessante a realização de ensaios utilizando microplacas sensibilizadas com cada uma das regiões da proteína recombinante MEHCV separadamente, para avaliar o grau de antigenicidade individual.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, Johnson RG, Barbosa LH, Nemo GJ. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325(19):1325-9.

Abdulkarim AS, Zein NN, Germer JJ, Kolbert CP, Kabbani L, Krajnik KL, Hola A, Agha MN, Tourogman M, Persing DH. Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C virus subtypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1998;59(4):571-6.

Al Dhahry SHS, Nogales JC, Rajapkse AMWWB, Al Toqi FSS, Kaminsky GZ. Laboratory diagnosis of viral hepatitis C The Sultan Qaboos University Hospital experience. *Squ. J. Scient Res.: Med. Scie* 2003;5(1-2):15-20.

Alter HJ. New kit on the block: Evaluation of a second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus [editorial]. *Hepatology* 1992;15(2):350-3.

Amorim RMS, Oliveira CP, Wyant PS, Cerqueira DM, Câmara GNL, Flores LS, Martins RMB, Martins CRF. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(8):895-7.

AnandaRao R, Swaminathan S, Feranado S, Jana AM, Khanna N. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Prot Exp and Pur* 2005;41:136-147.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994;68:5045-55.

Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol* 2000;81:1631-48.

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197(5):633-42.

Beld M, Sentjens R, Rebers S, Weegink C, Weel J, Sol C, Boom R. Performance of the new bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantification of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the roche COBAS amplicor HVC monitor, version 2.0, assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:788-93.

Benvegnù L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997;25(1):211-5.

Borowski P, Heiland M, Feucht H, Laufs R. Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch Virol* 1999a;144:687-701.

Borowski P, Kuhl R, Laufs R, Schulze zur Wiesch J, Heiland M. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J Clin Virol* 1999b;13(4):61-9.

Brandão ABM, Fuchs SC, Silva MAA, Emer LF. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. *Rev Pan Sal Pub* 2001;9(3):161-8.

Brechot C. Hepatitis C virus: molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 1996;41 Suppl 12:6S-21S.

Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomao A, Correa-Oliveira R, Oliveira GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(6):775-8.

Carithers RL Jr, Marquardt A, Gretch DR. Diagnostic Testing for Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000;20(2):159-71.

Carneiro MAS, Martins RMB, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DDP, Vanderborcht BOM, Yoshida CFT. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(6):765-9.

Cha TA, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chien D, Kuo G, Urdea MS. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(15):7144-8.

Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott RM. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J Gen Virol* 1997;78:1341-7.

Chien DY, Arcangel P, Medina-Selby A, Coit D, Baumeister M, Nguyen S, George-Nascimento C, Gyenes A, Kuo G, Valenzuela P. Use of a novel hepatitis C virus (HCV) major-epitope chimeric polypeptide for diagnosis of HCV infection. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1393-7.

Choo Q.L, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:2451-5.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.

Di Bisceglie AMD. Hepatitis C – virology and future antiviral targets. *Am J Med* 1999;107(6 Suppl 2):45-8.

Di Bisceglie AMD. Hepatitis C. *Lancet* 1998;351:351-5.

Dipti CA, Jain SK, Navin K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. *Protein Expression and Purification* 2006;47:319-28.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *Journal of Hepatology* 1999;31 Suppl 1:3-8.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.

Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2^a ed Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2001.

Feucht HH, Schröter M, Zöllner B, Polywka S, Nolte H, Laufs R. The influence of age on the prevalence of hepatitis C virus subtypes 1a and 1b. *J infect Dis* 1997;175(3):685-8.

Germer JJ, Heimgartner PJ, Ilstrup DM, Harsem WS, Jenkins GD, Patel R. Comparative evaluation of the VERSANT HCV RNA 3.0, QUANTIPLEX HCV RNA 2.0, and COBAS AMPLICOR HCV MONITOR version 2.0 assays for quantification of hepatitis C virus RNA in serum. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):495-500.

Gretch DR, Bacchi CE, Corey L, Dela Rosa C, Lesniewsky RR, Kowdley K, Gown A, Frank I, Perkins JD, Carithers RL. Persistent hepatitis C virus infection after liver transplantation: Clinical and virological features. *Hepatology* 1995;22:1-9.

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

Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, Reynolds LD, Day CH, McNeill PD, Hendrickson RC, Skeiky YAW, Sampaio DP, Badaro R, Lyashchenko KP, Reed SG. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(4):883-91.

LHP Laboratório Hermes Pardini. *Hepatites Virais – Atualização 2005. Diagnóstico e Monitoração Laboratorial*; 2005, Brasil.

Ishida C, Matsumoto K, Fukada K, Matsushita K, Shiraki H, Maeda Y. Detection of Antibodies to Hepatitis C Virus (HCV) Structural Proteins in Anti-HCV-Positive Sera by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Synthetic Peptides as Antigens. *J Clin Microb* 1993;31(4):936-40.

Ishido S, Hotta H. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *Fed Eur Biochem Sci Lett* 1998;438:258-62.

Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(24):9524-8.

Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55(3):133-59.

Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeir G, Nelles M, Lee S, Page E, Wilber J, Polito A. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 1992;32(9): 805-13.

Lau JYN, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, Mizokami M, Simmonds P. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. Hepatitis Interventional Therapy Group. *Ann Intern Méd* 1996;124(10):868-76.

Lee RS, Wood CL, Lane MJ, Francis B, Gust C, Higgs CM, Nelles MJ, Polito A, DiNello R, Achord D. Increased detection of hepatitis C virus infection in commercial plasma donors by a third-generation screening assay. *Transfusion* 1995;35(10):845-9.

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* 1997;71:8416-28.

Major Me, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;25:1527-38.

Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S47-56.

Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hep* 1999;31 Suppl 1:9-16.

Martins RMB, Vanderborght BO, Yoshida CFT. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(3):299-300.

Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine* 1999;17:1730-3.

McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Vir Hep* 2000;7:2-14.

Mikawa AY. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C [Dissertação]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista; 2006.

MS Ministério da Saúde. Hepatite Viral Crônica C 2003.

Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hep* 1999;31 Suppl 1:65-70.

Moraes CR. Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients and workers. A case-control study in Santa Catarina State dialysis units. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001;43(2):66

Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992;73(Pt 3):673-9.

Op de Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 2001;82:2589-95.

Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):6104-8.

Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998;27(6):1700-2.

Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995;171(6):1607-10.

Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biology of the Cell* 2004;96:103-8.

Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C. *J Mol Biol* 2001;313:451-64.

Santana GO, Cotrim HP, Mota E, Paraná R, Santana NP, Lyra L. Anticorpo contra o vírus C da hepatite em pacientes sob programa de hemodiálise em Salvador, BA, Brasil. *Arq Gastroenterol* 2001;38(1):24-31.

Schiff ER, Medina M, Kahn RS. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Sem Liver Dis* 1999;9:3-5.

Silva CMD, Rossetti MLR. Hepatite C e testes diagnósticos. *Caderno de Farmácia* 2001;17(2):111-5.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan S-W, Chayama K, Chen D-S, Choo Q-L, Colombo M, Cuypers HTM, Date T, Geoff MD, Esteban JI, Fay O, Hadziyannis SJ, Han J, Hatzakis A, Holmes EC, Hotta H, Houghton M, Irvine B, Kohara M, Kolberg JA, Kuo G, Lau JYN, Lelie PN, Maertens G, McOmish F, Miyamura T, Mizokami M, Nomoto A, Prince AM, Reesink HW, Rice C, Roggendorf M, Schalm SW, Shikata T, Shimothno K, Stuyver L, Trépo C, Weiner A, Yap PL, Urdea MS. A

proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-4.

Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. 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* 1993;74:661-8.

Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997;78:321-8.

SPI Sociedade Paulista de Infectologia. II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepetite C; 2004; São Paulo, Brasil.

Stumpf MPH, Pybus OG. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. *FEMS Microbiol. Lett* 2002;214:143-52.

Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 6):1093-102.

Taylor DR, Shi ST, Lai MM. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes Infect* 2000;2:1743-56.

Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 1992;66(3):1476-83.

Valente VB, Covas DT, Passos ADC. Marcadores sorológicos das hepatites B e C em doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(6):488-92.

Valente VB. Estudo da Distribuição dos Marcadores Sorológicos das Hepatites B e C Entre Doadores de Sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP. [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2002.

Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. J Virol 1993;67(6):3338-44.

Wong T, Lee SS. Hepatitis C: a review for primary care physicians. CMAJ 2006;174(5):649-59.

WHO World Health Organization. Hepatitis C - global prevalence (update). Weekly Epidemiological Record 1999;74:425-7.

WHO World Health Organization. Hepatitis C 2003. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>.

WHO World Health Organization. Initiative for Vaccine Research (IVR): Hepatitis C. 2006. Disponível em: [file:///C:/Meus%20Documentos/UCG/Mestrado/Projeto%20HCV/Disserta%E7%E3o/Bibliografia%20utilizada/Impressos/Initiative%20for%20Vaccine%20Research%20\(IVR\)%20-%20Hepatitis%20C.htm](file:///C:/Meus%20Documentos/UCG/Mestrado/Projeto%20HCV/Disserta%E7%E3o/Bibliografia%20utilizada/Impressos/Initiative%20for%20Vaccine%20Research%20(IVR)%20-%20Hepatitis%20C.htm).

Yamashita T, Kaneko S, Shirota Y, Qin W, Nomura T, Kobayashi K, Murakami S. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. J Biol Chem 1998;273(25):15479-86.

Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi S, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The Native Form and Maturation Process of Hepatitis C Virus Core Protein. J Virol 1998;72(7):6048-55.

Zemel R, Gerechet S, Greif H, Bachmatove L, Birk Y, Golan-Goldhirsh A, Kunin M, Berdichevsky Y, Benhar I, Tur-Kaspa R. Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. *J Viral Hepat* 2001;8:96-102.