

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA USO NO
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C**

CHRISTIANE TEIXEIRA PINTO

Rio de Janeiro

2019



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CHRISTIANE TEIXEIRA PINTO

**Avaliação de proteínas recombinantes para uso no diagnóstico da
hepatite C**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências, Tecnologia
de Imunobiológicos.

**RIO DE JANEIRO
2019**

Pinto, Christiane Teixeira.

Avaliação de proteínas recombinantes para uso no diagnóstico da hepatite C / Christiane Teixeira Pinto. - Rio de Janeiro, 2019.
xvii, 126 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2019.

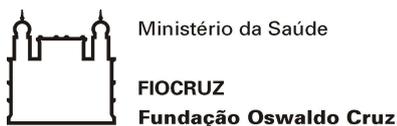
Orientadora: Nara Mazarakis Rubim.

Co-orientadora: Aline Rodrigues Bernardo.

Bibliografia: f. 91-105

1. hepatite C. 2. HCV. 3. proteínas recombinantes. 4. teste rápido. 5. diagnóstico. I. Título.

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica sob a orientação da Dr^a Nara Mazarakis Rubim e da Dr^a Aline Rodrigues Bernardo.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CHRISTIANE TEIXEIRA PINTO

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA USO NO
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C**

Orientadoras: Dr^a. Nara Mazarakis Rubim e Dr^a. Aline Rodrigues Bernardo

Examinadores:

Dr^a. Christiane de Fátima Silva Marques
Fiocruz / Presidente

Dr^a. Lívia Melo Villar
Fiocruz

Dr^a. Karen Soares Trinta
Fiocruz

RIO DE JANEIRO
2019

Dedico este trabalho aos meus amados pais Marcia e Julio, ao meu querido avô Teixeira e à Tia Fatinha pelo constante apoio, carinho, amor e cuidado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as graças, proteção e desafios que coloca em meu caminho.

Aos meus pais Marcia Lopes Teixeira Pinto e Julio Cesar Cabral Pinto que sempre se dedicaram para que eu tivesse a melhor educação possível. Agradeço todos os ensinamentos, incentivos, paciência e carinho. Amo vocês.

Ao meu avô Basílio Teixeira e à minha tia Fátima Gomes por todo cuidado e amor.

A todos os familiares, tios, primos e amigos da família que sempre torceram por mim.

Aos meus amigos Fernanda Teixeira e Rafael Macedo por toda palavra de carinho, orientação, amizade e apoio constante.

Às minhas amigas Michelly Marques, Elaine Marques e Aline Lima pela amizade e incentivo.

À Mônica Borba por sempre me lembrar que era possível e que eu conseguiria.

À Fundação Oswaldo Cruz e à Bio-Manguinhos por terem permitido meu desenvolvimento profissional e acadêmico.

Ao Antônio Barbosa e à Elaine Teles pela autorização para a realização do curso e ao Luiz Lima e à Carla Wolanski pela compreensão e apoio para a finalização deste estudo.

Ao Raouf Sykora, à Dipps e ao Lacen/Rio pelo suporte dado ao trabalho.

Ao Marco Antônio Lemos que tanto me incentivou a entrar no mestrado, agradeço o apoio incondicional e a confiança depositada.

A todos da Dipre e à Jeanne Dopazo pela compreensão e ajuda ao longo dessa jornada.

Ao Dr. Edimilson Domingos pela disponibilização do laboratório para a realização dos testes.

Ao Lated e ao Adenauer Teixeira que me acolheram tão bem e me auxiliaram durante todo o trabalho experimental.

Aos colegas Felipe Semcovici, Keila Gisele Santos e Cristina Shaik pela ajuda com o conjugado e com o gel.

À equipe do Projeto Microarranjos e à Dr^a Karen Trinta pela doação das proteínas recombinantes e amostras.

À Dr^a Christiane Marques pela revisão do texto e toda orientação dada.

Ao Carlos Augusto Ducos pelo direcionamento na análise estatística do estudo.

À Camila Siqueira pela disponibilização de material que me auxiliou na escrita do texto e na elaboração da apresentação.

À Elaine Motta pelos estudos para a prova de seleção do mestrado.

A todos os colegas do MPTI que me auxiliaram com os exercícios, especialmente, de estatística.

Ao Laboratório de Hepatites Virais e à Dr^a Livia Villar por ceder amostras e kits. Agradeço a orientação e todo suporte dado a este trabalho.

À Dr^a Nara Rubim e à Dr^a Aline Bernardo que aceitaram o desafio de me orientar mesmo sem experiência em bancada. Obrigada por confiarem em mim ao me dar essa oportunidade extremamente importante para o meu desenvolvimento profissional. Agradeço todos os ensinamentos, conversas, orientação, desabafos, comprometimento, paciência, ajuda na realização dos testes e na elaboração dos gráficos.

À banca examinadora pelas sugestões e críticas construtivas.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram com este estudo.

Um sincero agradecimento é a forma mais simples de expressar que um trabalho não se faz sozinha e que contei com a colaboração de muitas pessoas, seja em uma informação dada, na orientação prestada, na doação de algum material ou até em uma simples palavra amiga em momentos difíceis. Meu sincero muito obrigada a todos.

A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades.

Maxwell Maltz

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HEPATITE C.....	2
1.1.1 <i>Histórico</i>	2
1.1.2 <i>Epidemiologia</i>	3
1.1.3 <i>Classificação taxonômica e morfologia do HCV</i>	6
1.1.4 <i>Organização do genoma viral</i>	7
1.1.5 <i>Variabilidade genética</i>	10
1.1.6 <i>Vias de transmissão, fatores de risco e prevenção</i>	11
1.1.7 <i>Resposta imunológica</i>	13
1.1.8 <i>Aspectos Clínicos</i>	16
1.1.9 <i>Diagnóstico</i>	17
1.2 TESTE RÁPIDO (TR)	21
1.2.1 <i>Estrutura do teste rápido de fluxo lateral</i>	22
1.2.2 <i>Etapas da produção do teste rápido de fluxo lateral</i>	27
1.2.3 <i>Princípios do imunoensaio de fluxo lateral para detecção de anticorpos</i> ..	30
1.2.4 <i>Proteínas recombinantes</i>	31
1.2.5 <i>Testes rápidos Anti-HCV</i>	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 GERAL	37
3.2 ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAIS	38
4.1.1 <i>Proteínas recombinantes</i>	38
4.1.2 <i>Membranas de reação</i>	39
4.1.3 <i>Amostras de soro humano</i>	39
4.2 METODOLOGIA.....	41
4.2.1 <i>Caracterização das amostras</i>	42
4.2.2 <i>Eletroforese</i>	42
4.2.3 <i>Mapia</i>	43
4.2.4 <i>Teste Rápido (TR)</i>	46
4.2.5 <i>Determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e índice Kappa</i>	49
4.2.6 <i>Amostras spike</i>	51
5 RESULTADOS	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	53

5.2 ELETROFORESE	53
5.3 MAPIA	54
5.4 TESTE RÁPIDO (TR)	55
5.4.1 <i>Proteína recombinante A</i>	56
5.4.2 <i>Proteína recombinante B</i>	63
5.4.3 <i>Proteína recombinante C</i>	66
5.4.4 <i>Proteína recombinante D</i>	69
5.4.5 <i>Proteína recombinante E</i>	72
5.5 REAÇÃO CRUZADA	78
5.6 ÍNDICE KAPPA.....	79
5.7 AMOSTRAS SPIKE	80
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÕES	90
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9 ANEXOS	106
9.1 TR HIV EM AMOSTRAS POSITIVAS (AEQ E CLÍNICAS) PARA HCV	106
9.2 EIE DENGUE EM AMOSTRAS CLÍNICAS NEGATIVAS PARA HCV	108
9.3 RESULTADOS DO TR 09 (PRÉ-LOTE) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE A.....	111
9.4 RESULTADOS DO TR 10 (LOTE FINAL) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE A.....	113
9.5 RESULTADOS DO TR 05 PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE D.....	115
9.6 RESULTADOS DO TR 07 (PRÉ-LOTE) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE E.....	116
9.7 RESULTADOS DO TR 08 (LOTE FINAL) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE E.....	118
9.8 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS REAÇÕES CRUZADAS COM DIFERENTES DOENÇAS	121
9.9 TR HCV: WAMA IMUNO-RÁPIDO HCV	122
9.10 AMOSTRAS SPIKE.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
%	Por cento
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
3' UTR	3' <i>Untranslated Region</i> - 3' Região Não Traduzida
5' UTR	5' <i>Untranslated Region</i> - 5' Região Não Traduzida
ABS	<i>Acrylonitrile butadiene styrene</i> - Acrilonitrila butadieno estireno
AEQ	Avaliação Externa de Qualidade
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina aminotransferase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina Sérica Bovina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Clia	<i>Chemiluminescence Immuno Assay</i> - Imunoensaios de Quimioluminescência
DAB	2,4-ácido diaminobutírico
Dipps	Divisão de Produção de Painéis Sorológicos
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
DPP	<i>Dual Path Platform</i> - Plataforma de Duplo Percurso
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i> - Eletroquimioluminescência
Elisa	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima
Fc	Fração cristalizável
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HAV	<i>Hepatitis A virus</i> - Vírus da Hepatite A
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> - Vírus da Hepatite B
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i> - Carcinoma Hepatocelular
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> - Gonadotrofina Coriônica humana
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> - Vírus da Hepatite C
Hemorio	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
HNANB	<i>Hepatitis Non-A, Non-B</i> - Hepatite Não-A, Não-B
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> - Peroxidase de raiz forte
HVR	<i>Virus Hypervariable Region</i> - Regiões Hipervariáveis do Vírus
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulinas de classe G
IgM	Imunoglobulinas de classe M
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INI	Instituto Nacional de Infectologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Ires	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> - Sítio de Entrada dos Ribossomas

K	Kappa
kDa	Kilodaltons
Lated	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
Linha C	Linha Controle
Linha T	Linha Teste
Mapia	<i>Multi Antigen Print Immunoassay</i> - Imunoensaio de Impregnação de Multi-antígenos
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
Opas	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Open Reading Frame - Fase de Leitura Aberta
Page	<i>Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão Fosfato-salina
pH	Potencial Hidrogeniônico
Polí U	Polipirimidina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Duodecil Sulfato de Sódio
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TR	Teste Rápido
UI	Unidades Internacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Prevalência global da Hepatite C	4
Figura 1.2	Mortes por hepatite viral, por vírus e tipo de sequela, 2015	4
Figura 1.3	Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais segundo agente etiológico	6
Figura 1.4	Morfologia do vírus da hepatite C	7
Figura 1.5	Organização genômica do HCV	8
Figura 1.6	Prevalência relativa de cada genótipo de HCV por região	11
Figura 1.7	Tempo para detecção de anticorpos anti-HCV após infecção	15
Figura 1.8	Fluxograma para a triagem da infecção pelo HCV por meio de testes rápidos	21
Figura 1.9	Esquema básico de um teste rápido de fluxo lateral	23
Figura 1.10	Fluxograma das etapas da produção do teste rápido deste trabalho para execução do ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral	28
Figura 1.11	Dimensões para marcação no cartão adesivo para posterior laminação das membranas	28
Figura 1.12	Laminação no cartão adesivo	29
Figura 1.13	Funcionamento de um teste rápido de fluxo lateral para detecção de anticorpos	31
Figura 4.1	Fluxograma de utilização de cada tipo de amostra	41
Figura 4.2	Ilustração das principais etapas de preparação para realização do Mapia	44
Figura 4.3	CAMAG Automatic TLC Sampler 4	45
Figura 4.4	Matrix™ 2360 Programmable Shear – Kinematic Automation	45
Figura 4.5	RollerConveyor AR3000, BioDot	47
Figura 4.6	Padrões de leitura e interpretação do teste rápido	49
Figura 5.1	Perfil eletroforético das proteínas em gel Bis-Tris 4-12%	54
Figura 5.2	Resultado do teste de Mapia	55
Figura 5.3	Resultados do pré-lote para a proteína recombinante A	62
Figura 5.4	Resultados do lote final para a proteína recombinante A	63
Figura 5.5	Exemplo do perfil de resposta da proteína recombinante B	66
Figura 5.6	Exemplos do perfil de resposta da proteína recombinante C	68

Figura 5.7	Resultados do TR 05 para a proteína recombinante D	71
Figura 5.8	Perfil de linha teste antes da realização do ensaio	72
Figura 5.9	Resultados do pré-lote para a proteína recombinante E	77
Figura 5.10	Resultados do lote final para a proteína recombinante E	78
Figura 5.11	Análise comparativa entre os resultados com o TR Wama HCV e com o TR HCV (E)	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Proteínas não-estruturais do HCV, pesos moleculares, atividades e funções	9
Tabela 1.2	Valores do título de anticorpos IgM e IgG contra as proteínas individuais do HCV na hepatite C aguda e crônica	14
Tabela 1.3	Critérios de aceitação da OMS para avaliação laboratorial para testes rápidos anti-HCV	33
Tabela 1.4	Critérios de sensibilidade e especificidade adotados pelo Ministério da Saúde para os testes rápidos adquiridos	34
Tabela 4.1	Proteínas recombinantes de hepatite C a serem avaliadas com suas respectivas especificações	38
Tabela 4.2	Sistemas de expressão e técnicas de purificação das proteínas recombinantes	39
Tabela 4.3	Especificações das membranas de reação	39
Tabela 4.4	Quantitativos disponíveis de cada tipo de amostra	41
Tabela 4.5	Codificação dos tampões de corrida utilizados no TR	48
Tabela 4.6	Índice Kappa de concordância	51
Tabela 5.1	Quantitativo de amostras negativas para HCV e positivas (ou na faixa cinza) para dengue (IgM/IgG)	53
Tabela 5.2	Matriz de decisão na triagem inicial do TR HCV (TR 01)	56
Tabela 5.3	Resultados do TR 01 para a proteína recombinante A	56
Tabela 5.4	Resultados do TR 02 para a proteína recombinante A	57
Tabela 5.5	Resultados do TR 03 para a proteína recombinante A	57
Tabela 5.6	Resultados do TR 04 para a proteína recombinante A	58
Tabela 5.7	Resultados do TR 05 para a proteína recombinante A	59
Tabela 5.8	Resultados do TR 06 para a proteína recombinante A	60
Tabela 5.9	Resultados do TR 07 para a proteína recombinante A	60
Tabela 5.10	Resultados do TR 08 para a proteína recombinante A	61
Tabela 5.11	Variáveis do pré-lote da proteína recombinante A	61
Tabela 5.12	Resultados dos TR 01 e TR 02 para a proteína recombinante B	63
Tabela 5.13	Resultados dos TR 03, TR 04, TR 05 e TR 06 para o cenário B1 da proteína recombinante B	64
Tabela 5.14	Resultados dos TR 03, TR 04 e TR 05 para o cenário B2 da	65

proteína recombinante B

Tabela 5.15	Resultados dos TR 01, TR 02 e TR 03 para a proteína recombinante C	67
Tabela 5.16	Resultados dos TR 04 e TR 05 para a proteína recombinante C	67
Tabela 5.17	Resultados do TR 01 para a proteína recombinante D	69
Tabela 5.18	Resultados do TR 02 para a proteína recombinante D	69
Tabela 5.19	Resultados do TR 03 para a proteína recombinante D	70
Tabela 5.20	Resultados do TR 04 para a proteína recombinante D	70
Tabela 5.21	Resultados do TR 01 para a proteína recombinante E	72
Tabela 5.22	Resultados do TR 02 para a proteína recombinante E	73
Tabela 5.23	Resultados dos TR 03 e TR 04 para a proteína recombinante E	74
Tabela 5.24	Resultados do TR 05 para a proteína recombinante E	75
Tabela 5.25	Resultados do TR 06 para a proteína recombinante E	75
Tabela 5.26	Variáveis do pré-lote da proteína recombinante E	76
Tabela 5.27	Perfil de reações cruzadas provocadas por diferentes doenças no teste rápido	78
Tabela 5.28	Resultado da simulação de teste com sangue total (<i>spike</i>)	80

RESUMO

Grave problema de saúde pública no Brasil e no Mundo, a Hepatite C é uma doença silenciosa que, geralmente, é diagnosticada décadas depois da infecção e tende a evoluir para a forma crônica. A Organização Mundial da Saúde estima que 71 milhões de pessoas em todo mundo convivam com a doença na forma crônica, correspondendo à prevalência global de 1,0%, porém, a maioria delas desconhece o seu diagnóstico, constituindo elo fundamental na cadeia de transmissão dessa infecção. Os testes rápidos são ensaios cromatográficos qualitativos de fácil execução e interpretação e não necessitam de estrutura laboratorial para sua realização nem de profissionais especializados. A leitura desses testes é visual com liberação de resultados em até 30 minutos e devido à possibilidade de armazenamento à temperatura ambiente, estes podem ser utilizados em localidades remotas, onde serviços convencionais de laboratório não estejam disponíveis ou em populações de risco, sendo fundamentais para a ampliação do acesso ao diagnóstico da hepatite C. Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho de proteínas recombinantes visando ao desenvolvimento futuro de um teste rápido nacional para detecção da Hepatite C. Foram avaliadas sete proteínas recombinantes quanto ao desempenho na plataforma de teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral: A(401), B(4.8), C(4.7), D(4.5), E(207), F(241) e G(255). Inicialmente, realizou-se uma triagem utilizando eletroforese e Mapia (*Multi Antigen Print Immunoassay*) para avaliação do perfil e da reatividade dessas proteínas respectivamente. As proteínas selecionadas (A, B, C, D, E) foram avaliadas na plataforma de teste rápido de fluxo lateral com diferentes parâmetros como: composição do tampão de corrida, concentração do antígeno, fluxo do conjugado revelador, porosidade da membrana de nitrocelulose. As proteínas recombinantes B, C e D mostraram-se inespecíficas: não foi possível chegar à uma padronização que resolvesse, principalmente, a baixa especificidade obtida nas avaliações sem afetar as respostas das amostras pouco reativas. Adicionalmente, em todos os ensaios com as proteínas B e C, observou-se que a linha teste impregnada apresentava-se grossa, dispersa e sem nitidez, atributos inaceitáveis para um teste que emprega leitura visual. A concentração fornecida da proteína D é muito baixa (0,25mg/mL), sendo necessária a utilização de um grande volume para realizar as impregnações, deixando a linha teste grossa e visível, mesmo sem a aplicação do corante. Na análise do lote final com as proteínas recombinantes com melhor desempenho (A e E), obtiveram-se índices de sensibilidade de 93,45% e 98,21% respectivamente. Ambas alcançaram 100% de especificidade. Concluiu-se que, dentre as proteínas avaliadas, a proteína recombinante E mostrou-se promissora e a melhor candidata a alvo em um kit de imunocromatografia de fluxo lateral – Teste Rápido para diagnóstico da hepatite C. O conjunto desenvolvido foi considerado apto para o diagnóstico da hepatite C.

Palavras-chave: hepatite C, HCV, proteínas recombinantes, teste rápido, diagnóstico.

ABSTRACT

Hepatitis C is a silent disease that is usually diagnosed decades after infection and tends to progress to a chronic form, being considered a serious public health problem in Brazil as in the rest of the world. The World Health Organization estimates that 71 million people worldwide live with the chronic form of the disease, corresponding to the overall prevalence of 1.0%. However, most of them are unaware of its diagnosis and constitute a fundamental link in the disease transmission chain. Rapid tests are qualitative chromatographic assays of easy execution and interpretation that do not require a laboratory structure or specialized professionals. The results are visually interpreted and released within 30 minutes and due to its characteristic storage at room temperature, they can be transported and used in remote locations or in populations at risk, where conventional laboratory services are not available. The aim of this study was to evaluate the performance of recombinant proteins suitable for use in a rapid test for the detection of Hepatitis C. Seven recombinant proteins were evaluated on the rapid lateral flow immunochromatographic test device: A (401), B (4.8), C (4.7), D (4.5), E (207), F (241) and G (255). Initially, screening was performed using electrophoresis and Mapia (Multi Antigen Print Immunoassay) to evaluate the profile and reactivity of these proteins respectively. The selected proteins (A, B, C, D, E) were evaluated on a lateral flow rapid test using different parameters such as: buffer composition, antigen concentration, conjugate flow rates, nitrocellulose membrane porosity. Recombinant proteins B, C and D reacted non-specifically, making it very difficult to reach a standardization without affecting detection of the weakly reactive samples. Additionally, test lines with B and C recombinant proteins printed was found to be thick, dispersed and unclear, unacceptable attributes for a test that employs visual reading. The supplied concentration of protein D is very low (0,25mg/mL), requiring a large volume to perform the printings, leaving the test line thick and visible even without dye application. In the final batch analysis with the selected recombinant proteins (A and E), sensitivity indices of 93.45% and 98.21% was reached respectively. Both reached 100% specificity. In conclusion, among the proteins evaluated, recombinant E protein was shown to be promising and the best candidate for use in a lateral flow immunochromatography - Rapid Test Kit for hepatitis C diagnosis. The developed set was considered suitable for the diagnosis of hepatitis C.

Keywords: hepatitis C, HCV, recombinant proteins, rapid test, diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

Grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, a hepatite é uma inflamação do fígado, a qual pode ser causada por vírus ou pelo uso de alguns medicamentos, álcool e outras drogas, assim como por doenças autoimunes, metabólicas e genéticas. As infecções virais são as causas mais significativas para o desenvolvimento das hepatites, sendo de grande importância para a saúde pública, em razão do número de pessoas acometidas, transmissibilidade, cronicidade e potencial para complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b, 2019).

As hepatites virais agudas e crônicas são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, que têm, em comum, o tropismo primário pelo tecido hepático. Embora possuam características clínicas semelhantes, possuem diferentes ciclos replicativos e formas de transmissão, o que lhes garante epidemiologia distinta. No Brasil, as hepatites virais mais comuns são as causadas pelos vírus A, B e C. Existem, ainda, os vírus D e E, esse último mais frequente na África e na Ásia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b, 2019).

O primeiro relatório da Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) sobre esse tema revela a enorme escala dessa epidemia silenciosa no continente americano. Em 2015, os ministros da saúde das Américas acordaram uma série de medidas para prevenir e controlar as hepatites virais incluídas no Plano Regional da Opas (2016-2019). O mundo busca acabar com essas doenças como um problema de saúde pública até 2030 (OMS, 2016a; OPAS, 2016). Para tanto, os países e as regiões precisam reduzir novas infecções (incidência) em 90% e reduzir mortes (mortalidade) em 65% até essa data (OMS, 2017a).

Ainda segundo informações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017a), as hepatites virais causaram 1,34 milhões de óbitos em 2015, número comparável às mortes causadas por tuberculose e pelo Vírus da Imunodeficiência Humana – *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Entretanto, as mortes por hepatites estão aumentando, enquanto a mortalidade por tuberculose e por HIV tem diminuído. As hepatites virais são uma das maiores causas de transplantes hepáticos no Brasil, com destaque para o vírus da hepatite C (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c).

A Hepatite C é um agravo que afeta mais de 80 milhões de pessoas em todos os continentes (OMS, 2017c), representando uma doença silenciosa, uma vez que, em geral, é diagnosticada décadas depois da infecção e tende à cronicidade. A agressão hepatocelular causada pelo Vírus da Hepatite C – *Hepatitis C virus* (HCV) pode evoluir para fibrose hepática, cirrose e câncer hepático. Nas fases avançadas, pode ocasionar inclusive o óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c).

Desde que o HCV foi descoberto, vários testes sorológicos e moleculares foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico dessa infecção (VILLAR et al., 2015). A maioria das pessoas infectadas pelas hepatites virais crônicas desconhece seu diagnóstico, constituindo elo fundamental na cadeia de transmissão dessas infecções (SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 2016). A menos que pessoas com essas infecções sejam diagnosticadas e tratadas, o número das mortes por Hepatite C continuará a aumentar (OMS, 2017a).

Dentro de todo contexto exposto, alinhando as demandas de saúde pública (nacional e mundial) ao desenvolvimento do parque industrial brasileiro e ao uso de todo conhecimento do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) na área de testes rápidos, ampliando seu portfólio, este trabalho tem por objetivo avaliar o desempenho de proteínas recombinantes de HCV visando ao desenvolvimento futuro de um teste rápido nacional para detecção da Hepatite C.

1.1 HEPATITE C

1.1.1 Histórico

Originalmente, na década de 1960, acreditava-se que existiam apenas duas classes principais das hepatites virais: infecciosa (ou Tipo A) e homóloga por soro (ou Tipo B). Na ausência de ensaios diagnósticos específicos, os dois tipos de hepatites conhecidos até então foram distinguidos pelas circunstâncias de exposição e pelos períodos de incubação (KRUGMAN; GILES; HAMMOND, 1967).

Na década seguinte, com o desenvolvimento de testes sorológicos para detecção do Vírus da hepatite A – *Hepatitis A virus* (HAV) e do Vírus da hepatite B – *Hepatitis B virus* (HBV), observou-se que muitos casos de hepatite pós-transfusional não estavam relacionados aos dois vírus (HAV e HBV). A partir desse fato, foi descrito um terceiro tipo de hepatite nomeada como Não-A, Não-B – *Hepatitis Non-A, Non-B* (HNANB), que, em aproximadamente 50% das pessoas infectadas, com a

persistência de enzimas séricas aumentadas durante pelo menos seis meses, se desenvolvia em uma forma crônica (FEINSTONE et al., 1975).

Após uma extensa pesquisa para encontrar as causas da hepatite pós-transfusional, empregando técnicas de biologia molecular como clonagem e sequenciamento genético, o agente etiológico da HCV foi identificado no plasma de chimpanzés experimentalmente infectados. Então, em 1989, este foi denominado vírus da hepatite C (CHOO et al., 1989).

No Brasil, em 1993, foi publicada a Portaria 1.376, a qual incluiu testes sorológicos nos exames de triagem de doação de sangue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1993), diminuindo a transmissão de hepatite C por transfusão de sangue e hemoderivados (STRAUSS, 2001). Já em 2013, foi publicada a Portaria 2.712, que dispôs sobre a obrigatoriedade da realização de testes moleculares de HCV na triagem de bolsas de sangue para doação, reduzindo o tempo de janela imunológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.1.2 Epidemiologia

1.1.2.1 Mundial

A epidemia causada pelo HCV é distribuída de forma desigual no mundo, afetando todas as regiões, com grandes diferenças entre e dentro dos países. Em 2017a, a OMS publicou um relatório global sobre as hepatites estimando que 71 milhões de pessoas vivessem com infecção crônica por HCV em 2015 (prevalência global de 1,0%). A Região do Mediterrâneo Oriental teve a maior prevalência (2,3%) seguida da Europa (1,5%) (Figura 1.1).

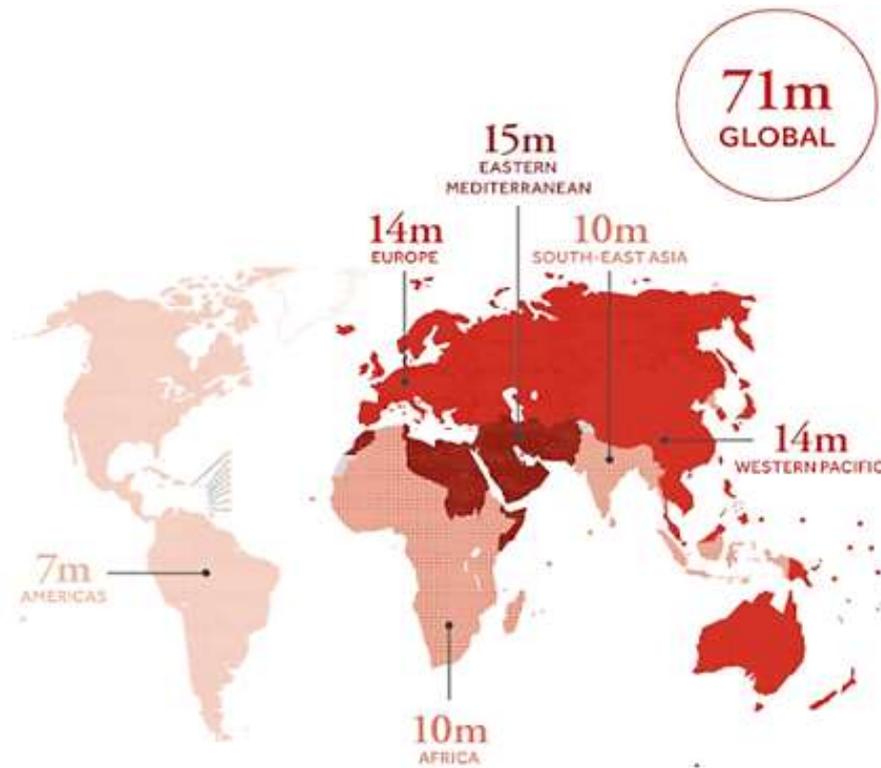


Figura 1.1 – Prevalência global da Hepatite C. Fonte: Adaptado de OMS, 2019.

A OMS (2017a) estima que 1,75 milhões de novas infecções ocorreram em todo mundo no mesmo ano (taxa de incidência global 23,7 por 100.000). Áreas com altas taxas de infecção estavam localizadas na região do Mediterrâneo Oriental (62,5 por 100.000) e Europa (61,8 por 100.000). A OMS ainda estabelece que, aproximadamente, 399.000 pessoas morrem anualmente por hepatite C, principalmente, de cirrose e carcinoma hepatocelular (Figura 1.2) (OMS, 2017a).

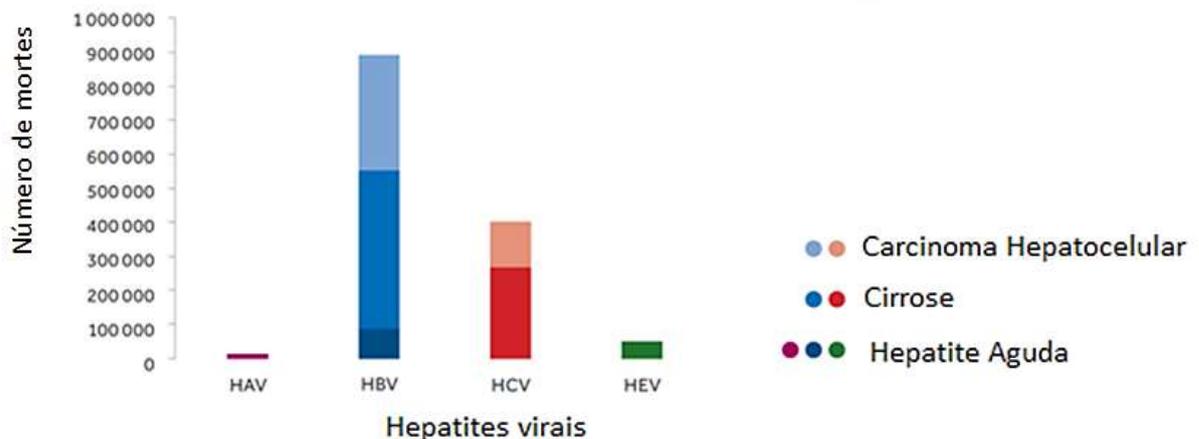


Figura 1.2 – Mortes por hepatite viral, por vírus e tipo de seqüela, 2015. Fonte: Adaptado de OMS 2017a.

Analisando os números apresentados pela OMS, constata-se que o número de pessoas recém-infectadas excede a soma de pessoas que morreram de infecção por HCV e de pessoas sendo curadas (N= 843.000), evidenciando que, caso não haja ações coordenadas de controle e prevenção da Hepatite C dos países, essa epidemia global continuará a expandir-se.

1.1.2.2 Nacional

As hepatites virais são doenças de notificação compulsória, ou seja, todas as ocorrências devem ser notificadas e registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). Esse registro é importante para mapear os dados epidemiológicos do país e para ajudar a traçar diretrizes de políticas públicas no setor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c, 2019).

A epidemiologia da hepatite C também não é homogênea no cenário nacional. Os dados escassos sobre a epidemiologia do HCV considerando o número real de pacientes infectados são um problema no Brasil e na maioria dos países latino-americanos (CASTRO et al., 2015). Conforme a Sociedade Brasileira de Infectologia (2016) estima, em consenso com a Sociedade Brasileira de Hepatologia, há cerca de 2 milhões de pessoas infectadas com o HCV no país e a maioria desconhece seu diagnóstico.

Dados do MS (2018a) revelam que foram detectados 331.855 casos de hepatite C entre 1999 e 2017, sendo 160.105 casos reagentes para ambos os marcadores (anti-HCV e HCV RNA). Importante salientar a alteração no protocolo de diagnóstico que, até 2014, eram considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentavam ambos os testes anti-HCV e HCV RNA reagentes. Porém, em 2015, passaram a ser considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentam pelo menos um dos testes reagentes, o que pode ter contribuído para o aumento na taxa de detecção da doença.

Os óbitos por hepatite C são a maior causa de morte entre as hepatites virais no Brasil (Figura 1.3).

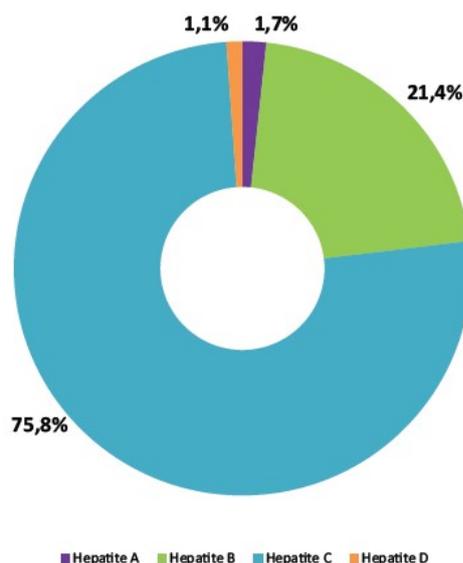


Figura 1.3 – Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais segundo agente etiológico. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a.

A partir do ano 2000, evidenciou-se um aumento de óbitos relacionados a essa etiologia, totalizando 50.179 casos entre 2000 e 2016. Destes, 27.103 ocorrências tiveram a hepatite C como causa básica do óbito. O coeficiente de mortalidade por hepatite C como causa básica, em 2016, era de 1,0 por 100.000 habitantes. Todavia, as regiões Sul e Sudeste apresentaram coeficiente de mortalidade superior à média nacional observada (1,7 e 1,2 respectivamente) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

1.1.3 Classificação taxonômica e morfologia do HCV

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, a qual também inclui os vírus da febre amarela, dengue e Zika. Essa família possui quatro gêneros distintos: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* e *Hepacivirus*; este último compreendendo o HCV (SIMMONDS et al., 2017).

A partícula viral possui, aproximadamente, de 30 a 60nm de diâmetro, formada por um envelope lipídico com duas glicoproteínas ancoradas (E1 e E2). Esse envelope envolve o nucleocapsídeo, o qual possui simetria icosaédrica, conforme ilustrado na Figura 1.4 (CHOO et al., 1991; HE et al., 1987; HIJIKATA et al., 1991; MILLER; PURCELL, 1990; SIMMONDS et al., 2017).

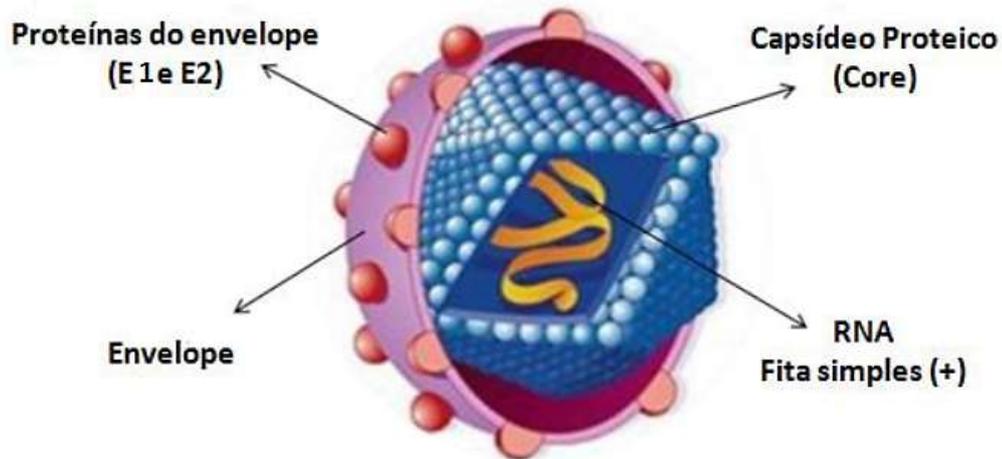


Figura 1.4 – Morfologia do vírus da hepatite C. Fonte: Adaptado de BRAGA, 2017.

O genoma do HCV é constituído de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 9,6 quilobases (CHOO et al., 1989; SIMMONDS et al., 2017).

1.1.4 Organização do genoma viral

A organização do genoma do HCV revela similaridade aos Flavivírus e Pestivírus (MILLER; PURCELL, 1990), apresentando três regiões diferentes (CHOO et al., 1991; KATO; HIJIKATA, 1990; TAKAMIZAWA et al., 1991):

- Região não codificante em uma extremidade: 5' Região Não Traduzida – 5' *Untranslated Region* (5' UTR);
- Fase de Leitura Aberta – *Open Reading Frame* (ORF);
- Região não codificante na outra extremidade: 3' Região Não Traduzida – 3' *Untranslated Region* (3' UTR).

A região 5' UTR está envolvida na etapa de tradução do genoma viral e processamento da poliproteína, uma vez que o Sítio de Entrada dos Ribossomas – *Internal Ribosome Entry Site* (Ires) está inserido nessa região (HAN et al., 1991; HONDA et al., 1996).

A ORF codifica uma única poliproteína precursora com mais de 3.000 aminoácidos, a qual é clivada por proteases virais e da célula hospedeira, originando 10 proteínas, divididas entre estruturais (Core, E1 e E2), localizadas na região 5' (N-terminal) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), localizadas na região 3' (C-terminal). Na junção das proteínas estruturais e não-estruturais, encontra-se um peptídeo hidrofóbico p7 que possui propriedades de canal iônico

(CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006; CHOO et al., 1991; KATO; HIJIKATA, 1990; OKAMOTO et al., 1991; PENIN et al., 2004; SIMMONDS et al., 2017; TAKAMIZAWA et al., 1991) (Figura 1.5).

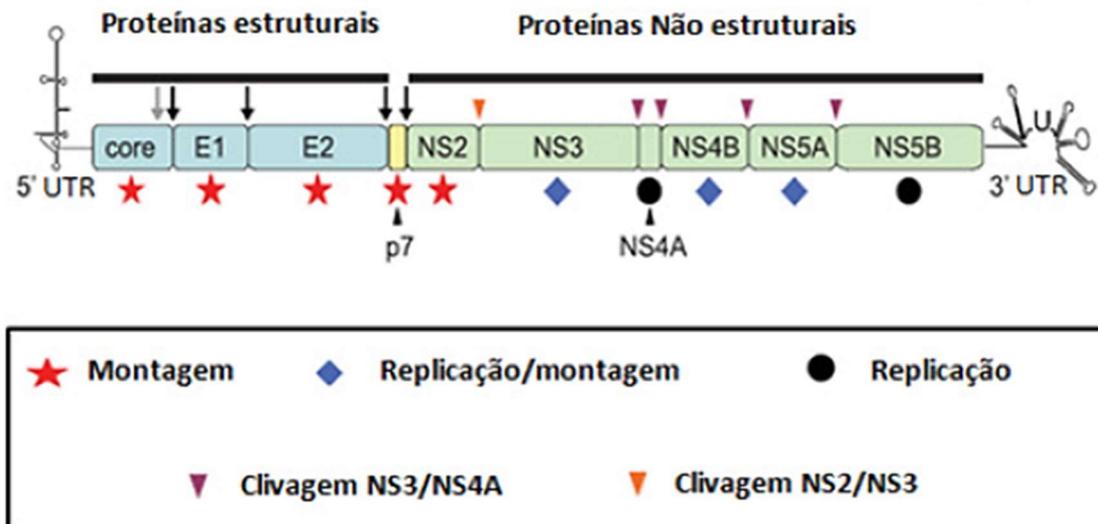


Figura 1.5 – Organização genômica do HCV mostrando as regiões UTR e codificantes de proteínas estruturais e não-estruturais, assim como suas principais funções. As setas preta e cinza representam a atividade de proteases do hospedeiro. Fonte: SANTOS, 2016.

A região 3' UTR possui três sub-regiões: uma sequência variável de, aproximadamente, 30 a 40 nucleotídeos, uma região poli U (polipirimidina), e uma sequência de 98 nucleotídeos que é altamente conservada entre os genótipos HCV (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006; HAN et al., 1991; TANAKA et al., 1996).

1.1.4.1 Proteínas estruturais do HCV

A primeira clivagem da poliproteína ocorre por meio de peptidases da célula do hospedeiro, gerando a proteína Core, que se liga ao RNA viral, formando o nucleocapsídeo do vírus. A proteína do Core varia de tamanho (17 a 23 Kilodaltons – kDa), porém, a proteína 21-kDa (P21) parece ser a forma predominante. Esta é a proteína do HCV mais conservada e está envolvida na sinalização celular, apoptose, carcinogênese e metabolismo de lipídios (esteatose hepática) (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006; DUBUISSON, 2007; SIMMONDS et al., 1994).

Em seguida, ocorre a clivagem das proteínas do envelope (E1 e E2), que possuem sequências que apresentam alta variabilidade genética e estão associadas à ligação ao receptor, à entrada do vírus na célula e à fusão do envelope. Estas proteínas, transmembrana tipo I, são altamente glicosiladas e possuem pesos

moleculares 33-35 kDa e 70-72 kDa respectivamente. Elas se associam de forma não-covalente, formando heterodímeros. A proteína E2 possui duas Regiões Hipervariáveis (HVR-1 e HVR-2), as quais levam a uma seleção maior de anticorpos e variantes de escapes imunológicos (DUBUISSON, 2007; HIJIKATA et al., 1991; PENIN et al., 2004).

1.1.4.2 Proteínas não-estruturais do HCV

As proteínas não-estruturais estão, de forma geral, envolvidas no processamento da poliproteína e na replicação viral. Seus pesos moleculares, atividades e funções principais estão descritas na Tabela 1.1 (DUBUISSON, 2007; LINDENBACH; RICE, 2005; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; PENIN et al., 2004).

Tabela 1.1 – Proteínas não-estruturais do HCV, pesos moleculares, atividades e funções.

Proteína	Peso Molecular	Característica	Função
NS2	21-23 kDa	Proteína de transmembrana não-glicosilada	Participação na clivagem proteolítica na junção NS2/NS3 da poliproteína
NS3	69 kDa	Serino-protease (N-terminal) e Helicase/NTPase (C-terminal)	Participação na clivagem proteolítica das junções NS2/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B e no processo de replicação viral
NS4A	6 kDa	Cofator (para a Serino-protease NS3)	Formação da protease NS3/NS4A e ativação, estabilização e ancoragem da protease às membranas intracelulares
NS4B	27 kDa	Cofator (indução alterações de membranas)	Formação de estruturas membranosas que servirão de sustentação para o complexo de replicação viral
NS5A	56-58 kDa	Fosfoproteína	Modulação de vias de sinalização da célula hospedeira e de resposta ao Interferon
NS5B	68 kDa	RNA polimerase dependente de RNA	Fundamental para a maquinaria de replicação viral

1.1.5 Variabilidade genética

Uma das características mais marcantes do HCV, assim como de outros vírus de RNA, é o grau elevado de sua diversidade genética. As regiões do genoma apresentam graus diferentes de variabilidade, sendo as mais variáveis as regiões que codificam as glicoproteínas do envelope, E1 e E2. No caso das sequências pertencentes às regiões hipervariáveis 1 e 2 (HVR1 e HVR2) do gene E2 são as que mostram menor homologia (apenas 50% de identidade entre diferentes isolados) (GUILLOU-GUILLEMETTE et al., 2007; HIJIKATA et al., 1991).

As regiões do genoma correspondentes a funções essenciais do vírus (envolvidas na replicação ou na tradução) ou que possuam grandes restrições estruturais (5' e 3' UTR) são as mais conservadas (ECHEVERRÍA et al., 2015). No caso do HCV, a região mais conservada é a região 5' com mais 90% de identidade entre as sequências de isolados. A região que codifica o capsídeo também possui baixa variabilidade, com homologia entre as sequências de 81% a 88% (GUILLOU-GUILLEMETTE et al., 2007; OKAMOTO et al., 1991; SIMMONDS et al., 1994).

É possível identificar e classificar o HCV em genótipos distintos, os quais diferem entre si na sequência de nucleotídeos, além de constatar distribuições geográficas e epidemiológicas variadas (SIMMONDS, 1995). Esses genótipos possuem divergência de 31% a 33% em sua sequência nucleotídica enquanto subtipos diferentes (dentro do mesmo genótipo) diferem em cerca de 20% a 25% (SIMMONDS et al., 2005). Cepas que pertencem ao mesmo subtipo diferem em menos de 15% dos sítios nucleotídicos (MESSINA et al., 2015). Apesar dessa variabilidade genética, todos os genótipos possuem o mesmo ciclo de replicação (SIMMONDS, 2004).

O HCV é classificado em sete genótipos que compreendem 67 subtipos confirmados, 20 subtipos atribuídos provisoriamente e 21 subtipos não atribuídos. (MURPHY et al., 2015, SMITH et al., 2014).

Alguns subtipos, especificamente, 1a, 1b, 2a e 3a, estão amplamente distribuídos em todo o mundo, sendo responsáveis por uma grande proporção de infecções por HCV. Um estudo realizado com 117 países mostrou que o genótipo 1 é o que predomina em 85 desses países (53%). Destes, 99% são atribuíveis aos subtipos 1a e 1b (31% e 68% respectivamente). Observou-se também, esquematizado na Figura 1.6, que o genótipo 2 é prevalente na África Ocidental, o genótipo 3 no sul da Ásia e partes da Escandinávia, o genótipo 4 na África do Norte

e Central, o genótipo 5 na África do Sul e genótipo 6 no sudeste da Ásia (MESSINA et al., 2015).

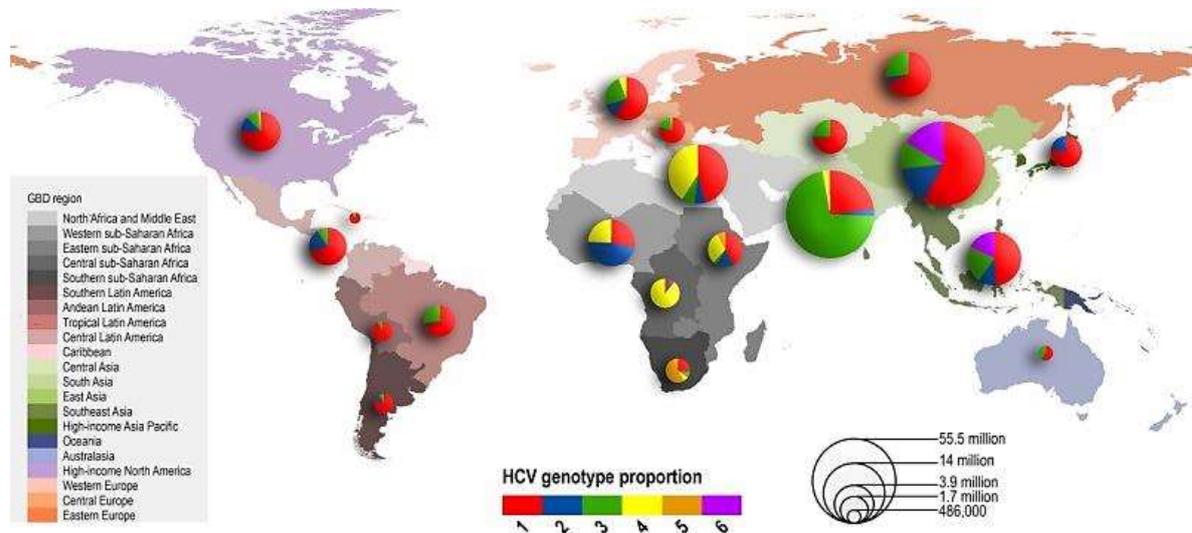


Figura 1.6 – Prevalência relativa de cada genótipo de HCV por região. Fonte: MESSINA et al., 2015.

Em termos de América Latina e Caribe, o genótipo 1 do HCV é predominante. Quanto aos subtipos deste, o genótipo 1a predomina no Canadá, República Dominicana, Peru e Estados Unidos, enquanto o genótipo 1b é prevalente na Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Cuba, México e Venezuela (OPAS, 2016).

1.1.6 Vias de transmissão, fatores de risco e prevenção

Historicamente, o HCV é considerado uma infecção transmitida pelo sangue. Desde os primeiros relatos sobre o vírus, com a falta de informação sobre a doença e com a falta de exames para o diagnóstico das infecções assintomáticas, a transmissão por transfusão sanguínea era responsável por mais de 90% das hepatites pós-transfusionais. Todavia, com o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e com a implementação destes na triagem do processo de doação de sangue e hemoderivados, o risco de infecção associado a esta causa diminuiu (STRAUSS, 2001).

Atualmente, outros meios parenterais continuam a disseminar a doença, apesar de, em um percentual significativo de casos, não ser possível identificar a via de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; WONG et. al, 2018). A transmissão do HCV por meios parenterais ocorre por meio da exposição do paciente ao sangue contendo o vírus. Dessa forma, de acordo com o MS (2018b), são consideradas populações de risco para a infecção pelo HCV por essa via:

- Indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993;
- Pessoas que fazem uso de drogas injetáveis, inaláveis ou pipadas;
- Pessoas que compartilham objetos perfurocortantes contaminados;
- Compartilhamento de materiais de uso pessoal (por exemplo, escova de dente e lâmina de barbear);
- Pessoas com tatuagem, *piercings* ou que apresentem outras formas de exposição percutânea (por exemplo, consultórios odontológicos, clínicas de podologia, salões de beleza que não obedecem às normas de biossegurança).

A via nosocomial, infecção adquirida em meio hospitalar, também é um mecanismo conhecido de transmissão do HCV, como por exemplo, procedimentos cirúrgicos, hemodiálise e exames invasivos (MARTÍNEZ-BAUER et al., 2008).

Em relação à transmissão ocupacional do HCV, profissionais da área de saúde são os mais acometidos devido a acidentes de trabalho. Estudos do início da década de 90 apontavam que a prevalência da infecção do HCV era três vezes maior nos profissionais da área da saúde do que em outras profissões (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011).

A transmissão sexual do HCV também tem sido relatada de forma esporádica em grupos populacionais específicos, sendo pouco frequente em parceiros heterossexuais, sobretudo em casais monogâmicos (menos de 1%). Dessa forma, essa via de transmissão é mais frequente em indivíduos com múltiplos parceiros ou com prática sexual de risco (sem o uso de preservativos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

A presença de outra comorbidade de mesma natureza facilita essa transmissão (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011). HCV e HIV possuem rotas de transmissão em comum. Entre os infectados pelo HIV, a prevalência de anti-HCV é maior em usuários de drogas injetáveis (82,4%), seguida de homens que fazem sexo com homens (6,4%) e bem menor em pessoas sem comportamentos de maior risco (2,4%) (OMS, 2017a).

A compreensão atual da transmissão vertical do HCV é limitada; até o momento, pouco é conhecido sobre os mecanismos dessa via de transmissão. Entretanto, já se demonstrou que gestantes com carga viral do HCV elevada, usuárias de drogas ou coinfectadas pelo HIV apresentam maior risco de transmissão da doença para os recém-nascidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

É relatada uma taxa de transmissão média de aproximadamente 5% em mulheres com HCV e 15% em mulheres coinfectadas com HIV (FERRERO et al., 2003). Apesar do RNA do HCV ter sido detectado no leite materno, a quantidade presente é muito baixa para infectar o recém-nascido e é facilmente inativada por sucos gástricos concluindo que evitar o aleitamento materno não é uma maneira de prevenir a transmissão vertical do vírus (INDOLFI; RESTI, 2009; YEUNG et al., 2014).

Como mencionado pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças – *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), até então, não há vacina licenciada para Hepatite C, mas há pesquisas em andamento para tal desenvolvimento (CDC, 2018). Em uma entrevista publicada pela Escola de Medicina da Universidade de Creta, Grécia, a professora e pesquisadora Anna Kramvis ressalta as dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para Hepatite C como, por exemplo, a heterogeneidade do HCV e o fato de não haver um modelo de animal pequeno imunocompetente que possa ser usado para estudar este vírus (MAMMAS; SPANDIDOS, 2017). Além disso, as imunoglobulinas de classe G (IgG) não são eficazes para a profilaxia pós-exposição. Então, até o momento, há vacinas disponíveis apenas para Hepatite A e Hepatite B (CDC, 2018), sendo a eliminação dos comportamentos de risco fundamental para que as taxas de incidência e prevalência da infecção por HCV sejam reduzidas e, por conseguinte, a diminuição dos casos de hepatite C (MANNIS et al., 2017).

1.1.7 Resposta imunológica

Os principais receptores de reconhecimento do HCV durante a entrada e replicação nos hepatócitos são receptor tipo Toll-3, proteína quinase R e gene indutível por ácido retinóico I. O HCV é capaz de induzir uma forte resposta imune inata, já que, quando ocorre essa interação, há a ativação de células NK e a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons, gerando um estado antiviral. Muitos vírus conseguem resistir aos efeitos da imunidade inata, devido, principalmente, à sua alta taxa de replicação, como é o caso do HCV. Paralelamente à resposta inata, ocorre a ativação da imunidade adaptativa, que pode ser dividida em celular e humoral (HEIM; THIMME, 2014; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

A defesa contra patógenos intracelulares, como o HCV, ocorre, principalmente, por meio de mecanismos efetores da resposta imunológica celular,

com destruição das células infectadas. As células T CD4+ podem ser classificadas como Th1 ou Th2, sendo o subtipo Th1 a resposta mais eficaz contra patógenos intracelulares. Elas produzem uma citocina, o interferon (IFN) γ que é capaz de estimular a função de outras células, como macrófagos e neutrófilos (fagocitose), células NK e T CD8+ (citotoxicidade) e células B (secreção de subtipos específicos de anticorpos). As células T CD8+, além de produzirem interferon γ , possuem uma função efetora importante de citotoxicidade, levando à apoptose das células infectadas. Dessa forma, a eliminação do HCV está associada a respostas fortes, sustentadas e multiespecíficas de células T CD4+ e T CD8+ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; HEIM; THIMME, 2014; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005).

A resposta imunológica humoral inicia-se com o processo de reconhecimento do antígeno pelas células B virgens específicas, que se diferenciam em plasmócitos. Estes produzem e secretam anticorpos, as imunoglobulinas. No início da resposta imunológica humoral, as células secretam anticorpos da classe M (IgM), sendo esta, habitualmente, utilizada como marcador de infecção recente. Entretanto, conforme demonstrado na Tabela 1.2, a IgM específica para HCV não é um bom marcador de hepatite aguda, já que também é detectada em pacientes crônicos e, ademais, IgM e IgG específicas para HCV são detectadas quase simultaneamente nas infecções agudas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; NIKOLAEVA et al., 2002).

Tabela 1.2 – Valores do título de anticorpos IgM e IgG contra as proteínas individuais do HCV na hepatite C aguda e crônica. Os números indicam quantidade de pacientes com o mesmo valor de título. Fonte: Adaptado de NIKOLAEVA et al., 2002.

Título	Hepatite C Aguda					Hepatite C Crônica				
	IgM anti-HCV	IgG anti-core	IgG anti NS3	IgG anti-NS4A,B	IgG anti-NS5A	IgM anti-HCV	IgG anti-core	IgG anti-NS3	IgG anti-S4A,B	IgG anti-NS5A
1/40000							3			
1/32000							2			
1/20000							8	1	1	
1/16000							3	1		
1/10000							3	1		1
1/8000							13	3	1	4
1/5000								4	3	1
1/4000							20	4	7	9
1/2000							6	10	15	12
1/1000							1	15	16	6
1/800		2	2				1	2		
1/400		1	1	2	1			10	8	8
1/200		2	1	3	1			2	4	4
1/160						2				
1/80		4	4	2	4	4		1	3	4
1/40	2	2	4	1	2	12		5		4
1/20	3	6	3	2		14				1
1/10	5	4	1	4		9		1	1	
1/5	2	1	5	5	5	8		1	1	6
0	12	2	3	5	11	11				

1.1.7.1 Escape do sistema imune

O HCV desenvolveu diversas estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro e persistir, assim, com a infecção. A existência de quasiespécies, sua alta taxa de replicação e a ausência de atividade revisora da RNA polimerase viral resultam em mutações da sequência do vírus: aminoácidos diferentes são adicionados durante a síntese das proteínas virais, alterando sua sequência e estrutura. A resposta imune adaptativa ao HCV origina anticorpos neutralizantes e células T específicos e essas mutações da sequência viral podem levar ao não reconhecimento do vírus por esses componentes, colaborando para a rápida diversificação da população do HCV, sendo considerado seu principal mecanismo para escapar do sistema do hospedeiro (HEIM; THIMME, 2014; NEUMANN et al., 1998; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005; STEINHAEUER; DOMINGO; HOLLAND, 1992; STUMPF; PYBUS, 2002).

1.1.7.2 Janela imunológica

O período de janela imunológica, caracterizado por HCV RNA e antígeno Core detectáveis e ausência de anticorpos anti-HCV é estimada em, aproximadamente, 60 dias (CHEVALIEZ, 2011) conforme mostra a Figura 1.7. O MS estima que esse período seja entre 33 e 129 dias, utilizando como parâmetros os ensaios de segunda geração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). Os ensaios de terceira geração diminuíram esse tempo, permitindo detectar o anticorpo para hepatite C próximo de 28 a 42 dias após a infecção (VILLAR et al., 2015).

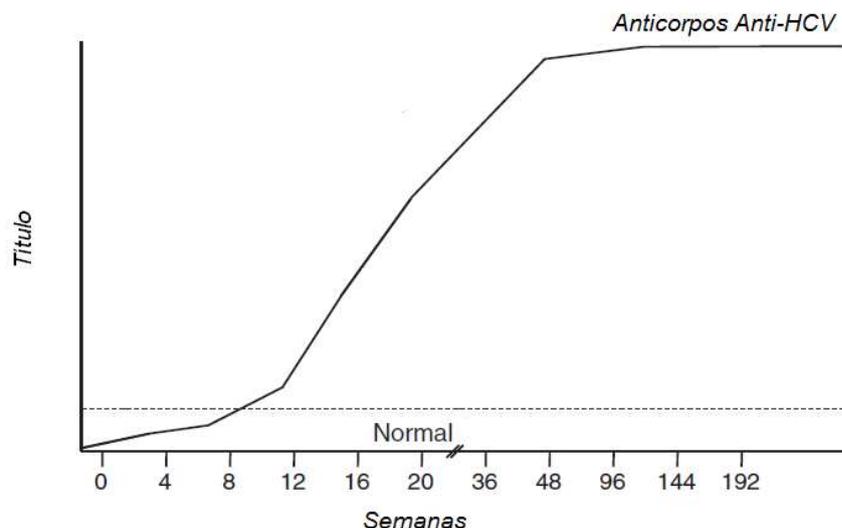


Figura 1.7 – Tempo para detecção de anticorpos anti-HCV após infecção. Adaptado de CHEVALIEZ, 2011.

1.1.8 Aspectos Clínicos

A infecção aguda por HCV, de forma geral, apresenta uma evolução subclínica, com cerca de 80% dos casos assintomáticos e anictéricos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Normalmente, durante a infecção aguda, as aminotransferases séricas atingem um pico e podem retornar aos níveis normais. Uma minoria desenvolve elevações suficientes na bilirrubina para gerar icterícia (amarelamento da pele e dos olhos) ou urina escura. Os pacientes sintomáticos podem apresentar a icterícia, porém, com mais frequência, queixam-se de sintomas inespecíficos, incluindo dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia, fadiga, febre, dor nas articulações, além de alterações nas fezes e na urina (BLACKARD et al., 2007; OMS, 2018b).

Ambos os casos acima dificultam o diagnóstico da hepatite C aguda, uma vez que o quadro clínico é semelhante a outras enfermidades e, a não ser que a suspeita clínica seja alta, poucos pacientes são testados para a doença (anticorpo anti-HCV ou RNA viral) (BLACKARD et al., 2007).

Devido à dificuldade do diagnóstico precoce da hepatite C aguda, a doença pode evoluir silenciosamente durante décadas, sendo descoberta já em sua fase crônica, em geral, durante testes sorológicos de rotina ou transfusões sanguíneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c). Estima-se que 70% das pessoas infectadas desenvolvam a infecção crônica (HCV RNA positivo) (LAVANCHY, 2009). No Brasil, aproximadamente, mais de 65% dos casos de hepatite C notificados no Sinan é de portadores crônicos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

A definição de hepatite C crônica se dá por anti-HCV reagente por mais de seis meses e confirmação diagnóstica com HCV RNA detectável por mais de seis meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c).

Quando a infecção crônica da hepatite C é estabelecida, raramente ocorre a eliminação espontânea do HCV (BULTEEL et al., 2016). O dano celular que o HCV causa é pequeno; a injúria do fígado ocorre, principalmente, devido a mecanismos relacionados à resposta imunológica do hospedeiro, que induz a apoptose nas células infectadas pelo HCV (HEIM; THIMME, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Os processos inflamatórios estimulam e ativam as células estreladas do fígado que se diferenciam em miofibroblastos, que são centrais na fibrogênese, pois produzem muitos dos componentes da matriz extracelular, bem como os

mediadores, levando ao acúmulo dessas proteínas. Por isso, a infecção crônica por HCV é frequentemente acompanhada de desenvolvimento de fibrose hepática (VAN DER MEER; BERENQUER, 2016).

Mesmo nas formas mais brandas da doença, a apoptose dos hepatócitos ocorrerá. O resultado dessa destruição contínua de hepatócitos e da fibrose do fígado é a cirrose (BRAGG; CROWL; MANLOVE, 2017). Se a doença não for tratada, a longo prazo, o acúmulo dessas alterações pode levar à progressão da doença para o Carcinoma Hepatocelular – *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) (OMS, 2016b).

1.1.9 Diagnóstico

Segundo o CDC (2016), as indicações de testagem para hepatite C são:

- Pessoas que nasceram entre 1945 e 1965 independentemente da exposição a fatores de risco;
- Usuários de drogas injetáveis (mesmo que no passado);
- Pessoas que receberam concentrados de fator de coagulação produzidos antes de 1987;
- Pacientes que passaram pelo procedimento de hemodiálise por um longo prazo;
- Indivíduos com níveis anormais persistentes de Alanina aminotransferase (ALT);
- Pessoas que tenham infecção por HIV;
- Pacientes que receberam transfusões de sangue e/ou componentes sanguíneos ou sofreram transplantes de órgãos no início da década de 90;
- Indivíduos com qualquer exposição ao HCV ou comportamento de risco.

O diagnóstico da hepatite C é realizado por meio de testes de detecção de anticorpos, antígenos e do genoma viral em amostras de sangue total, soro, plasma ou fluido oral, dependendo da técnica a ser empregada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; OMS, 2017c).

Os métodos imunológicos (imunoensaios e testes rápidos) são utilizados como triagem, detectando anticorpos anti-HCV e estão sujeitos ao período de janela imunológica, enquanto os testes moleculares, que detectam o genoma viral, servem como confirmação de infecção ativa (CDC, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; OMS, 2017c).

1.1.9.1 Ensaio sorológicos

Os ensaios sorológicos são baseados na detecção de antígeno viral e/ou de anticorpos específicos (anti-HCV), como IgM e IgG e estão disponíveis na forma de testes rápidos (TR), testes imunoenzimáticos (*Enzyme linked immunosorbent assay* – Elisa), imunoenaios de quimioluminescência (*Chemiluminescence Immunoassay* – CLIA) e de eletroquimioluminescência (*Electrochemiluminescence* – ECL) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; OMS, 2017c).

Os TR são ensaios cromatográficos qualitativos, de uso único, execução simples e, em geral, não requerem reagentes adicionais além dos já fornecidos no kit, nem estrutura laboratorial e profissionais especializados. Os testes aceitam amostras de fluido oral, soro, plasma e sangue, o que permite o uso de amostras obtidas por punção digital. A leitura desses testes é visual com liberação de resultados em até 30 minutos (HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014; MANNS et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; OMS, 2017c; VILLAR et al., 2015).

Já os testes de Elisa têm alta sensibilidade, baixo custo, podem ser totalmente automatizados, além de possibilitarem um volume de testagem grande, entretanto, necessitam de profissionais especializados, infraestrutura laboratorial e cadeia de frio (CHEVALIEZ, 2011; MANNS et al., 2017; OMS, 2017c; VILLAR et al., 2015).

Esse método sofreu algumas melhorias ao longo do tempo. Os testes de primeira geração capturavam a proteína NS4 do HCV e não são mais utilizados na prática clínica devido aos índices de sensibilidade e especificidade muito baixos. Os testes de segunda geração tinham como alvo as proteínas virais do Core, NS3 e NS4, enquanto os ensaios de terceira geração utilizam além destas, a região NS5, aumentando a sensibilidade e a especificidade dos testes para em torno de 99% e diminuindo o tempo de janela imunológica. Os testes Elisa de terceira geração são os utilizados para a detecção de anticorpos anti-HCV no soro ou plasma atualmente. Já estão disponíveis os testes de quarta geração, que detectam simultaneamente antígenos e anticorpos, possibilitando o diagnóstico precoce da infecção pelo HCV quando os anticorpos ainda são indetectáveis (LAPERCHÉ et al., 2005; MANNS et al., 2017; VILLAR et al., 2015).

Os ensaios CLIA podem ser qualitativos ou quantitativos e são extremamente sensíveis e específicos. Todavia, além de necessitarem equipamentos e estrutura

laboratorial, possuem um custo alto. Já os ensaios ECL possuem a vantagem do controle preciso de todo teste devido ao emprego de uma corrente elétrica para o início da reação, além da simplicidade de preparação, altos índices de sensibilidade e estabilidade dos reagentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Além dos imunoenaios convencionais, o ensaio imunoblot recombinante pode ser utilizado de forma complementar ao diagnóstico da hepatite C a fim de confirmar resultados positivos na sorologia ou em casos de resultados indeterminados, sendo útil na diferenciação de pacientes com testes imunoenzimáticos falso-positivos daqueles que, de fato, necessitarão de investigação clínica. Este é um teste mais caro que os demais e é propenso a um número de resultados indeterminados considerável, servindo apenas como uma confirmação da sorologia para a hepatite C, mas não de infecção viral ativa. Por isso, este foi substituído por técnicas moleculares amplamente utilizadas (OMS, 2017c; VILLAR et al., 2015).

A detecção anti-HCV não discrimina se a infecção é recente ou passada. A partir da análise da evolução da avidéz entre antígeno e anticorpo, é possível prever o tempo de infecção decorrida: devido à resposta imunológica recente, no início da infecção, são encontrados anticorpos com baixa avidéz. Na fase mais tardia, a avidéz tende a aumentar devido à maturação da resposta imune humoral. O primeiro teste de avidéz desenvolvido no Brasil apresentou índices de sensibilidade e especificidade altos, mostrando, assim, que a avidéz de um anticorpo pode ser um marcador confiável para identificar a infecção recente por HCV (CHEVALIEZ, 2011; COIMBRA, 2016; VILLAR et al., 2015).

1.1.9.2 Testes moleculares

Os testes sorológicos não são capazes de distinguir entre infecção aguda ou crônica. Dessa forma, a detecção do RNA viral por meio de testes de ácido nucleico tornou-se uma ferramenta primordial para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCV, permitindo detectar a presença do vírus ainda que no início da doença, antes mesmo da produção de anticorpos (CHEVALIEZ, 2011; HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014; OMS, 2017c; VILLAR et al., 2015).

Esses testes podem ser qualitativos ou quantitativos, sendo as técnicas mais utilizadas: a reação em cadeia da polimerase, amplificação mediada por transcrição

e amplificação de ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* – DNA) de cadeia ramificada (CHEVALIEZ, 2011; VILLAR et al., 2015).

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c), o teste quantitativo (carga viral) é capaz de quantificar o número de cópias de genomas virais circulantes em um paciente, sendo indicado para confirmação do diagnóstico da hepatite C, assim como para avaliação da eficácia do tratamento. O objetivo do tratamento é a obtenção da resposta virológica sustentada, ou seja, a ausência de HCV RNA 12 ou 24 semanas após o término do tratamento. O exame de genotipagem do HCV também utiliza testes moleculares capazes de identificar os genótipos, subtipos e populações mistas do vírus.

1.1.9.3 Algoritmo de testagem

O manual técnico fornecido pelo Ministério da Saúde define algoritmos de testagem com o objetivo de diagnosticar precocemente a hepatite C, encaminhando o paciente para assistência médica e tratamento o mais rápido possível e, dessa forma, aumentar sua expectativa e qualidade de vida. Um dos fluxogramas propostos emprega o uso de um TR capaz de detectar o anticorpo anti-HCV nas amostras clínicas, sendo representado na Figura 1.8 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Como apresentado na 3ª oficina sobre as estratégias de ampliação do uso e distribuição dos testes rápidos de HIV, sífilis e hepatites B e C no Brasil (2019), resultados falso-positivos podem ocorrer no TR nas seguintes situações: pacientes hemodialisados e/ou em terapia com interferon, com doenças autoimunes, gestantes, transferência de anticorpos de mãe para filho, hepatopatias, múltiplas transfusões de sangue. Já resultados falso-negativos podem ocorrer em pacientes com terapia antirretroviral, com sistema imune comprometido, realização de teste durante a janela imunológica.

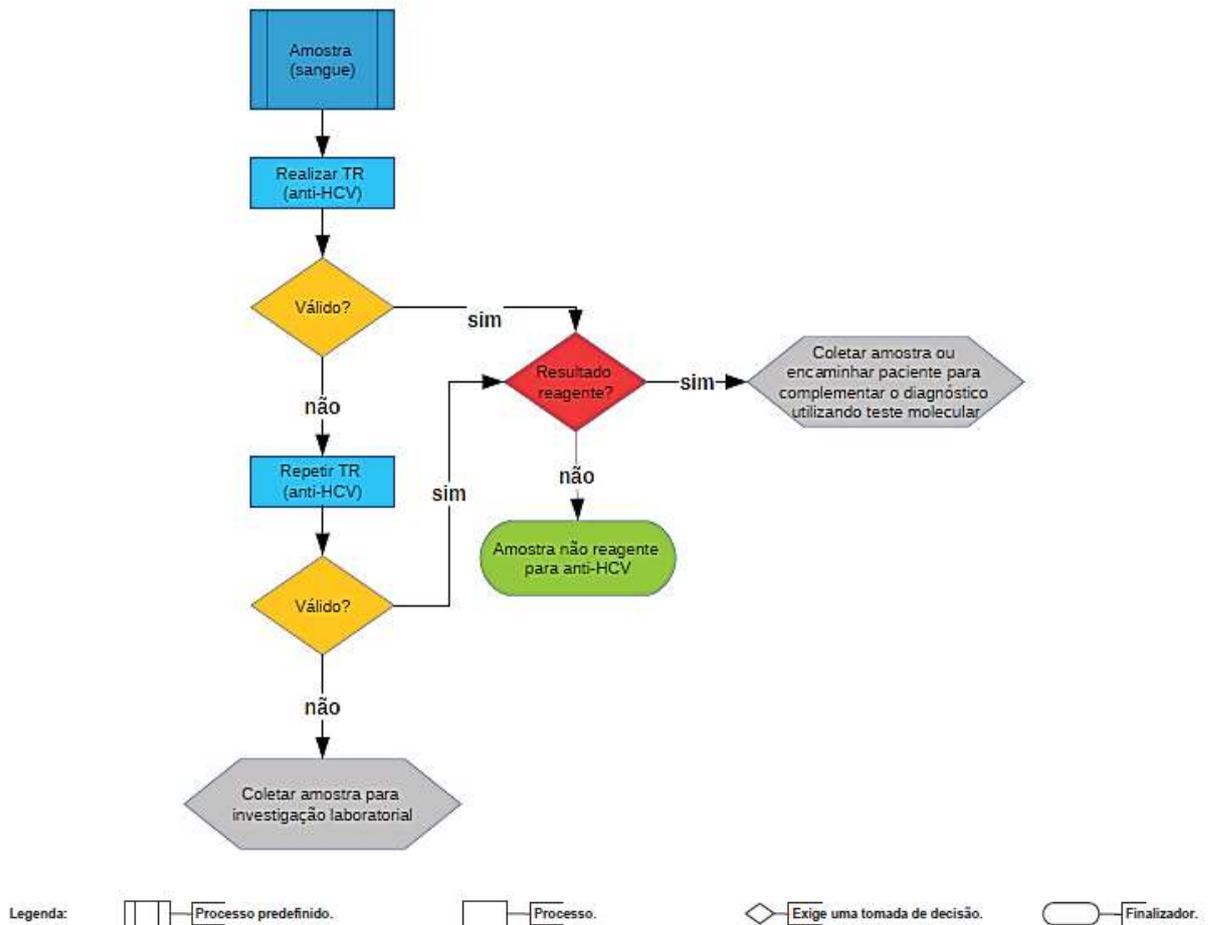


Figura 1.8 – Fluxograma para a triagem da infecção pelo HCV por meio de testes rápidos. Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b.

Resultados não reagentes são liberados como “Amostra não reagente para o anticorpo contra o HCV”. Resultados reagentes em pesquisa de anticorpo anti-HCV representam uma exposição ao vírus, sendo necessária a confirmação da infecção ativa por métodos moleculares ou testes de pesquisa de antígeno (CDC, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; OMS, 2017c).

1.2 TESTE RÁPIDO (TR)

A incessante busca por inovações no setor de diagnóstico permitiu um avanço no campo da biotecnologia levando ao desenvolvimento de novas técnicas de imunoenaios, dentre elas, a imunocromatografia de fluxo lateral (VILLAR et al., 2015).

A imunocromatografia de fluxo lateral é uma técnica derivada do teste de aglutinação em látex desenvolvida na década de 1950 (PLOTZ; SINGER, 1956).

Originalmente, esta técnica foi chamada de imunoenensaio de partícula sólida e, primeiramente, aplicada na detecção de Gonadotrofina Coriônica Humana – *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) (LEUVERING et al., 1980).

Desde o seu desenvolvimento inicial, na década de 1980, a imunocromatografia de fluxo lateral é uma tecnologia empregada na produção de testes rápidos e amplamente aplicada nos tempos atuais: pesquisa de antígenos, anticorpos, hormônios e metabólitos, drogas, doenças cardiovasculares, biomarcadores de câncer, fitossanitarismo, bioterrorismo, ciência forense, entre outros (HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017; KOCZULA; GALLOTTA, 2016; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

Devido à sua simplicidade, à aceitação de uma versatilidade de amostras em pequenas quantidades, estabilidade, validade longa, baixo custo, tempo de resposta rápida e armazenamento à temperatura ambiente, os testes rápidos podem ser utilizados em localidades remotas, onde serviços convencionais de laboratório não estejam disponíveis ou em populações de risco, sendo fundamentais para a ampliação do acesso ao diagnóstico da hepatite C (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

1.2.1 Estrutura do teste rápido de fluxo lateral

O teste imunocromatográfico de fluxo lateral é confeccionado com a sobreposição de membranas específicas com funções distintas (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017):

- Membrana da amostra, que recebe o material biológico a ser analisado;
- Membrana do conjugado, que contém o complexo revelador da reação antígeno-anticorpo;
- Membrana de reação, que varia de acordo com a espessura e porosidade, onde são impregnados os antígenos ou os anticorpos de pesquisa;
- Membrana residual, que absorve o excesso da solução promovendo o fluxo unilateral da solução.

A Figura 1.9 fornece uma visão esquemática geral de um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017).

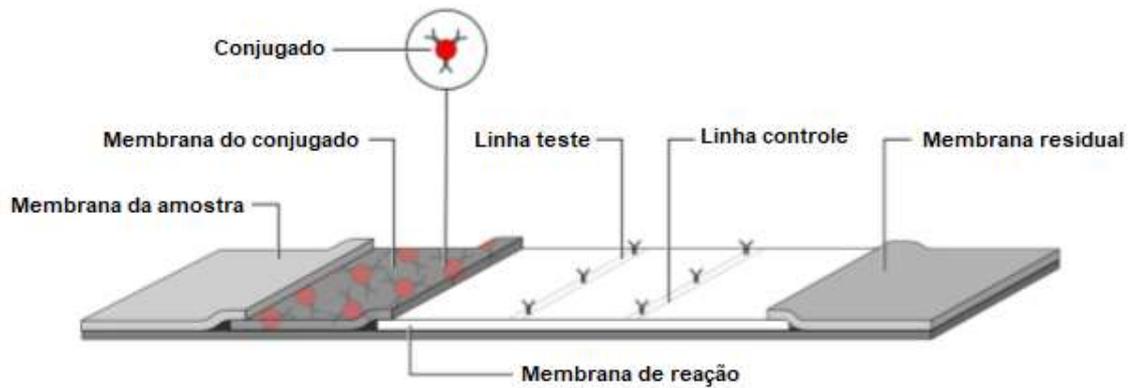


Figura 1.9 – Esquema básico de um teste rápido de fluxo lateral. Fonte: Adaptado de HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017.

1.2.1.1 Cartão adesivo

A dificuldade mais comum durante o desenvolvimento de um teste rápido é causada pela complexidade oculta da simplicidade do dispositivo. Normalmente, a atenção está voltada para encontrar o método de detecção mais adequado ou escolher o melhor antígeno ou anticorpo. Todavia, para produzir um produto consistente e de alta qualidade, é importante prestar atenção em outros elementos do teste, incluindo os básicos, como cartão adesivo (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Os materiais utilizados para ensaios de fluxo lateral são porosos e relativamente fracos. Para compensar, eles são laminados em cartões de suporte, geralmente, por meio de um adesivo, fornecendo rigidez e fácil manuseio da tira. Esse adesivo pode ter uma incompatibilidade química com os componentes do ensaio, especialmente após o armazenamento a longo prazo. Por esse motivo, a seleção de um cartão adesivo que funcione de forma compatível com os materiais do ensaio de fluxo lateral é crítica e ajuda a garantir o bom funcionamento desses testes ao longo de sua vida útil planejada (JONES; HOPKINS, 2000; WONG; TSE, 2009).

1.2.1.2 Membrana da amostra

O material da membrana da amostra é escolhido antecipadamente de acordo com o objetivo do teste e as propriedades da amostra. Normalmente, é composta de celulose ou de fibra de vidro. Essa escolha pode impactar diretamente no

desempenho do ensaio devido à não-homogeneidade dos materiais e ao tipo de aglutinantes que eles contêm (SAJID; KAWDE; DAUD, 2015; WONG; TSE, 2009).

A função dessa membrana é aceitar o material biológico a ser analisado, tratá-lo para que seja compatível com o ensaio e distribuí-lo para a membrana do conjugado de maneira homogênea, contínua e consistente. A membrana da amostra também pode servir como filtro, removendo partículas não necessárias, como células vermelhas do sangue (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

A membrana da amostra pode ser tratada previamente com impregnações com tampões salinos, proteínas, detergentes, substâncias surfactantes, reagentes de bloqueio ou outros líquidos a fim de influenciar o fluxo da amostra e torná-la adequada para a interação com todo sistema de detecção, incluindo remoção de interferentes e ajuste de pH (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009; SAJID; KAWDE; DAUD, 2015).

1.2.1.3 Membrana do conjugado

A lista de marcadores de conjugado ou partículas de detecção é vasta, inclui: nanopartículas de ouro, esferas de látex coloridas, partículas magnéticas, nanopartículas de carbono, corantes têxteis, enzimas, lipossomas, nanopartículas de selênio, nanopartículas de prata entre outros. A escolha entre essas opções, usualmente, é feita por uma combinação de requisitos. Porém, qualquer material que seja usado como marcador deve ser detectável em concentrações muito baixas, estável, além manter suas propriedades após o processo de conjugação (SAJID; KAWDE; DAUD, 2015; WALTHER; FRISSE, 2008).

Atualmente, a partícula de detecção mais utilizada é o ouro coloidal que é composta de um núcleo de ouro elementar cercado por uma dupla camada iônica negativa. O ouro coloidal é inerte, tem cor intensa, não implica no desenvolvimento de etapas para visualização e possui estabilidade nas formas líquida e seca. Embora existam fontes comerciais disponíveis, é possível preparar o ouro coloidal em laboratório a baixo custo: basicamente, todos os métodos utilizam um agente redutor para converter ouro iônico em ouro metálico de maneira controlada (WONG; TSE, 2009).

O ouro coloidal tem grande afinidade por biomoléculas, sendo facilmente funcionalizado: para utilização em imunoenaios de fluxo lateral, ele passa pelo processo de conjugação com um dos elementos biológicos específicos do teste,

como anticorpos, antígenos ou outras moléculas, formando mais um componente do ensaio, o conjugado. Atualmente, o mais utilizado nesse tipo de ensaio é o complexo de ouro coloidal com proteína A, primeiramente, descrito em 1984. A impregnação deste na membrana, tipicamente, pode ocorrer de duas formas: imersão da membrana na suspensão do conjugado ou aspersão do conjugado na membrana utilizando equipamentos apropriados (BRADA; ROTH, 1984; WONG; TSE, 2009).

A principal função da membrana do conjugado é conter as partículas de detecção conjugadas, mantê-las funcionalmente estáveis em toda sua vida útil e liberá-las uniformemente pela membrana de reação quando o teste for executado (KOCZULA; GALLOTTA, 2016; WALTHER; FRISSE, 2008).

Para obter bons resultados, a membrana do conjugado deve ser constituída de materiais hidrofílicos que permitam uma migração rápida dos componentes do teste. Se necessário, elas podem ser tratadas previamente com solução contendo proteínas estabilizadoras, polímeros sintéticos hidrofílicos, surfactantes e açúcares que mantêm as propriedades de ligação do anticorpo e facilitam a re-solubilização no momento do teste: após a secagem, as moléculas de açúcar formam uma camada em torno do conjugado, estabilizando sua estrutura biológica. Quando a amostra migra para a membrana do conjugado, as moléculas de açúcar se dissolvem rapidamente, transportando os componentes para a membrana de reação. Os materiais mais usados para compor essa membrana são fibras de vidro ou poliésteres (KOCZULA; GALLOTTA, 2016; WALTHER; FRISSE, 2008; WONG; TSE, 2009).

1.2.1.4 Membrana de reação

A membrana de reação, provavelmente, o componente mais importante do ensaio de fluxo lateral, é bastante frágil e, apesar de poder ser composta de diversos materiais, como polietileno e nylon, o mais utilizado é a nitrocelulose. Essa preferência se deve a características como: baixo custo, variedade de produtos disponíveis, alta capacidade de ligação de proteínas, relativa facilidade de manuseio. A nitrocelulose tem propriedade hidrofóbica e substâncias surfactantes podem ser usadas para tratamento prévio da membrana, tornando-a mais hidrofílica (WALTHER; FRISSE, 2008; WONG; TSE, 2009).

A membrana de nitrocelulose está disponível em diferentes tamanhos de poros, os quais podem variar de 0,05µm a 18µm. O tamanho do poro define a área

de superfície interna que está disponível para a ligação de proteínas: quanto menor o tamanho do poro, maior a capacidade de ligação das proteínas à membrana. O tamanho do poro também interfere na velocidade de migração dos componentes do ensaio: quanto maior o tamanho do poro, mais rápida é a velocidade de migração destes (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009; WALTHER; FRISSE, 2008).

A escolha da membrana de reação é uma etapa crítica ao processo e está relacionada ao fluxo capilar dos reagentes, o qual afeta diretamente os índices de sensibilidade e especificidade do ensaio, a deposição dos reagentes e a consistência da linha teste (MILLIPORE, 2013).

A função da membrana de reação é imobilizar, irreversivelmente, as proteínas nas áreas de teste e de controle e manter a estabilidade delas, preservando suas propriedades durante a vida útil do produto. No momento em que o ensaio é realizado, além de orientar o fluxo consistente da amostra e do conjugado para a área de detecção do teste e permitir que a reação nas linhas teste e controle aconteçam, a membrana de reação também tem a função de permitir que o excesso dos componentes prossiga sem que haja ligação (MILLIPORE, 2013; WALTHER; FRISSE, 2008; WONG; TSE, 2009).

1.2.1.5 Membrana residual

A membrana residual, também chamada de absorvente ou de descarte, está localizada na extremidade oposta à membrana da amostra e é composta por material hidrofílico com alta absorção de água, tipicamente, celulose de alta densidade. Sua função é permitir que o fluxo lateral ocorra e agir como um depósito para os reagentes do teste, absorvendo e mantendo, nesta região, todo fluido adicionado (WALTHER; FRISSE, 2008).

Após o término do ensaio, a membrana de reação começa a secar e a direção do fluxo dos componentes se inverte, podendo gerar resultados falso-positivos quando a leitura é feita tardiamente (WALTHER; FRISSE, 2008; WONG; TSE, 2009).

1.2.1.6 Suporte plástico

A escolha do suporte plástico é outra etapa crítica ao processo. Embora não sejam obrigatórios, em muitos ensaios, as tiras de fluxo lateral são colocadas nesses suportes, também chamados de cassetes, os quais devem ser biocompatíveis com os componentes do teste. Os suportes plásticos fornecem a força mecânica necessária ao dispositivo de teste e devem ter medidas compatíveis com o tamanho das tiras, acomodando-as sem influenciar na migração dos componentes do ensaio. Para isso, pinos e barras internas são usados para manter a tira no lugar correto (MILLIPORE, 2013; WALTHER; FRISSE, 2008).

Além de resistência, o suporte plástico também oferece proteção ao ensaio, evitando que o usuário aplique a amostra em qualquer lugar exceto na janela destinada a isso ou ainda que ocorra qualquer respingo na membrana de reação interferindo na qualidade do teste. A janela de aplicação da amostra deve ser adequada para o volume da amostra a ser aplicado (MILLIPORE, 2013; WALTHER; FRISSE, 2008).

A tampa do suporte plástico é usada para indicar a posição das linhas (T e C) na janela de visualização do teste. O fechamento desse suporte é uma etapa crítica, pois a aplicação de uma pressão inadequada sobre os componentes do teste, pode impedir o bom contato entre eles e um fluxo confiável ou até mesmo bloquear a migração de todo conjunto (MILLIPORE, 2013; WALTHER; FRISSE, 2008).

1.2.2 Etapas da produção do teste rápido de fluxo lateral

A produção de um teste rápido é relativamente acessível, com processos e equipamentos já desenvolvidos e disponíveis tanto na literatura quanto no mercado, além de ser facilmente escalonável a um grande volume de produção (WONG; TSE, 2009). As etapas de produção do TR no desenvolvimento deste trabalho estão representadas na Figura 1.10.

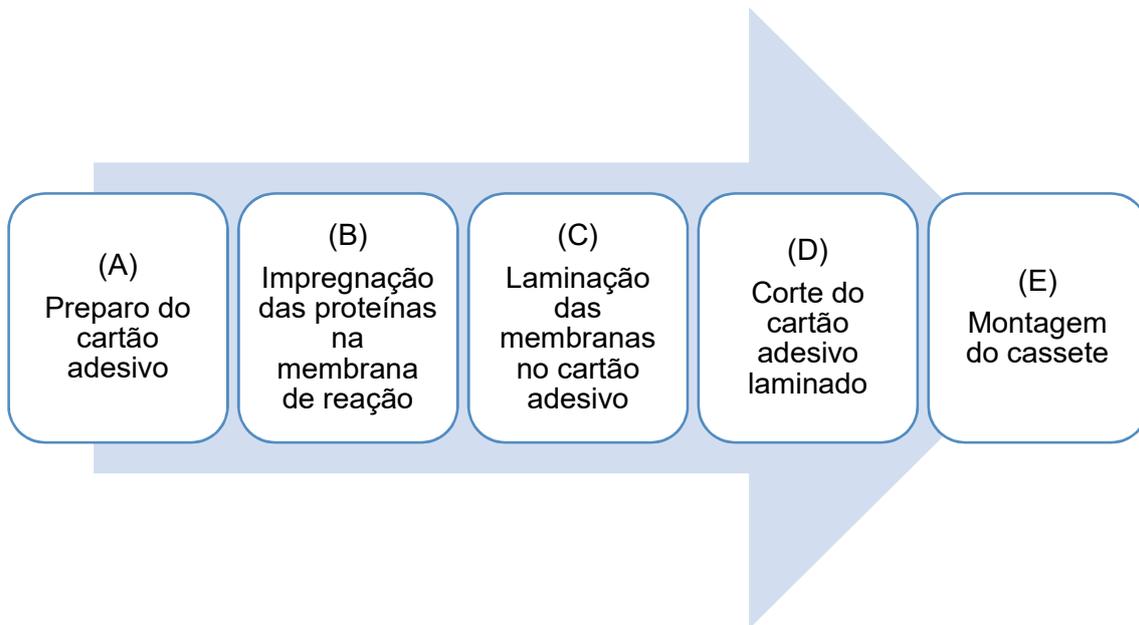


Figura 1.10 – Fluxograma das etapas da produção do teste rápido deste trabalho para execução do ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral. Elaboração própria a partir de WONG; TSE, 2009.

1.2.2.1 Preparo do cartão adesivo (A)

A primeira etapa do processo de produção do TR é o preparo do cartão adesivo. Utilizando um molde, linhas com as alturas pré-estabelecidas para ensaio de fluxo lateral são marcadas no papel protetor do adesivo a fim de orientarem a futura laminação das membranas. Essas linhas, de baixo para cima, são referentes: à membrana residual (15mm), à membrana de reação (25mm), à membrana do conjugado (10mm) e à membrana da amostra (15mm), conforme demonstrado na Figura 1.11 (WONG; TSE, 2009).

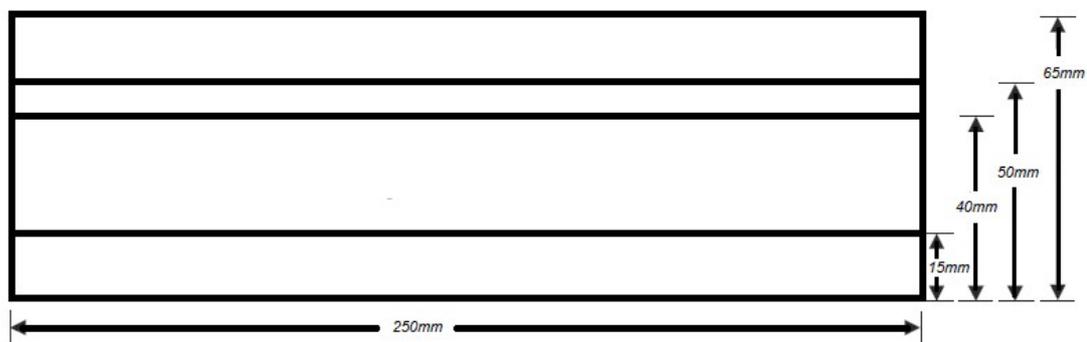


Figura 1.11 – Dimensões para marcação no cartão adesivo para posterior laminação das membranas. Fonte: Adaptado de WONG; TSE, 2009.

Retira-se o papel protetor da região de 40mm e a membrana de reação é adicionada ao cartão adesivo.

1.2.2.2 Impregnação das proteínas na membrana de reação (B)

Pelo menos duas linhas são impregnadas na membrana de reação: a linha teste (T), com antígenos ou anticorpos que capturam o analito e a linha controle (C), com anticorpos anti-imunoglobulinas, sendo utilizada como controle interno da reação. Essa impregnação pode ocorrer com o uso de sistemas de distribuição de contato ou sem contato e é um processo sensível a condições ambientais, que podem afetar a ligação das proteínas. Sugere-se que a umidade da sala de impregnação seja estabelecida em torno de 50% (40-60% sob temperatura de 18-22°C). A ligação das proteínas à nitrocelulose ocorre por meio de uma combinação de forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017; WALTHER; FRISSE, 2008; WONG; TSE, 2009).

Após a impregnação das linhas teste e controle, a membrana de reação pode passar pela etapa de bloqueio com soluções contendo proteínas, polímeros e surfactantes a fim de manter as características de hidratação, a estabilidade das proteínas impregnadas nas linhas teste e controle e taxas de fluxo, além de evitar ligações inespecíficas e também pela etapa de secagem (WONG; TSE, 2009).

1.2.2.3 Laminação das membranas no cartão adesivo (C)

Após a impregnação das proteínas na membrana de reação, ocorre a etapa de laminação, que consiste na sobreposição de membranas: manualmente, são adicionadas, ao cartão adesivo, a membrana impregnada com o conjugado sobreposta pela membrana da amostra e, por fim, a membrana residual (absorvente) na outra extremidade do cartão, conforme mostrado na Figura 1.12 (MILLIPORE, 2013).

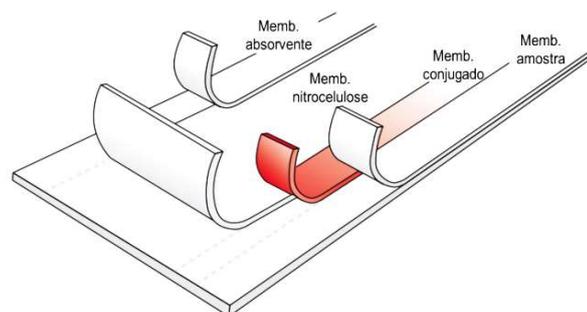


Figura 1.12 – Laminação no cartão adesivo. Fonte: Adaptado de MILLIPORE, 2013.

1.2.2.4 Corte do cartão adesivo laminado (D)

Posteriormente à laminação das membranas, o cartão adesivo é cortado transversalmente em tiras de 5,0mm de largura utilizando um equipamento, a guilhotina (MILLIPORE, 2013).

1.2.2.5 Montagem do cassete (E)

As tiras são encaixadas em suportes plásticos próprios para teste rápido de fluxo lateral e são fechados manualmente ou por meio de equipamentos específicos para essa função. O TR está, então, pronto para uso e o ensaio pode ser executado.

1.2.3 Princípios do imunoensaio de fluxo lateral para detecção de anticorpos

A amostra é aplicada em uma extremidade da tira, na membrana da amostra. Quando a solução tampão é adicionada a essa mesma membrana, os componentes do sistema são forçados a migrar em sentido lateral por capilaridade até a membrana residual (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

A amostra e o tampão aplicados no início do ensaio passam pela área da membrana do conjugado, reidratando a partícula conjugada que foi impregnada e seca previamente. São partículas coloridas ou fluorescentes, mais comumente, ouro coloidal e microesferas de látex conjugadas a um dos componentes biológicos específicos do ensaio, nesse caso, proteína A. Os anticorpos da amostra interagem com esse conjugado e ambos prosseguem pela membrana de reação em direção à área de teste e controle (KOCZULA; GALLOTTA, 2016; WONG; TSE, 2009).

A membrana de reação é a área de detecção do teste onde componentes biológicos específicos estão imobilizados em linhas: os antígenos de interesse são impregnados na linha T e, na linha C, os anticorpos secundários, anti-imunoglobulinas específicas da espécie (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; KOCZULA; GALLOTTA, 2016; SAJID; KAWDE; DAUD, 2015).

Os antígenos de interesse impregnados na linha T capturam o analito da amostra (anticorpos ligados ao conjugado) quando presente. Já a linha C, geralmente, composta de proteína A, a qual tem grande afinidade pela fração cristalizável (Fc) das imunoglobulinas da classe G presentes na amostra, funciona

como uma validação do teste confirmando a aplicação da amostra e o fluxo adequado de todo sistema (FORSGREN; NORDSTRÖM, 1974; HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017; OMS, 2016b; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009).

O complexo antígeno-anticorpo é, então, revelado por esse conjugado, que se agrega também ao complexo deixando-o visível (corado). A leitura é visual ou por meio de um leitor. O excesso de reagentes ultrapassa as linhas de captura e é depositado na membrana residual, na outra extremidade da tira (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017; WONG; TSE, 2009).

A Figura 1.13 sintetiza os princípios do imunoenensaio de fluxo lateral para detecção de anticorpos (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

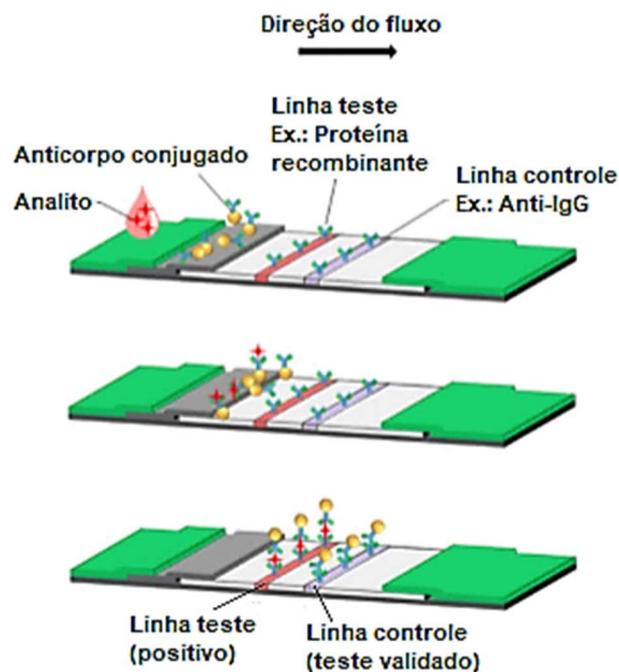


Figura 1.13 – Funcionamento de um teste rápido de fluxo lateral para detecção de anticorpos. Fonte: Adaptado de KOCZULA; GALLOTTA, 2016.

1.2.4 Proteínas recombinantes

A descoberta da tecnologia do DNA recombinante permitiu a criação de células artificialmente construídas para produzir proteínas novas ou aquelas já encontradas na natureza. Também conhecida como engenharia genética, a aplicação desta técnica foi fundamental para o avanço da biotecnologia nos diversos setores, possibilitando a produção de proteínas em larga escala de maneira mais fácil, pura e homogênea. A aplicação destas técnicas de biologia molecular permitiu

o desenvolvimento de kits para diagnósticos a partir de antígenos produzidos artificialmente, as proteínas recombinantes (REIS et al., 2009).

A proteína recombinante é uma proteína produzida a partir da expressão de uma molécula de DNA recombinante em um sistema adequado. As características ideais de um sistema de expressão são (MAKRIDES, 1996; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2015):

- produzir a proteína na conformação correta;
- alta produtividade;
- facilitar o processo purificação;
- fácil manipulação e manutenção;
- seguro e econômico.

As proteínas recombinantes podem ser obtidas em diferentes hospedeiros, como: bactérias, leveduras, mamíferos, insetos, plantas. A expressão de proteínas recombinantes em sistema procarioto, especialmente, em *Escherichia coli*, é o veículo de propagação mais difundido devido às vantagens abaixo (MAKRIDES, 1996; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2015; ZELTINS, 2013):

- método rápido de expressão;
- altos níveis de expressão;
- controle da expressão gênica;
- baixo custo de produção;
- processo de escalonamento simples;
- sistema de expressão bem estabelecido – genética caracterizada.

As proteínas são purificadas usando técnicas de cromatografia que as separam de acordo com diferenças em suas propriedades específicas, podendo ser por: gel filtração, interação hidrofóbica, troca iônica, afinidade, fase reversa. Um procedimento amplamente utilizado é o de expressar a proteína recombinante em fusão com uma pequena sequência de aminoácidos específicos (etiqueta) que facilitam sua purificação por meio de cromatografia por afinidade em resinas às quais se encontram acopladas moléculas ligantes, permitindo que a etiqueta possa se ligar especificamente (GE HEALTHCARE, 2009).

1.2.5 Testes rápidos Anti-HCV

Nos últimos anos, vários ensaios imunocromatográficos foram desenvolvidos utilizando proteínas recombinantes. Os testes atuais apresentam uma combinação

de antígenos (core, NS3, NS4 e NS5) na linha T que pode variar de acordo com o fabricante (KHUROO; KHUROO; KHUROO, 2015; SHIVKUMAR et al., 2012).

Indivíduos infectados pelo HCV produzem anticorpos contra epítomos de proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. Os primeiros anticorpos específicos para HCV detectáveis no soro são os que visam às regiões NS3 e core (NIKOLAEVA et al., 2002). Já um estudo publicado em 2005 mostrou que, no momento da soroconversão, os anticorpos contra proteínas não-estruturais foram detectados com mais frequência do que os anticorpos contra a proteína do core (NETSKI et al., 2005). Outra pesquisa publicada em 2009 mostrou a frequência das respostas de anticorpos contra proteínas do HCV. De 68 amostras positivas (HCV RNA e anti-HCV), o perfil de soroconversão foi de: 97% (core), 85% (NS4B), 68% (NS3), 53% (NS5A), 31% (E2), 28% (NS4A) e 22% (E1) (SILLANPÄÄ et al., 2009).

1.2.5.1 Critérios de aceitação

A OMS realiza avaliações de diagnósticos comercialmente disponíveis, inclusive, para hepatite C, atividade chamada, atualmente, de “Programa de Pré-qualificação de Diagnóstico da OMS”. Após a finalização da implementação desse programa, a pré-qualificação se tornará o único determinante da elegibilidade para a contratação de kits de diagnóstico pela OMS. Os critérios de aceitação referentes aos índices de sensibilidade e especificidade dos testes rápidos anti-HCV estão descritos na Tabela 1.3 (OMS, 2017b).

Tabela 1.3 – Critérios de aceitação da OMS para avaliação laboratorial para testes rápidos anti-HCV.

Analito	Testes Rápidos
Anti-HCV	Sensibilidade > 98% Especificidade > 97%

No final do ano de 2016, houve a primeira pré-qualificação de um teste rápido para diagnóstico da hepatite C: kit SD Bioline HCV. Em 2017, o produto OraQuick HCV Rapid Antibody Test Kit foi pré-qualificado pela OMS (OMS, 2017d, 2018a).

O MS do Brasil também estabelece critérios de aceitação referentes aos índices de sensibilidade e especificidade dos kits, porém, com uma faixa de aprovação mais estreita, conforme descrito na Tabela 1.4 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Tabela 1.4 – Critérios de sensibilidade e especificidade adotados pelo Ministério da Saúde para os testes rápidos adquiridos.

Analito	Testes Rápidos
Anti-HCV	Sensibilidade $\geq 99,4\%$ Especificidade $\geq 99,4\%$

Atualmente, como apresentado na 3ª oficina sobre as estratégias de ampliação do uso e distribuição dos testes rápidos de HIV, sífilis e hepatites B e C no Brasil em maio (2019), o Ministério da Saúde do Brasil distribuiu o kit Alere HCV – SD.

2 JUSTIFICATIVA

A hepatite C é um assunto preocupante de saúde pública tanto no Brasil quanto no mundo, pois, geralmente, é diagnosticada décadas depois da infecção e tende a evoluir para a forma crônica, podendo desenvolver fibrose hepática, cirrose, câncer hepático e, até mesmo, levar o paciente a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018c).

Números do CDC (2019) mostram que:

- Cerca de 50% das pessoas que vivem com hepatite C não sabem que estão infectadas;
- De 75 a 85% das pessoas infectadas com o HCV desenvolvem a doença na forma crônica;
- De 5 a 20% das pessoas com hepatite C crônica desenvolvem cirrose;
- De 1 a 5% das pessoas morrerão com cirrose ou câncer de fígado.

As Sociedades Brasileiras de Hepatologia e de Infectologia (2016) estimam que há cerca de 2 milhões de pessoas infectadas com o HCV no país e a maioria desconhece seu diagnóstico, constituindo elo fundamental na cadeia de transmissão dessa infecção. A menos que estas pessoas sejam diagnosticadas precocemente e encaminhadas para tratamento, o número das mortes por Hepatite C continuará a aumentar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; OMS, 2017a).

Um teste rápido tem a capacidade de funcionar como uma ferramenta prática, permitindo o diagnóstico precoce da hepatite C, representando um importante instrumento no cenário epidemiológico brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). A execução do teste é manual e é realizada em dispositivo específico, com observação visual e de fácil interpretação, não demandando, assim, equipamentos nem profissionais especializados (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014; KOCZULA; GALLOTTA, 2016; VILLAR et al., 2015; WONG; TSE, 2009).

O mercado de testes rápidos é crescente com alto potencial de comercialização (FIND/CHAI, 2017). O Ministério da Saúde do Brasil estima que, até o ano de 2020, 15.384.000 pessoas serão testadas para hepatite C, dentre estas,

40.000 terão a confirmação do diagnóstico. Estes números são ainda maiores para 2025, com previsão de até 30.098.000 indivíduos testados para a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Bio-Manguinhos possui grande experiência no desenvolvimento, produção e registro de testes rápidos, dominando amplo conhecimento nessa área, inclusive, advindos da participação em processos de transferência de tecnologia nessa plataforma. Bio-Manguinhos já possui todos os equipamentos necessários para a produção de um teste rápido, além da detenção de procedimentos e de profissionais treinados e qualificados para essas atividades. Dessa forma, a produção de um teste rápido para a detecção da hepatite C torna-se relativamente fácil e simples para o Instituto (BIO-MANGUINHOS, 2016a, b).

Alinhando as demandas de saúde pública (nacional e mundial) ao desenvolvimento do parque industrial brasileiro, às políticas de inovação de Bio-Manguinhos e da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e ao uso de toda experiência do Instituto na área de testes rápidos, este trabalho tem por objetivo avaliar o desempenho de proteínas recombinantes de HCV visando ao desenvolvimento futuro de um teste rápido para detecção da Hepatite C. Esse desenvolvimento contribuirá para a ampliação de seu portfólio, além de disponibilizar, para o MS, um teste rápido sensível e específico para detecção da hepatite C de desenvolvimento nacional, colaborando para alcançar, assim, o objetivo global de eliminação da hepatite C (OMS, 2016a, 2017a; OPAS, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar o desempenho de proteínas recombinantes de HCV em plataforma de teste rápido de fluxo lateral visando ao diagnóstico.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil eletroforético das proteínas recombinantes de HCV selecionadas.
- Realizar a triagem das proteínas recombinantes de HCV selecionadas pelo Imunoensaio de Impregnação de Multi-antígenos – *Multi Antigen Print Immunoassay* (Mapia).
- Selecionar o melhor conjunto para o teste rápido de fluxo lateral (proteína recombinante de HCV, membrana de reação, conjugado, tampão de corrida) visando a obter um protótipo.
- Analisar o desempenho do teste rápido em amostras clínicas.
- Determinar os valores de sensibilidade, especificidade e concordância pelo índice Kappa quando comparado a um teste rápido comercial.
- Avaliar o desempenho do teste rápido com amostras positivas para outras doenças para análise de reação cruzada e em simulação de sangue total (*spike*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Proteínas recombinantes

Sete proteínas recombinantes de HCV foram avaliadas, conforme especificado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Proteínas recombinantes de hepatite C a serem avaliadas com suas respectivas especificações.

Codificação	Proteína	Peso Molecular	Proteína viral	Genótipo	Concentração
A	401	33 kDa	Core, NS3, NS4, NS5	1b	1,0 mg/mL
B	4.8	50 kDa	Core, NS4, NS5	4	1,1 mg/mL
C	4.7	50 kDa	Core, NS4, NS5	3a	0,5 mg/mL
D	4.5	50 kDa	Core, NS4, NS5	1b	0,25 mg/mL
E	207	70 kDa	Core, NS3, NS4, NS5	1a, 1b	1,0 mg/mL
F	241	114 kDa	Core	1b	1,0 mg/mL
G	255	114 kDa	NS3	1b	1,0 mg/mL

As proteínas recombinantes A, E, F e G são comerciais importadas, enquanto as proteínas B, C e D foram desenvolvidas nacionalmente (LIMA, 2017).

Os sistemas de expressão dessas proteínas, assim como a técnica de purificação aplicada podem ser observados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Sistemas de expressão e técnicas de purificação das proteínas recombinantes.

Proteína	Sistema de expressão	Purificação
A	<i>Escherichia coli</i>	Não informado
B	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografia por afinidade
C	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografia por afinidade
D	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografia por afinidade
E	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografia
F	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografia
G	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografia

4.1.2 Membranas de reação

Nas padronizações do TR, foram utilizadas membranas de reação de três porosidades diferentes, todas compostas de nitrocelulose com 25mm de largura, conforme especificado na Tabela 4.3 (MDI, 2018; WALTHER; FRISSE, 2008).

Tabela 4.3 – Especificações das membranas de reação.

Marca	Tamanho do poro	Tempo do fluxo
Whatman / GE Life Sciences	3µm	160-220s
Advanced Microdevices Pvt. Ltd.	10µm	112-168s
Advanced Microdevices Pvt. Ltd.	15µm	75-125s

4.1.3 Amostras de soro humano

As seguintes amostras foram utilizadas no estudo:

- Painéis de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) – Bio-Manguinhos.

A Divisão de Produção de Painéis Sorológicos de Bio-Manguinhos (Dipps) recebe bolsas de plasma que, após seu processamento, originam amostras que são

enviadas aos laboratórios de referência para caracterização. A Dipps é responsável pela caracterização de HIV e HTLV (Vírus T-linfotrópicos humanos), o Laboratório de Hepatites Virais do IOC pela caracterização de hepatites (B e C), o Laboratório da Universidade Federal de Santa Catarina pela caracterização de sífilis e o Laboratório de Sorologia para Doença de Chagas da Universidade Federal de Goiás, pela caracterização de doença de Chagas.

As amostras concordantes são selecionadas para composição dos painéis sorológicos e são enviadas para validação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (LAMEIRAS, 2017).

- Amostras clínicas negativas obtidas por convênio com o Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio) e Lated/Bio-Manguinhos.

Conforme critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, ensaios de triagem de alta sensibilidade devem ser realizados obrigatoriamente a cada doação para detecção de marcadores para as seguintes doenças: sífilis, doença de Chagas, hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV (ANVISA, 2014, 2016).

- Amostras clínicas positivas para HCV cedidas pelo Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): projeto CAAE: 34049514.7.0000.5248, parecer 889.606.

- Amostras clínicas positivas para HCV cedidas pelo Instituto Nacional de Infectologia (INI) aprovadas pelo CEP: projeto CAAE 54429516.0.0000.5262, parecer 1.476.590.

- Amostras clínicas positivas para Zika ou dengue cedidas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul aprovadas pelo CEP: projeto 1.432.032.

Os quantitativos disponíveis de cada tipo de amostra estão representados na Tabela 4.4 e o fluxograma de utilização destas da Figura 4.1.

Tabela 4.4 – Quantitativos disponíveis de cada tipo de amostra.

Origem	Instituição	Doença/Vírus	Perfil	Quantidade disponível
AEQ	Bio-Manguinhos	HCV	Positivo	68
AEQ	Bio-Manguinhos	HCV	Negativo	164
AEQ	Bio-Manguinhos	HTLV	Positivo	10
AEQ	Bio-Manguinhos	HIV	Positivo	10
AEQ	Bio-Manguinhos	HBV	Positivo	10
AEQ	Bio-Manguinhos	Sífilis	Positivo	10
AEQ	Bio-Manguinhos	Chagas	Positivo	10
Clínica	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul	Zika	Positivo	10
Clínica	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul	Dengue	Positivo	10
Clínica	IOC	HCV	Positivo	148
Clínica	INI	HCV	Positivo	20
Clínica	Hemorio	HCV	Negativo	265

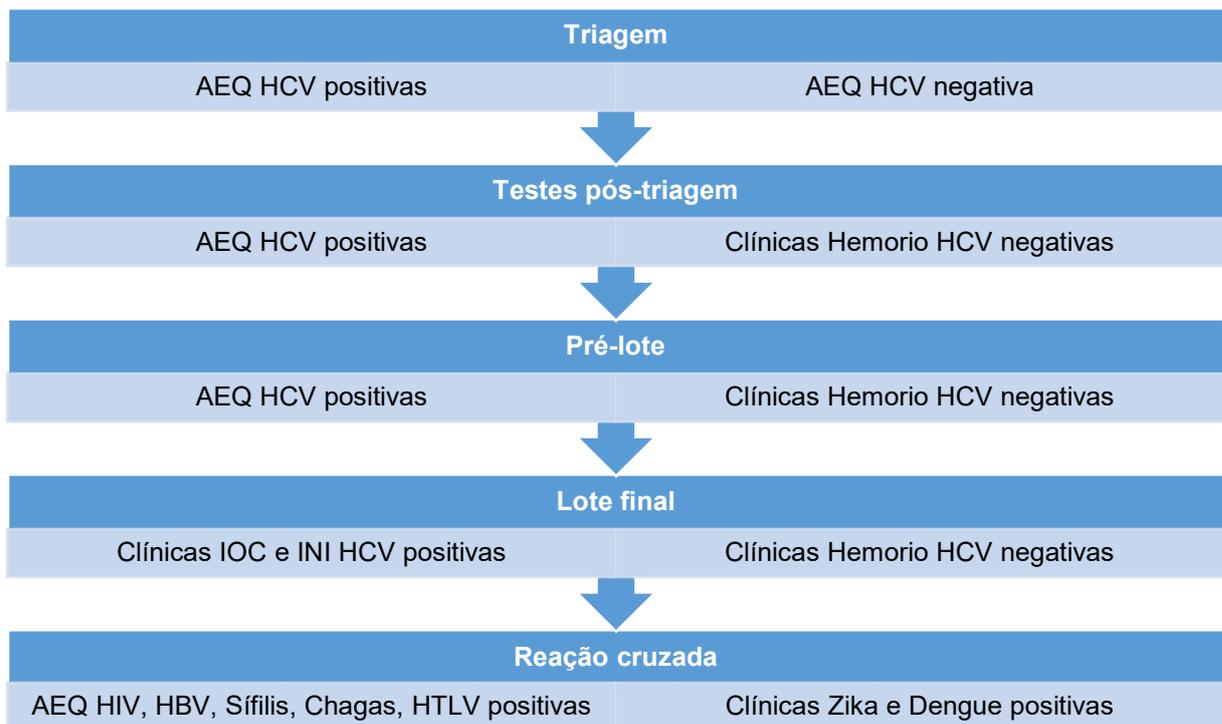


Figura 4.1 – Fluxograma de utilização de cada tipo de amostra.

4.2 METODOLOGIA

Todas as etapas de testes foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Lated), pertencente à Bio-Manguinhos/Fiocruz, seguindo as normas de Boas Práticas de Laboratório (FDA, 2016; INMETRO, 2018) e de Biossegurança (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

4.2.1 Caracterização das amostras

4.2.1.1 Amostras positivas (AEQ e clínicas)

Amostras AEQ e clínicas positivas para HCV foram analisadas para HIV utilizando o teste rápido de duplo percurso (DPP) – TR DPP HIV 1/2 – Bio-Manguinhos com o objetivo de verificar o desempenho do kit frente a indivíduos coinfectados com HCV e HIV devido a possíveis interferências na produção e consequente detecção dos anticorpos para HCV (BARBOSA et al., 2017).

As amostras clínicas positivas cedidas pelo IOC também foram testadas para HCV utilizando o kit WAMA Imuno-Rápido HCV para fins comparativos e de determinação do índice Kappa (LANDIS; KOCH, 1977). Essas amostras também foram testadas em plataforma molecular a fim quantificar o vírus (carga viral HCV).

4.2.1.2 Amostras clínicas negativas

Também a fim de evitar possíveis interferências na análise de resultados, as amostras clínicas negativas cedidas pelo Hemorio foram testadas para Dengue (IgM e IgG) utilizando os kits abaixo respectivamente (SCALIONI et al., 2014):

- Panbio Dengue IgM Capture Elisa;
- Panbio Dengue IgG Capture Elisa.

4.2.2 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica utilizada na análise de macromoléculas, na qual partículas carregadas movem-se sob a influência de um campo elétrico, resultando em sua separação. A eletroforese em gel de poliacrilamida - *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Page) associada ao dodecilsulfato de sódio – *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), descrita em 1970, é uma técnica muito usada para análise de proteínas, por exemplo, para determinação de sua integridade (HAMES, 1998; LAEMMLI, 1970).

A análise do perfil eletroforético das proteínas (A, B, C, D, E, F, G) foi realizada em gel gradiente NuPage Bis-Tris 4-12%, da Novex Life Technologies com base na técnica descrita por Laemmli (1970). Utilizou-se um padrão de peso

molecular conhecido Bio-Rad Padrão prestained SDS – Page e um controle interno de Albumina Sérica Bovina – *Bovine Serum Albumin* (BSA).

As amostras e o controle interno foram diluídos 1:1 em tampão de amostra com ditioneitol (DTT) em um volume final de 10µl e fervidos por 5 minutos. O DTT é um agente redutor, o qual quebra as ligações por pontes dissulfeto, auxiliando na eliminação da estrutura tridimensional das proteínas (JÚNIOR, 2001).

O padrão de peso molecular (10µl), o controle interno em diferentes concentrações (5µl) e as amostras contendo as proteínas devidamente desnaturadas e reduzidas (5µl) foram distribuídos nos poços do gel comercial do fabricante Novex Life Technologies contendo o tampão de corrida MES SDS Running Buffer. A cuba foi conectada à fonte de eletroforese Bio-Rad Power Pac Hctm e a corrida iniciada com uma corrente fixa em 150 Volts. As proteínas, com carga negativa proporcionada pelo SDS, migraram em direção ao eletrodo de carga oposta (positivo) e, dessa forma, distribuídas pela extensão do gel, que funcionou como uma peneira, separando-as em função de sua massa e tamanho molecular. As moléculas menores foram as primeiras a migrar pela malha formada pelo gel e as moléculas com massa molecular mais elevada foram retidas ao longo do processo (HAMES, 1998; JÚNIOR, 2001).

No final do processo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos e, em seguida, tratado com uma solução descorante de ácido acético 10%. O peso molecular de cada banda, comparado aos padrões, foi conferido com o documento de especificação da proteína fornecido pelo fabricante a fim de confirmar a sua identidade e integridade (HAMES, 1998).

4.2.3 Mapia

A técnica de Mapia, descrita em 2000 por Lyashchenko e colaboradores, consiste de impregnação de múltiplos antígenos em membrana de nitrocelulose para a avaliação simultânea de reatividade seguindo protocolo de incubação com anticorpos primários e revelação por anticorpos secundários associados a cromógenos. É uma ferramenta prática e rápida na avaliação da reatividade com o objetivo de selecionar potenciais alvos a serem utilizados em testes rápidos. Quando comparado ao teste de Elisa, o Mapia utiliza um volume de soro cerca de dez vezes menor, 40 vezes menos antígenos e até dez vezes menos conjugado e substrato. As principais etapas para a realização dessa técnica estão ilustradas na Figura 4.2.

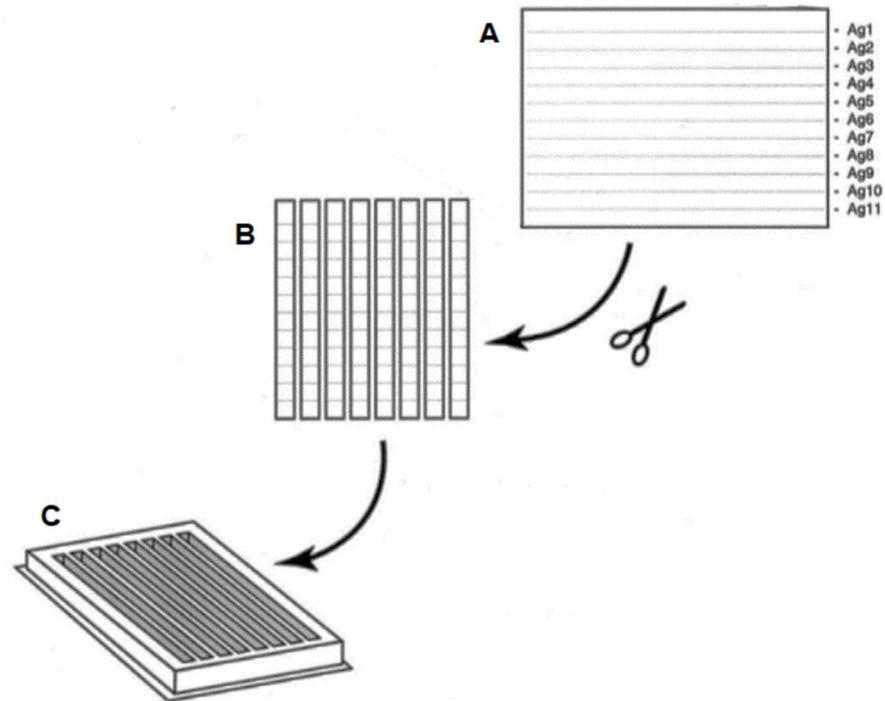


Figura 4.2 – Ilustração das principais etapas de preparação para realização do Mapia. **A:** impregnação das proteínas na membrana de nitrocelulose, **B:** corte do cartão adesivo impregnado e **C:** realização do ensaio. Fonte: Adaptado de LYASHCHENKO et al., 2000.

4.2.3.1 Preparo do cartão adesivo

O cartão adesivo foi cortado no tamanho de 200 mm e, em uma de suas extremidades, foi adicionada a membrana de reação composta de nitrocelulose da marca Advanced Microdevices Pvt. Ltd com porosidade de 10 μ m e 35mm de largura.

4.2.3.2 Impregnação das proteínas na membrana de nitrocelulose

Utilizando o equipamento CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (Figura 4.3), as sete proteínas recombinantes (A, B, C, D, E, F, G), nas concentrações de 40 ng/mm e 80 ng/mm, foram impregnadas individualmente por micro-aerossolização na mesma membrana de nitrocelulose com 3 mm de distância entre as linhas. Como controle interno da reação, foi impregnada uma linha paralela de proteína A de *Staphylococcus aureus* na concentração de 3,5 ng/mm, visto que possui grande afinidade pela porção Fc das imunoglobulinas IgG (FORSGREN; NORDSTRÖM, 1974; HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017; LYASHCHENKO et al., 2000).



Figura 4.3 – CAMAG Automatic TLC Sampler 4.

O cartão impregnado foi colocado para secagem a 37°C por uma hora em estufa Orbit Environ Shaker Lab-line.

4.2.3.3 Corte do cartão adesivo impregnado

Após a secagem, os cartões impregnados com as proteínas foram cortados perpendicularmente em tiras de 4 mm de largura utilizando a guilhotina Matrix™ 2360 Programmable Shear – Kinematic Automation (Figura 4.4) (LYASHCHENKO et al., 2000).



Figura 4.4 – Matrix™ 2360 Programmable Shear – Kinematic Automation.

4.2.3.4 Realização do ensaio

Para a realização do Mapia, as tiras cortadas em 4mm foram distribuídas em canaletas e bloqueadas com solução de Tampão Fosfato Salino – *Phosphate Buffered Saline* (PBS) contendo 5% de lecitina de leite por 30 minutos a 37°C sob agitação. Posteriormente, foram adicionadas amostras reagentes e não reagentes para HCV na diluição 1/100 na mesma solução de bloqueio por 30 minutos a 37°C sob agitação. Após esse período, as tiras foram lavadas três vezes com PBS-Tween por 5 minutos a 37°C sob agitação. Anticorpos anti-IgG humana conjugados à peroxidase de raiz forte – *Horseradish peroxidase* (HRP) diluídos 1/4000 na mesma solução de bloqueio foram incubados por 30 minutos a 37°C sob agitação. Em seguida, as tiras foram lavadas três vezes com PBS-Tween por 5 minutos a 37°C sob agitação. A revelação foi realizada com 2,4-ácido diaminobutírico (DAB) e água oxigenada e interrompida com água Milli-Q (Adaptado de LYASHCHENKO et al., 2000).

4.2.3.5 Análise dos resultados

A reatividade dos soros às proteínas recombinantes de HCV foi observada por leitura visual do aparecimento de coloração na linha correspondente à impregnação de cada antígeno. Os anticorpos, quando presentes na amostra, reagiram com os antígenos impregnados nas tiras de teste e foram detectados devido à marcação dos anticorpos com enzimas, que foram revelados pela reação substrato/cromógeno (LYASHCHENKO et al., 2000).

4.2.4 Teste Rápido (TR)

Após a triagem inicial, as proteínas selecionadas no Mapia foram avaliadas na plataforma de teste rápido de fluxo lateral. Para a padronização do TR, foi criada uma matriz de decisão em que foram testadas combinações de diferentes insumos e condições que são usualmente utilizados no desenvolvimento de um teste rápido, tais como, diferentes concentrações das proteínas recombinantes, fluxo do conjugado e formulações do tampão de corrida.

Usou-se o cartão adesivo da marca G&L precision die cutting, Inc, o qual possui adesivo acrílico sensível à pressão, onde foram fixadas todas as membranas

utilizadas no teste. As proteínas foram impregnadas em três diferentes membranas de nitrocelulose (3 μm , 10 μm e 15 μm) utilizando o equipamento CAMAG Automatic TLC Sampler 4 na área correspondente à linha teste (T) na posição de 36,5 mm, inicialmente, na concentração de 40 ng/mm. Como controle interno da reação, na linha controle (C), foi impregnada uma linha de proteína A de *Staphylococcus aureus* na concentração de 3,5 ng/mm na posição de 41,5 mm (HSIEH; DANTZLER; WEIGL, 2017; WONG; TSE, 2009). Após a impregnação, os cartões adesivos com as membranas de nitrocelulose foram levados para secagem a 37°C por meia hora em estufa Orbit Environ Shaker Lab-line. Após secagem, foram adicionadas ao cartão adesivo a membrana da amostra sem tratamento e membrana do conjugado com proteína A ligada a ouro coloidal no fluxo de 0,40 $\mu\text{l}/\text{mm}$.

A membrana do conjugado usada é composta de fibra de vidro com 12 mm de largura da marca Ahlstrom Corporation. As etapas de produção da solução de ouro coloidal, conjugação à proteína A e estabilização do conjugado foram realizadas a partir de protocolos mantidos em sigilo devido às restrições contratuais. Utilizou-se o sistema de Proteína A (Invitrogen™) conjugada a nanopartículas de ouro coloidal como revelador da reação (HERMANSON, 2008). O conjugado foi impregnado às membranas previamente tratadas por meio do equipamento IsoFlow™ Dispenser da Imogene Technology, inicialmente, no fluxo 0,40 $\mu\text{l}/\text{mm}$. As membranas da amostra (sem tratamento) e residual escolhidas são compostas de fibras de algodão pertencentes à marca Ahlstrom Corporation.

Posteriormente à laminação das membranas, o cartão adesivo foi cortado transversalmente em tiras de 5,0 mm de largura utilizando a guilhotina Matrix™ 2360 Programmable Shear – Kinematic Automation e estas foram colocadas em suporte plástico composto de Acrilonitrila butadieno estireno – *Acrylonitrile butadiene styrene* (ABS), o qual é fechado manualmente ou por meio de um rolo de montagem semi-automatizado, o Roller Conveyor AR3000 da BioDot (MILLIPORE, 2013) (Figura 4.5).



Figura 4.5 – RollerConveyor AR3000, BioDot.

Essas combinações foram avaliadas frente a painéis de amostras caracterizadas como positivas e negativas para HCV para a seleção do melhor conjunto de insumos.

4.2.4.1 Realização do teste

Foram aplicados 10 µl de amostra (soro ou plasma) ao poço S do cassete montado seguidos de 100 µl de tampão de corrida. A migração de todo sistema ocorre por capilaridade e a leitura visual do teste foi realizada após 15 minutos.

Os tampões de corrida com bases fosfato ou tris foram testados com a adição de diferentes insumos que aumentam o bloqueio sobre reações inespecíficas. Foram avaliadas diferentes composições do tampão de corrida, conforme mostrado na Tabela 4.5, mas as formulações originais serão mantidas sob sigilo devido às restrições contratuais exigidas para sua utilização.

Tabela 4.5 – Codificação dos tampões de corrida utilizados no TR.

Codificação	Tampão
TC1a	Base fosfato sem bloqueio
TC1b	Base fosfato bloqueio 1
TC1c	Base fosfato bloqueio 2
TC1d	Base fosfato bloqueio 3
TC2a	Base tris bloqueio 1
TC2b	Base tris bloqueio 2
TC2c	Base tris bloqueio 3
TC2d	Base tris bloqueio 4

4.2.4.2 Análise dos resultados

Para o teste ser considerado válido, a linha C sempre deve aparecer, confirmando a aplicação da amostra e o desempenho do ensaio. O aparecimento de uma linha roxa/rosa na área T indica um resultado reagente, caracterizando a presença de anticorpos para HCV na amostra. Já a inexistência de uma linha na região T determina um resultado não reagente, indicando a ausência desses anticorpos (KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

A intensidade da linha na área T pode variar conforme a concentração de anticorpos específicos. Para fins de desenvolvimento tecnológico, as intensidades de reação nas linhas teste e controle foram classificadas como P3 (reatividade forte),

P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (marcação mais fraca que pode ser considerada positiva), N2 (negativo com sombra de marcação) e N1 (negativo absoluto) (Figura 4.6).

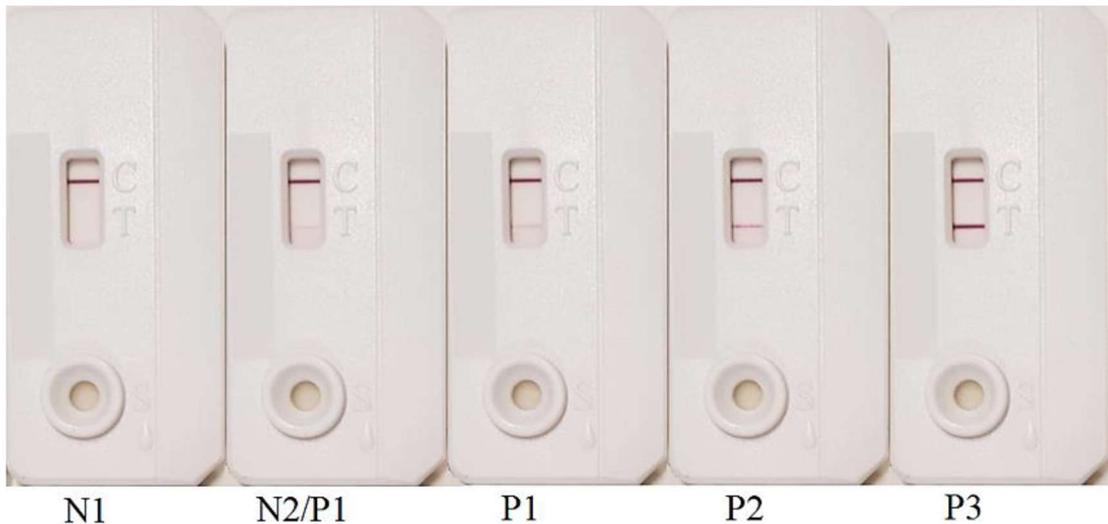


Figura 4.6 – Padrões de leitura e interpretação do teste rápido. Fonte: SIQUEIRA, 2017.

Embora esses padrões de reatividade não sejam de conhecimento necessário para o consumidor final e nem sejam representações fidedignas do título de anticorpos presentes na amostra, eles possibilitam uma melhor comparação entre as diferentes formulações do teste nas avaliações realizadas durante seu desenvolvimento. Sendo assim, para levar uma maior confiança ao usuário, as amostras positivas fracas (N2/P1 e P1) são as que requerem maior atenção, pois podem ser confundidas como resultados negativos (SIQUEIRA, 2017).

4.2.5 Determinação dos valores de sensibilidade, especificidade e índice Kappa

Após a definição dos dois melhores conjuntos, análises complementares foram realizadas com um número amostral maior e os valores de acurácia do teste foram estabelecidos no pré-lote. Tabelas de contingência 2x2 foram compostas, pelas quais podem ser constatados:

- Resultados verdadeiramente positivos (amostras positivas no TR comercial e positivas no TR em desenvolvimento);
- Resultados verdadeiramente negativos (amostras negativas no TR comercial e negativas no TR em desenvolvimento);

- Resultados falso-positivos (amostras negativas no TR comercial e positivas no TR em desenvolvimento);

- Resultados falso-negativos (amostras positivas no TR comercial e negativas no TR em desenvolvimento).

A fim de facilitar a visualização e a análise dos resultados obtidos, foram construídos gráficos utilizando o Programa Graph Pad Prism® (Graph Pad Software) e foram calculados os índices de sensibilidade e especificidade.

A sensibilidade é a probabilidade de um teste ter resultado positivo na presença do agravo. Já a especificidade é a probabilidade de um teste ter resultado negativo na ausência dele. Esses índices podem ser calculados com a aplicação das fórmulas (OLIVEIRA et al., 2010):

$$\text{- Sensibilidade} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

$$\text{- Especificidade} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

Onde:

VP: Verdadeiramente Positivo;

VN: Verdadeiramente Negativo;

FP: Falso Positivo;

FN: Falso Negativo.

Os valores de sensibilidade e especificidade do pré-lote serviram como base para o cálculo amostral do teste final, segundo a seguinte fórmula:

$$n = \frac{p \cdot q \cdot Z_{\alpha/2}^2}{\varepsilon^2}$$

Onde:

p= sensibilidade do teste;

q= 1-sensibilidade;

$Z_{\alpha/2}$ = nível de confiança (95%);

ε = erro (2,8%).

Ambos os conjuntos foram novamente avaliados no lote final com amostras clínicas positivas e negativas para hepatite C em um número amostral maior a fim de concluir se as proteínas recombinantes em questão eram candidatas adequadas para uso em um kit de imunocromatografia de fluxo lateral para o diagnóstico da hepatite C. Os índices de sensibilidade e especificidade do lote final foram calculados utilizando as mesmas fórmulas e os resultados também foram expressos em gráficos assim como para o pré-lote. Foi selecionado o melhor conjunto que apresentou índices de sensibilidade e especificidade superiores.

O conjunto selecionado foi, então, avaliado com soros reativos para outras doenças a fim de verificar possíveis reações cruzadas com outros marcadores sorológicos. A escolha desses marcadores foi fundamentada na prevalência mundial das infecções e/ou em estudos realizados anteriormente. As amostras foram analisadas quanto à reatividade cruzada com anticorpos de: HIV, outras hepatites (HBV), sífilis, doença de chagas, HTLV-I e II, Zika, dengue (MIKAWA, 2006; PEREIRA, 2011; SCALIONI et al., 2014; SOUZA, 2011).

Por fim, o grau de concordância entre os resultados foi analisado pelo Índice Kappa, avaliando a confiabilidade e a precisão do TR. A estatística Kappa (K) foi calculada para avaliar o grau de concordância entre o teste desenvolvido no Lated e o teste comercial WAMA Imuno-Rápido HCV considerado como referência por obter resultados satisfatórios na detecção de anticorpos para HCV (SCALIONI et al., 2014). Foi utilizado o pacote “vcd” no *software* R (MEYER; ZEILEIS; HORNIK, 2017) e os resultados foram classificados conforme Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Índice Kappa de concordância. Adaptado de LANDIS; KOCH, 1977.

Índice Kappa	Nível de concordância
<0,00	Pobre
0,00 – 0,20	Fraco
0,21 – 0,40	Razoável
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeito

4.2.6 Amostras spike

Devido à facilidade de obtenção e armazenamento, foram utilizadas amostras de soro ou plasma durante as avaliações. Entretanto, é importante que um teste

rápido seja realizado também com amostras de sangue total, haja vista este ser um ensaio que permite ir à campo sem depender de equipamentos para centrifugação da amostra, podendo ser realizada apenas uma punção digital.

Considerando a dificuldade do desenvolvimento tecnológico em conseguir amostras de sangue total e com o propósito de avaliar a capacidade da membrana da amostra em reter os elementos figurados do sangue e também o desempenho do teste frente a esse tipo de amostra, foi realizada uma simulação de sangue total, denominada *spike* que é obtida a partir de sangue total de indivíduo sadio (própria aluna) coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA.

Após a sedimentação da série vermelha do sangue coletado do indivíduo sadio, foram homogeneizados volumes equivalentes do concentrado de hemácia (20µl) e do soro de interesse (20µl), o qual pode ser reagente ou não reagente para HCV, formando, assim, a amostra *spike*. Ressalta-se que o soro de interesse já havia sido testado previamente no lote final da proteína recombinante E e foram selecionadas, de forma aleatória, amostras com todas as intensidades (N1, N2, N2/P1, P1, P2, P3) para comporem o painel *spike*.

A amostra *spike* foi, *então*, utilizada no TR HCV (E) a fim de verificar a reprodutibilidade do teste com amostras de sangue total (SIQUEIRA, 2017).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras positivas para HCV (AEQ e clínicas) foram testadas para HIV com o objetivo de verificar o desempenho do kit frente a indivíduos coinfectedados com HCV e HIV. Das 236 amostras testadas para HIV, 14 foram positivas conforme pode ser verificado no Anexo 9.1.

Todas as amostras clínicas negativas para HCV foram analisadas para dengue (IgM e IgG) uma vez que esses testes não são realizados pelo Hemorio. Os resultados foram sintetizados na Tabela 5.1 e a descrição completa destes pode ser encontrada no Anexo 9.2.

Tabela 5.1 – Quantitativo de amostras negativas para HCV e positivas (ou na faixa cinza) para dengue (IgM/IgG).

Amostras HCV negativas	Amostras Dengue positivas (ou faixa cinza)	Dengue IgM	Dengue IgG
265	84 31,70%	10 3,77%	77 29,06%

As 84 amostras reativas para dengue em qualquer marcador e em faixa cinza foram excluídas do estudo a fim de evitar que fossem obtidos resultados falsos no TR HCV.

5.2 ELETROFORESE

O perfil eletroforético das proteínas A, B, C, D, E, F, G foi analisado em gel gradiente NuPage Bis-Tris 4-12%. Foi utilizado um padrão de peso molecular conhecido Bio-Rad Padrão prestained SDS – Page e um controle interno de BSA que foram comparados ao peso molecular de cada banda de proteína recombinante visualizada ao final da eletroforese. Observou-se que todas as proteínas estavam

íntegras, apresentando seu peso molecular de acordo com as especificações dos fornecedores (Figura 5.1).

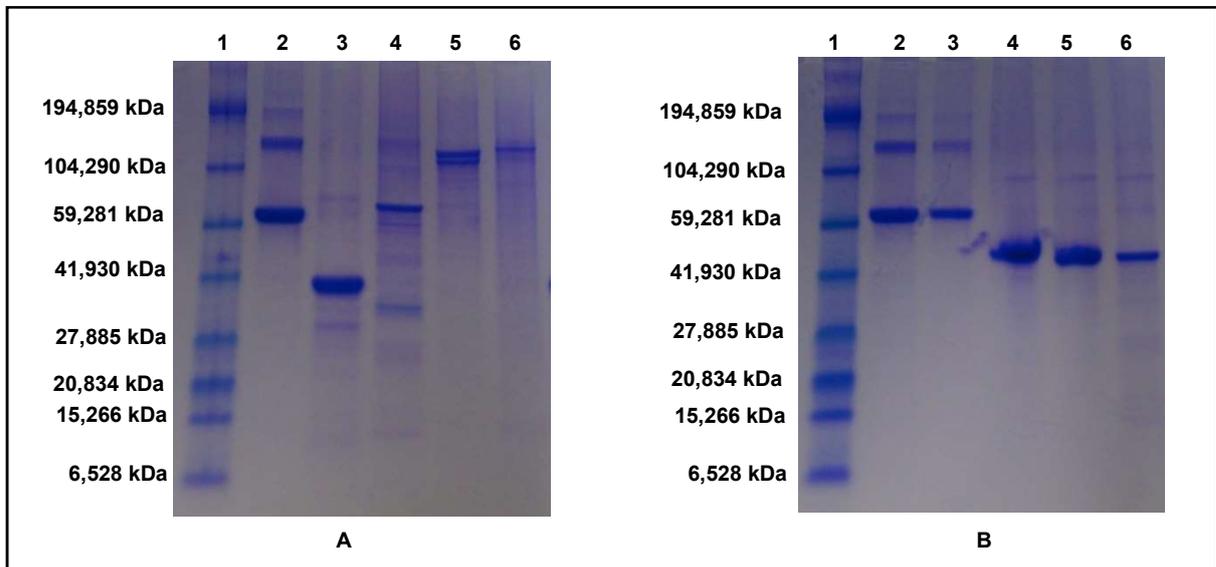


Figura 5.1 – Perfil eletroforético das proteínas em gel Bis-Tris 4-12%. **A:** na ordem, (1) peso molecular Bio-Rad, (2) BSA 1,0 mg/mL, (3) proteínas recombinantes A (1,0 mg/mL), (4) E (1,0 mg/mL), (5) F (1,0 mg/mL), (6) G (1,0 mg/mL). **B:** na ordem, (1) peso molecular Bio-Rad, (2) BSA 1,0 mg/mL, (3) BSA 0,5 mg/mL, proteínas recombinantes (4) B (1,1 mg/mL), (5) C (0,5 mg/mL), (6) D (0,25 mg/mL).

5.3 MAPIA

O ensaio foi executado em duplicata com soros do AEQ (uma amostra positiva forte e uma amostra positiva fraca) diluídas em 1/100 a fim de analisar o perfil de reatividade das proteínas recombinantes em questão.

Os resultados obtidos referentes à identificação e intensidade das bandas correspondentes nas duas diferentes concentrações de antígeno foram semelhantes, sendo assim, foi escolhida a menor concentração com vistas a diminuição de custos. Em ambos, as proteínas recombinantes F e G não apresentaram a reatividade esperada e foram eliminadas nessa triagem. Ressalta-se que as proteínas B e C apresentaram um “arraste” na linha teste (Figura 5.2). Portanto, baseados no padrão de reatividade apresentado nesse ensaio, foram selecionadas as proteínas restantes (A, B, C, D e E) para a avaliação na plataforma de teste rápido de fluxo lateral.

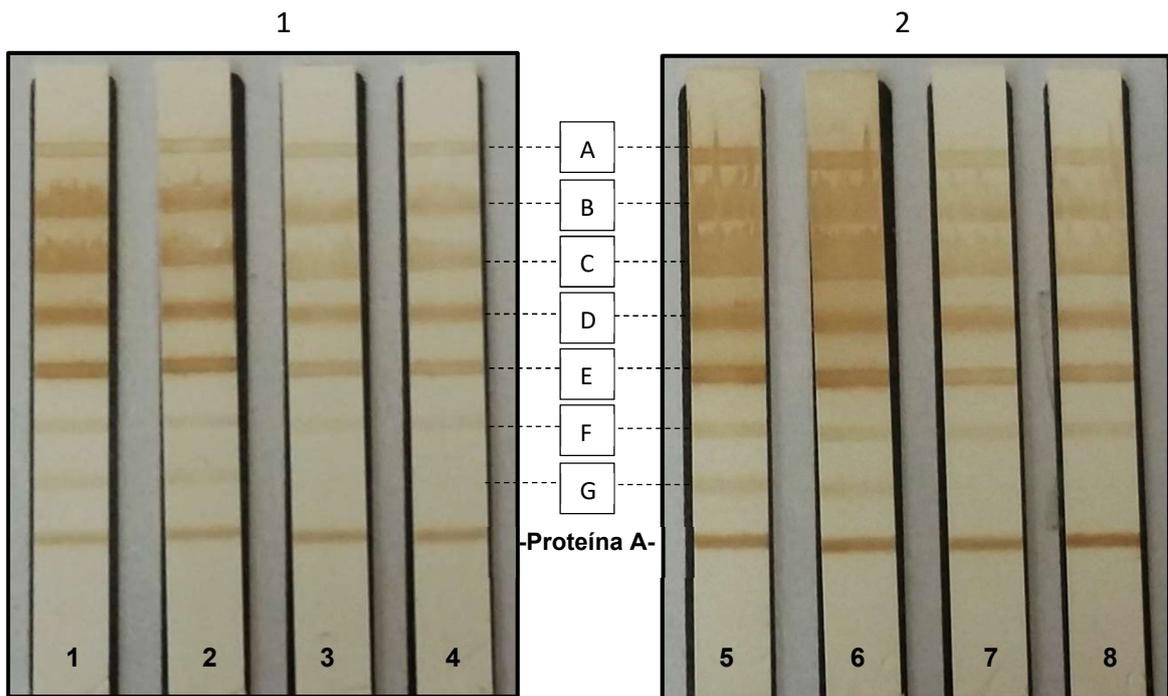


Figura 5.2- Resultado do teste de Mapia: na ordem, proteínas recombinantes A, B, C, D, E, F, G, H e controle interno de Proteína A na concentração de 3,5 ng/mm. Tiras 1, 2, 5 e 6 amostras positivas fortes. Tiras 3, 4, 7 e 8 amostras positivas fracas. **1:** Concentração das proteínas recombinantes em 40 ng/mm. **2:** Concentração das proteínas recombinantes em 80 ng/mm.

5.4 TESTE RÁPIDO (TR)

As cinco proteínas selecionadas no Mapia foram avaliadas na plataforma de teste rápido de fluxo lateral, cada uma com três tipos diferentes de membrana de nitrocelulose (3 μm , 10 μm e 15 μm), totalizando 15 situações distintas (Tabela 5.2).

Nessa primeira matriz de decisão (TR 01), todos os antígenos foram impregnados a uma concentração de 40 ng/mm, o fluxo do conjugado de ouro com proteína A definido em 0,40 $\mu\text{l}/\text{mm}$ e escolhido o tampão de corrida com base fosfato sem bloqueio (TC1a) no volume de 100 μl . Devido ao grande número de combinações a serem testadas, inicialmente, usou-se um número amostral pequeno com amostras caracterizadas do AEQ de diferentes intensidades (positiva forte, positivas fracas e negativas para HCV).

Tabela 5.2 – Matriz de decisão na triagem inicial do TR HCV (TR 01).

Proteínas Recombinantes	Cruzamento	Membrana (μm)	Concentração antígeno (ng/mm)	Fluxo do conjugado ($\mu\text{l}/\text{mm}$)	Tampão de corrida
A	A1	3	40	0,40	Base fosfato sem bloqueio (TC1a)
	A2	10			
	A3	15			
B	B1	3	40	0,40	Base fosfato sem bloqueio (TC1a)
	B2	10			
	B3	15			
C	C1	3	40	0,40	Base fosfato sem bloqueio (TC1a)
	C2	10			
	C3	15			
D	D1	3	40	0,40	Base fosfato sem bloqueio (TC1a)
	D2	10			
	D3	15			
E	E1	3	40	0,40	Base fosfato sem bloqueio (TC1a)
	E2	10			
	E3	15			

5.4.1 Proteína recombinante A

Em todos os cenários testados, foram constatadas ligações inespecíficas para algumas amostras negativas, caracterizando um resultado falso positivo (vermelho) conforme mostrado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Resultados do TR 01 para a proteína recombinante A.

Amostras	TR 01		
	A1	A2	A3
2b6-	-	N2	N2
5b3-	-	N2/P1	P1
9b4-	N2/P1	N1	N1
11b3-	N2/P1	-	-
4b5+	-	N2/P1	P1
10b3+	-	P1	P1
8b6+	P1	P1	P1
35b5++	P3	P3	P2

A1 (membrana 3 μm), A2 (membrana 10 μm) e A3 (membrana 15 μm).

Amostras: - (negativa), + (positiva fraca) e ++ (positiva forte).

Vermelho: falso-positivo.

- não avaliado.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Entretanto, observou-se que os resultados obtidos na situação A2 (membrana de 10µm) foram ligeiramente superiores, uma vez que, a condição A1 obteve um número maior de resultados falso-positivos e a A3 apresentou uma reatividade mais forte para a amostra negativa. Dessa forma, foi dado prosseguimento ao TR 02 com a membrana de 10µm utilizando somente amostras positivas fracas e negativas que foram analisadas com tampão de corrida com base fosfato bloqueio 1 (TC1b) com intuito de diminuir a reação inespecífica da amostra negativa e observar se há perda do sinal das amostras pouco reativas com conseqüente negatização do diagnóstico. Constatou-se que houve um bloqueio satisfatório de ligações inespecíficas nas amostras negativas nessas condições, porém, obtiveram-se dois resultados falso-negativos (azul) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Resultados do TR 02 para a proteína recombinante A.

Amostras -	TR 02	Amostras +	TR 02
2b6-	N1	4b5+	N2
5b3-	N1	10b3+	P1
9b4-	N1	8b6+	P1
12e6-	N1	35b5+	P3
10b4-	N1	8b5+	P1
11b3-	N1	16b2+	N2
		12e1+	N2/P1
		11b6+	P1

Amostras: - (negativa) e + (positiva).

Azul: falso-negativo.

P3 (fortemente reativa), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Na análise seguinte (TR 03), aumentou-se o fluxo do conjugado para 0,50µl/mm a fim de verificar se o sinal dessas amostras positivas que apresentaram resultados falso-negativos seria intensificado. Conforme apresentado na Tabela 5.5, o sinal dessas amostras positivas foi intensificado com o aumento do fluxo do conjugado sem alterar o perfil sorológico das amostras negativas.

Tabela 5.5 – Resultados do TR 03 para a proteína recombinante A.

Amostras -	TR 03	Amostras +	TR 03
2b6-	N2	4b5+	N2/P1
5b3-	N1	10b3+	P1
9b4-	N1	8b6+	P1
12e6-	N1	35b5+	P3
9b5-	N1	40b1+	P1
10b4-	N2	8b5+	P1

Continua

Continuação

Amostras -	TR 03	Amostras +	TR 03
18b5-	N1	42b2+	P1
11b3-	N2	35b1+	P1
17b3-	N2	16b2+	N2/P1
19b1-	N2	12e1+	P1
16b1-	N1	11b6+	P2
14b2-	N1		

Amostras: - (negativa) e + (positiva).
P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

A próxima testagem (TR 04) foi avaliada com um número amostral superior (total de 67 soros), sendo 50 amostras clínicas negativas do Hemorio e 17 novas amostras positivas AEQ para acessar maior variabilidade de perfis sorológicos. Os resultados foram compilados na Tabela 5.6, mostrando que foram obtidos quatro resultados falso-positivos.

Tabela 5.6 – Resultados do TR 04 para a proteína recombinante A.

Amostras -	TR 04	Amostras -	TR 04	Amostras +	TR 04
1-	N1	26-	N1	39b1+	P1
2-	N1	27-	P1	39b5+	P1
3-	N1	28-	N1	40b2+	P3
4-	N1	29-	N1	40b6+	P3
5-	N2	30-	N2	41b3+	P3
6-	N1	31-	N1	42b5+	P3
7-	N2	32-	N1	43b1+	P2
8-	N1	33-	N2	43b6+	P2
9-	N1	34-	N1	44b3+	P2
10-	N1	35-	N2	44b6+	P2
11-	N1	36-	N2	45b2+	P2
12-	N1	37-	N1	45b4+	P3
13-	N2	38-	N2	45b5+	P3
14-	N2	39-	N1	46b3+	P3
15-	N2	40-	N1	47b1+	P2
16-	N2	41-	N2	47b5+	P3
17-	N1	42-	N2	47b6+	P2
18-	N1	43-	N2		
19-	N2	44-	N2		
20-	N1	45-	N1		
21-	N1	46-	N2/P1		
22-	N2/P1	47-	N1		
23-	N2	48-	N2		
24-	N2	49-	N1		
25-	N1	50-	N2/P1		

Amostras: - (clínica negativa) e + (positiva). Vermelho: falso-positivo.
P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

O tampão de corrida usado no TR 04 (base fosfato bloqueio 1 – TC1b) possui soro de galinha em sua formulação. Considerando os resultados falso-positivos obtidos com o aumento do número amostral e o não controle imunológico de cada lote de soro de galinha, decidimos trocar a base da formulação retirando o soro de galinha, pois este poderia gerar inconsistências futuras no desempenho do teste. Realizamos o TR 05 (Tabela 5.7) utilizando o tampão de corrida com base tris bloqueio 4 (TC2d), mas, por possuir um bloqueio mais forte que o tampão anterior, todas as amostras positivas negativaram.

Tabela 5.7 – Resultados do TR 05 para a proteína recombinante A.

Amostras	TR 05
60-	N1
94-	N1
97-	N1
99-	N1
142-	N1
10b3+	N1
8b6+	N1
40b1+	N1
35b1+	N1
16b2+	N1
12e1+	N1

Amostras: - (negativa)
e + (positiva).
Azul: falso-negativo.
N1 (negativo absoluto).

Uma nova impregnação da proteína recombinante A foi realizada elevando-se a concentração para 60ng/mm com intuito de aumentar a massa de proteína disponível na membrana de nitrocelulose para contrabalancear o bloqueio do tampão. Neste teste, foi mantido o fluxo do conjugado em 0,50 µl/mm (TR 06). No entanto, esta abordagem também não foi suficiente para amplificar a resposta dessas amostras para atingir o limite de detecção do teste conforme mostrado na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Resultados do TR 06 para a proteína recombinante A.

Amostras -	TR 06	Amostras +	TR 06
60-	N1	35b1+	N2
94-	N1	12e1+	N1
97-	N1		
142-	N1		

Amostras: - (negativa) e + (positiva).
Azul: falso-negativo.
N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Mediante aos últimos resultados encontrados, decidiu-se diminuir o bloqueio do tampão de corrida (base tris bloqueio 1 – TC2a) em uma nova testagem (TR 07) e os achados foram transcritos na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Resultados do TR 07 para a proteína recombinante A.

Amostras	TR 07
60-	N1
94-	P1
97-	N2/P1
99-	N1
142-	N2
10b3+	P2
8b6+	P2
40b1+	N2/P1
35b1+	P1
16b2+	N2
12e1+	P1

Amostras: - (negativa) e + (positiva).
Vermelho: falso-positivo.
Azul: falso-negativo.
P2 (reatividade média),
P1 (reatividade fraca),
N2/P1 (ponto de corte),
N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

O perfil das amostras positivas melhorou e obteve-se apenas um resultado falso-negativo. Entretanto, constata-se que a diminuição do bloqueio foi muito grande, evidenciando ligações inespecíficas nas amostras negativas, ou seja, resultados falso-positivos. Por isso, a análise seguinte (TR 08) foi realizada com um tampão de corrida com bloqueio intermediário (base tris com bloqueio 3 – TC2c)

utilizando um conjugado com fluxo menor (0,40 $\mu\text{l}/\text{mm}$). Os resultados são apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 – Resultados do TR 08 para a proteína recombinante A.

Amostras	TR 08
60-	N1
94-	N1
97-	N1
99-	N2
142-	N1
10b3+	N2/P1
8b6+	N2/P1
40b1+	N2/P1
35b1+	N2/P1
16b2+	N2
12e1+	N2/P1

Amostras: - (negativa) e + (positiva).

Azul: falso-negativo.

N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

A combinação da utilização de um tampão de corrida com bloqueio intermediário – TC2c com a diminuição do fluxo do conjugado para 0,40 $\mu\text{l}/\text{mm}$ eliminou as ligações inespecíficas e, assim, os resultados falso-positivos. Já o perfil de resposta do teste para as amostras positivas, que são fracas, não foi alterado quando comparado à análise anterior, atingindo, portanto, o limite de detecção para a padronização desta proteína. Com as condições finais estabelecidas foi produzido um pré-lote com a finalidade de avaliar um número amostral maior com variedade de perfis sorológicos. As variáveis da produção do teste (TR 09) estão informadas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Variáveis do pré-lote da proteína recombinante A.

Insumo	Tipo
Membrana de nitrocelulose	10 μm
Antígeno recombinante	60 ng/mm
Conjugado de ouro com proteína A	0,40 $\mu\text{l}/\text{mm}$
Tampão de corrida TC2c	Base tris bloqueio 3

Um total de 116 amostras foi analisado no pré-lote, sendo 60 amostras positivas para HCV provenientes do AEQ e 56 amostras clínicas negativas para HCV procedentes do Hemorio. O teste obteve índices de 91,67% de sensibilidade (cinco amostras falso-negativas) e 100% de especificidade. Os resultados foram plotados em gráfico (Figura 5.3) e os dados planilhados no Anexo 9.3.

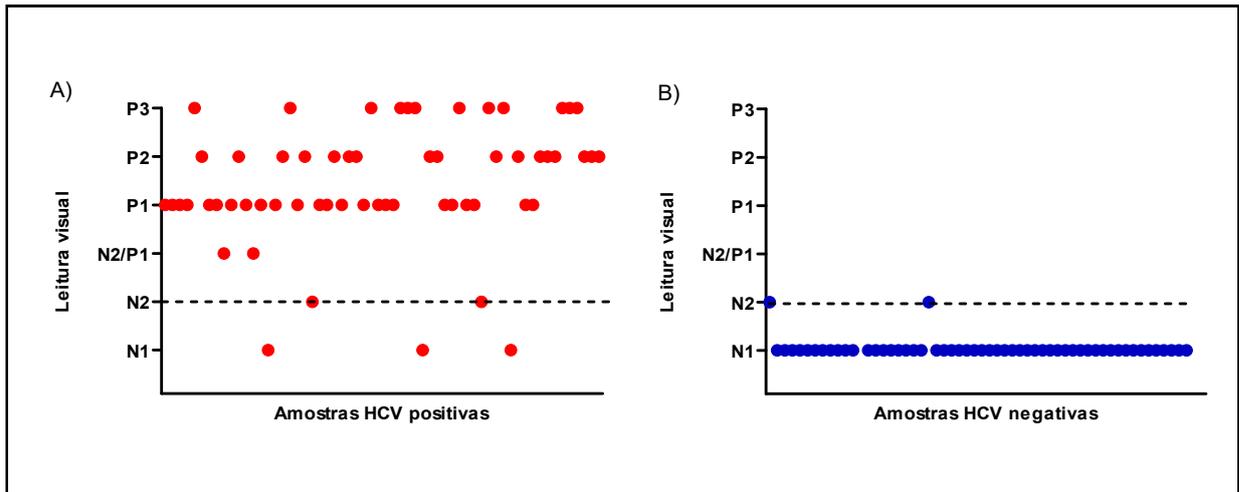


Figura 5.3 - Resultados do pré-lote para a proteína recombinante A. Onde: P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto). **A:** total de 60 amostras AEQ positivas para HCV: cinco resultados falso-negativos. **B:** total de 60 amostras clínicas negativas para HCV: sem resultados falso-positivos.

Devido à baixa sensibilidade obtida pela proteína recombinante A (91,67%), o número amostral necessário para a avaliação no lote final, obtido pela aplicação da fórmula descrita em metodologia, seção 4.2.5, mostrou-se inviável ($n=360$), pois, amostras caracterizadas são de difícil obtenção. Portanto, foi decidido finalizar a avaliação com esta proteína com o quantitativo final obtido para este estudo.

O teste final (TR 10) foi realizado analisando um total de 233 amostras clínicas, dentre as quais 168 eram positivas para HCV provenientes do IOC e do INI e 65 negativas para HCV procedentes do Hemorio. Esse lote final teve como índices: 93,45% de sensibilidade (11 resultados falso-negativos) e 100% de especificidade. Os resultados foram expressos em gráfico (Figura 5.4) e os dados inseridos em planilha (Anexo 9.4).

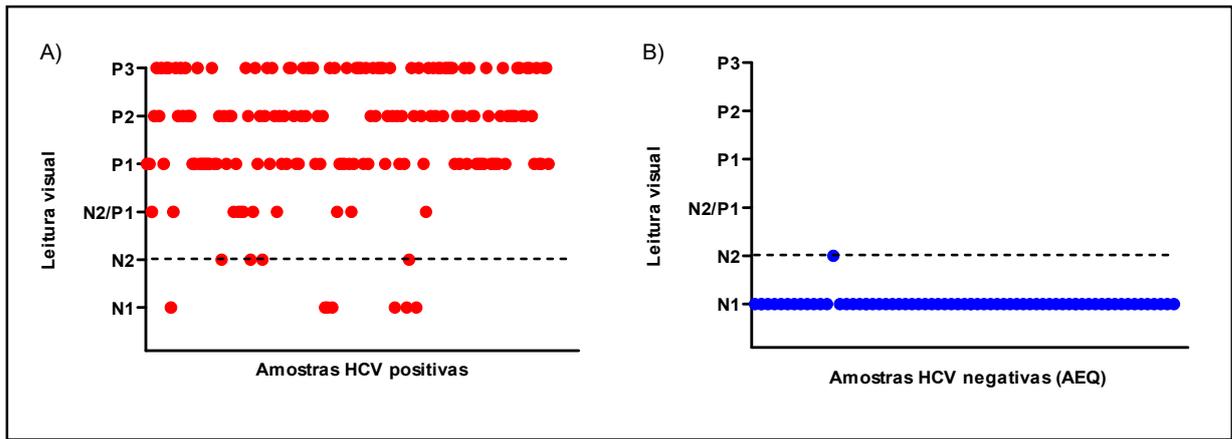


Figura 5.4 - Resultados do lote final para a proteína recombinante A. Onde: P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto). **A**: total de 168 amostras clínicas positivas para HCV: onze resultados falso-negativos. **B**: total de 65 amostras clínicas negativas para HCV: sem resultados falso-positivos.

5.4.2 Proteína recombinante B

Dos três cenários testados no TR 01 para a proteína recombinante B, foi possível verificar marcações de ligações inespecíficas nas análises da amostra negativa que foram eliminadas com o uso de um tampão de corrida com base fosfato de baixo bloqueio (TC1b) no TR02. Novamente, somente foram testadas as amostras positiva fraca e negativa. Constatou-se que, com o uso deste tampão, houve bloqueio satisfatório das ligações inespecíficas nas situações B1 e B2 sem que houvesse alteração do perfil de reatividade da amostra positiva fraca (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 – Resultados dos TR 01 e TR 02 para a proteína recombinante B.

Amostras	TR 01			TR 02		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3
9b4 -	N2/P1	N2	N2	N1	N1	N2
8b6 +	P1	P1	P1	P1	P1	P1
35b5 ++	P3	P3	P3	-	-	-

B1 (membrana 3 μ m), B2 (membrana 10 μ m) e B3 (membrana 15 μ m). Amostras: - (negativa), + (positiva fraca) e ++ (positiva forte). Vermelho: falso-positivo.

- não avaliado.

P3 (fortemente reativa), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Para não comprometer a reatividade das amostras positivas fracas, manteve-se a configuração B1 e B2 para serem avaliadas no TR03 com maior número amostral (20 soros).

5.4.2.1 Cenário B1

Para a situação B1 (membrana de 3µm), foram obtidos três resultados falso-positivos no TR 03, portanto foi necessário aumentar o nível de bloqueio do tampão de corrida base fosfato bloqueio 2 (TC1c) para eliminar os resultados falso-positivos. Esse tampão também foi utilizado para testar três amostras positivas fracas a fim de verificar se haveria interferência na ligação com consequente diminuição da reatividade destas. Os resultados foram satisfatórios ao bloquear as ligações inespecíficas nas amostras negativas e ao manter inalterados os resultados para as amostras positivas (TR04).

Uma nova impregnação (TR 05) foi realizada para testar essas condições com 20 soros e foram obtidos seis resultados falso-positivos. Nos mesmos moldes, realizou-se uma nova análise (TR 06) aplicando um tampão de corrida base fosfato bloqueio 3 (TC1d). Foram testadas as dez amostras negativas e uma amostra positiva fraca, novamente, para verificar se o bloqueio do tampão de corrida alteraria seu resultado. Ainda assim, ocorreram quatro resultados falso-positivos. A Tabela 5.13 sintetiza os resultados encontrados nos TR 03, 04, 05 e 06.

Tabela 5.13 – Resultados dos TR 03, TR 04, TR 05 e TR 06 para o cenário B1 da proteína recombinante B.

Amostras	TR 03	TR 04	TR 05	TR 06
2b3 -	N1	-	N1	N2/P1
3b6 -	P1	N1	N2	N1
4b3 -	P1	N1	N2	N1
4b4 -	N1	-	N1	N1
9b5 -	N2	-	P1	N2/P1
10b4 -	N2/P1	-	P1	N2/P1
12e6 -	N2	-	N2/P1	N2
15b5 -	N1	-	N2/P1	N1
34b1 -	N1	-	P1	P1
35b2 -	N1	-	N2/P1	N2
5b2 +	P2	-	P3	-
6b5 +	P3	-	P3	-
7b4 +	P1	P1	P1	-
10b3 +	P2	-	P2	-
11b6 +	P2	-	P2	-
12e1 +	P1	P1	P1	-
13b4 +	P2	-	P1	-

Continua

Continuação

Amostras	TR 03	TR 04	TR 05	TR 06
14b5 +	P3	-	P2	-
16b2 +	P1	P1	P1	P1
19b4 +	P3	-	P3	-

20 amostras: 10 amostras não reativas para HCV e 10 amostras reativas para HCV.

Vermelho: falso-positivo.

- não avaliado.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

5.4.2.2 Cenário B2

Para a situação B2 (membrana de 10 µm), foram obtidos um resultado falso-negativo e dois resultados falso-positivos no TR 03. Utilizando-se das mesmas impregnações, a próxima análise (TR 04) foi realizada aplicando um tampão de corrida base fosfato bloqueio 2 (TC1c) para as duas amostras negativas que apresentaram resultados falso-positivos e para três amostras positivas fracas. Esse tampão obteve desempenho satisfatório sobre as amostras negativas, diminuindo as ligações inespecíficas, entretanto, também alterou o perfil de resposta de uma amostra positiva que, de um resultado P1, passou a apresentar N2.

Uma nova impregnação foi feita com a concentração de 60ng/mm a fim de aumentar a concentração do antígeno na membrana de nitrocelulose (TR 05) e, para a reação, utilizou-se um tampão de corrida base fosfato bloqueio 3 (TC1d). Esse cenário, apesar de eliminar os resultados falso-negativos encontrados anteriormente, apresentou três resultados falso-positivos. A Tabela 5.14 sintetiza os resultados encontrados nos TR 03, 04 e 05.

Tabela 5.14 – Resultados dos TR 03, TR 04 e TR 05 para o cenário B2 da proteína recombinante B.

Amostras	TR 03	TR 04	TR 05
2b3 -	N1	-	N1
3b6 -	N1	-	N1
4b3 -	N1	-	N2/P1
4b4 -	N1	-	N2/P1
9b5 -	N1	-	N2
10b4 -	N1	-	N2
12e6 -	N2	-	N1
15b5 -	N2/P1	N1	N2/P1
34b1 -	N1	-	N1
35b2 -	N2/P1	N2	N1

Continua

Continuação

Amostras	TR 03	TR 04	TR 05
5b2 +	P3	-	P2
6b5 +	P3	-	P2
7b4 +	P1	N2	P1
10b3 +	P2	-	P2
11b6 +	P2	-	P2
12e1 +	P1	P1	P1
13b4 +	P1	P1	P2
14b5 +	P3	-	P3
16b2 +	N1	-	P1
19b4 +	P3	-	P3

20 amostras: 10 amostras não reativas para HCV e 10 amostras reativas para HCV.

Vermelho: falso-positivo.

Azul: falso-negativo. - não avaliado.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Nas análises com a proteína recombinante B em ambos cenários (B1 e B2), observou-se que a linha teste ficava grossa, dispersa e sem nitidez como exemplificado na Figura 5.5. Ademais, mediante aos resultados inconsistentes obtidos nessas análises, concluiu-se que a proteína recombinante B apresenta inespecificidade mesmo ao se utilizar um tampão de corrida com alto bloqueio (4) e, por essa razão, foi decidido excluí-la das próximas análises.

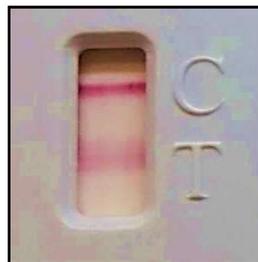


Figura 5.5 – Exemplo do perfil de resposta da proteína recombinante B: linha teste grossa, dispersa e sem nitidez.

5.4.3 Proteína recombinante C

Das três situações testadas no TR 01 para a proteína recombinante C, as três membranas de nitrocelulose apresentaram resultados falso-positivos. Por isso, foi realizado um segundo teste (TR 02) apenas com a amostra positiva fraca e a negativa utilizando um tampão de corrida base fosfato bloqueio 1 (TC1b), o qual não foi suficiente para eliminar as reações inespecíficas do teste.

Uma terceira análise (TR 03) foi realizada usando um tampão de corrida base fosfato bloqueio 2 (TC1c) com as mesmas amostras utilizadas no TR 02. Nos três cenários (C1, C2 e C3), foi verificada a eliminação do resultado falso-positivo para a amostra negativa e, para continuação dos testes com aumento do número amostral, foi escolhida a situação C2 por ter apresentado um resultado negativo absoluto (N1), enquanto as situações C1 e C3 mostraram resultado negativo com sombra (N2) para a mesma amostra. A Tabela 5.15 apresenta os resultados obtidos com os TR 01, 02 e 03 para a proteína recombinante C.

Tabela 5.15 – Resultados dos TR 01, TR 02 e TR 03 para a proteína recombinante C.

Amostras	TR 01			TR 02			TR 03		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
9b4 -	P1	P1	P1	P1	P1	N2/P1	N2	N1	N2
8b6 +	P2	P1	P1	P2	P1	P1	P1	P1	N2/P1
35b5 ++	P3	P3	P3	-	-	-	-	-	-

C1 (membrana 3µm), C2 (membrana 10µm) e C3 (membrana 15µm).

Amostras: - (negativa), + (positiva fraca) e ++ (positiva forte).

Vermelho: falso-positivo. - não avaliado.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

O TR 04 foi, então, realizado analisando um total de 20 amostras na condição C2 utilizando tampão base fosfato bloqueio 2 (TC1c) e dois resultados falso-negativos foram obtidos. Para o TR 05, o antígeno foi impregnado em uma concentração maior (60ng/mm), mantendo as escolhas de conjugado (0,40µl/mm), volume da amostra (5µl) e tampão de corrida base fosfato bloqueio 2 (TC1c) no volume de 100µl. As respostas não foram satisfatórias, uma vez que foram obtidos quatro resultados falso-positivos (Tabela 5.16).

Tabela 5.16 – Resultados dos TR 04 e TR 05 para a proteína recombinante C.

Amostras	TR 04	TR 05
2b3 -	N1	N2
3b6 -	N1	P1
4b3 -	N1	N1
4b4 -	N1	N2
9b5 -	N1	N2
10b4 -	N1	N2/P1
12e6 -	N1	N2/P1
15b5 -	N1	N1
34b1 -	N1	N2/P1
35b2 -	N1	N2

Continua

Continuação

Amostras	TR 04	TR 05
5b2 +	P2	P2
6b5 +	P3	P3
7b4 +	N1	P1
10b3 +	P2	P2
11b6 +	P3	P2
12e1 +	P1	P1
13b4 +	P1	P1
14b5 +	P3	P3
16b2 +	N1	N2/P1
19b4 +	P3	P3

20 amostras: 10 amostras não reativas para HCV e 10 amostras reativas para HCV.

Vermelho: falso-positivo.

Azul: falso-negativo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Durante as cinco análises realizadas com a proteína recombinante C, observou-se que a linha teste ficava grossa, dispersa e sem nitidez (Figura 5.6-1), além de uma mancha rósea entre as linhas teste e controle (Figura 5.6-2), dificultando a leitura visual do teste. Mediante aos resultados obtidos nessas análises, constatou-se que a proteína recombinante C tal como a proteína B apresenta inespecificidade e inconsistências que dificultam a sua padronização. Pelos motivos listados, decidiu-se excluir essa proteína recombinante das próximas análises.

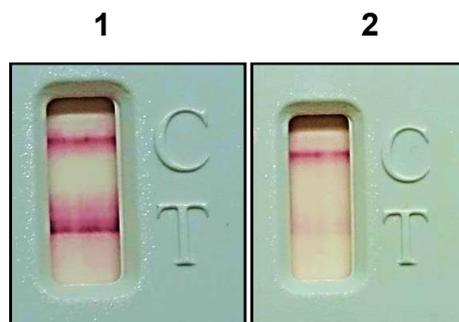


Figura 5.6 – Exemplos do perfil de resposta da proteína recombinante C.
1: Linha teste grossa, dispersa e sem nitidez. **2:** Mancha rósea entre as linhas T e C.

5.4.4 Proteína recombinante D

Dos três cenários analisados no TR 01 para a proteína recombinante D utilizando um tampão de corrida base fosfato sem bloqueio (TC1a), apenas uma amostra negativa da situação D2 não apresentou um resultado falso-positivo (Tabela 5.17).

Tabela 5.17 – Resultados do TR 01 para a proteína recombinante D.

Amostras	TR 01		
	D1	D2	D3
2b6-	P2	N2/P1	P1
5b3-	P2	P1	P1
9b4-	P2	N2	N2/P1
4b5+	P2	P1	P2
10b3+	P3	P2	P2
8b6+	P2	P1	P1
35b5++	P3	P3	P3

D1 (membrana 3 μ m), D2 (membrana 10 μ m) e D3 (membrana 15 μ m).

Amostras: - (negativa), + (positiva fraca) e ++ (positiva forte).

Vermelho: falso-positivo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra).

O TR 02 foi realizado utilizando um tampão base fosfato bloqueio 1 (TC1b) e apenas as amostras negativas foram analisadas. Os resultados se mantiveram e apenas uma amostra negativa da situação D2 não apresentou uma resposta falso-positiva conforme evidenciado na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 – Resultados do TR 02 para a proteína recombinante D.

Amostras	TR 02		
	D1	D2	D3
2b6-	P2	N2/P1	P1
5b3-	P2	N2/P1	P1
9b4-	P2	N1	N2/P1

D1 (membrana 3 μ m), D2 (membrana 10 μ m) e D3 (membrana 15 μ m).

Amostras: - (negativa).

Vermelho: falso-positivo.

P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N1 (negativo absoluto).

Decidiu-se prosseguir as análises apenas com o modelo D2 (membrana de nitrocelulose de 10µm), uma vez que os resultados foram sutilmente superiores: apenas nessa situação uma amostra não obteve resultado falso-positivo.

Em um novo teste (TR 03), foi utilizado um conjugado com fluxo menor (0,35µl/mm) com intuito de verificar se as ligações inespecíficas das amostras negativas eram eliminadas. Também foram testadas duas amostras positivas fracas, pois com a diminuição do conjugado, a intensidade de resposta destas poderia mudar, alterando seu perfil sorológico. A Tabela 5.19 sintetiza os resultados obtidos, evidenciando que, mesmo com a diminuição do fluxo do conjugado, ligações inespecíficas continuaram aparecendo nas amostras negativas.

Tabela 5.19 – Resultados do TR 03 para a proteína recombinante D.

Amostras	TR 03
2b6-	N2/P1
5b3-	P1
4b5+	P1
8b6+	P1

Amostras: - (negativa) e + (positiva fraca).
 Vermelho: falso-positivo.
 P1 (reatividade fraca),
 N2/P1 (ponto de corte),
 N1 (negativo absoluto).

No TR 04, novamente, o fluxo do conjugado foi diminuído (0,30µl/mm) a fim de eliminar as ligações inespecíficas encontradas nas amostras negativas. Pode-se observar na Tabela 5.20 que as ligações inespecíficas das duas amostras negativas analisadas anteriormente (2b6 e 5b3) foram eliminadas, porém, ao aumentar o número amostral para acessar perfis sorológicos diferentes, obteve-se um resultado falso-positivo.

Tabela 5.20 – Resultados do TR 04 para a proteína recombinante D.

Amostras	TR 04
2b6-	N1
5b3-	N2
9b4-	N1
12e6-	N2
9b5-	N1
10b4-	N2
18b5-	P1

Continua

Continuação

Amostras	TR 04
4b5+	N2/P1
10b3+	P1
8b6+	N2/P1
35b5+	P3
40b1+	P1
42b2+	P1
12e1+	P2

Amostras: - (negativa) e + (amostra positiva).

Vermelho: falso-positivo.
 P3 (fortemente reativa),
 P2 (reatividade média),
 P1 (reatividade fraca),
 N2/P1 (ponto de corte),
 N2 (negativo com sombra),
 N1 (negativo absoluto).

As respostas das amostras positivas a essa combinação foram fracas e, por isso, decidiu-se não alterar qualquer outra variável (fluxo do conjugado, concentração do antígeno, bloqueio do tampão de corrida) na tentativa de eliminar o resultado falso-positivo encontrado para a amostra 18b5.

Uma nova impregnação (TR 05) foi feita nas mesmas condições anteriores, considerando o aumento do número amostral e o tampão base fosfato bloqueio 1 (TC1b) continuou sendo a escolha para a realização do ensaio. Foram analisadas 94 amostras clínicas negativas provenientes do Hemorio e 11 amostras positivas AEQ. Foram obtidos 13 resultados falso-positivos e 2 resultados falso-negativos. Esses resultados foram plotados em gráfico (Figura 5.7) e os dados planilhados no Anexo 9.5.

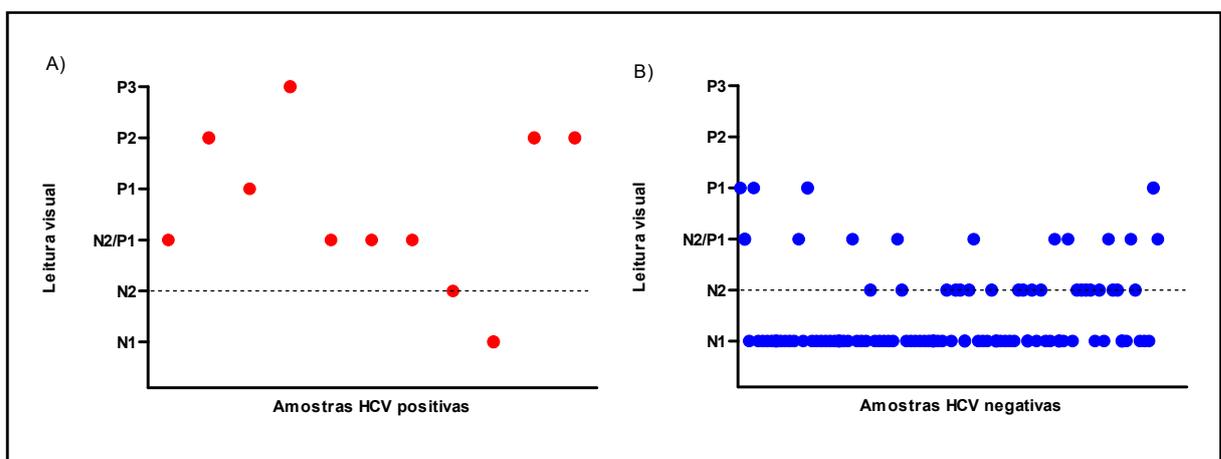


Figura 5.7 - Resultados do TR 05 para a proteína recombinante D. Onde: P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto). **A:** total de 11 amostras AEQ positivas para HCV: dois resultados falso-negativos. **B:** total de 94 amostras clínicas negativas para HCV: 13 resultados falso-positivos.

As análises com a proteína recombinante D não foram satisfatórias, pois não foi possível chegar a uma padronização em que se resolvesse, principalmente, a baixa especificidade obtida nas avaliações sem afetar a respostas das amostras pouco reativas.

Outro fato importante a ressaltar é que a concentração dessa proteína é muito baixa (0,25mg/mL) e, para realizar as impregnações supracitadas, necessita-se de um grande volume de antígeno, deixando a linha T grossa, além de visível, mesmo sem a aplicação do corante. Antes da execução do ensaio, é possível visualizar uma linha cinza escura grossa nessa região, o que pode levar a um erro na leitura do operador (Figura 5.8). Por esses motivos, foi decidido excluir essa proteína recombinante das próximas análises.



Figura 5.8 – Perfil de linha teste antes da realização do ensaio: linha grossa e visível mesmo sem corante.

5.4.5 Proteína recombinante E

Dos três cenários testados no TR 01 para a proteína recombinante E utilizando um tampão de corrida base fosfato sem bloqueio (TC1a), todas as situações obtiveram resultados insatisfatórios, pois apresentaram resultados falso-positivos/negativos. Decidiu-se prosseguir para o TR 02 com a condição E2, pois esta apresentou apenas um resultado falso-positivo enquanto a situação E1 obteve três resultados falso-positivos e a situação E3, além de um resultado falso-positivo, mostrou dois falso-negativos para amostras positivas fracas (Tabela 5.21).

Tabela 5.21 – Resultados do TR 01 para a proteína recombinante E.

TR 01			
Amostras	E1	E2	E3
2b6-	P1	N1	N1
5b3-	P1	P1	P2
9b4-	N2/P1	N1	N1

Continua

Continuação

TR 01			
Amostras	E1	E2	E3
4b5+	P2	P1	N2
10b3+	P2	P2	P1
8b6+	P1	P1	N2
35b5++	P3	P3	P3

E1 (membrana 3µm), E2 (membrana 10µm) e E3 (membrana 15µm).

Amostras: - (negativa), + (positiva fraca) e ++ (positiva forte).

Vermelho: falso-positivo.

Azul: falso-negativo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Para o TR 02, um tampão de corrida base fosfato bloqueio 1 (TC1b) foi utilizado com o propósito de verificar se eliminava a ligação inespecífica encontrada na leitura do teste com a amostra negativa. A Tabela 5.22 mostra que esse bloqueio ocorreu, entretanto, obtiveram-se dois resultados falso-negativos para amostras positivas fracas.

Tabela 5.22 – Resultados do TR 02 para a proteína recombinante E.

Amostras	TR 02
2b6-	N1
5b3-	N1
9b4-	N1
12e6-	N1
9b5-	N1
10b4-	N1
11b3-	N1
4b5+	P1
10b3+	P2
8b6+	N2/P1
35b5++	P3
8b5+	N2/P1
35b1+	N2
16b2+	N2
12e1+	P1

Amostras: - (negativa), + (positiva fraca) e ++ (positiva forte).

Azul: falso-negativo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Repetindo o modelo anterior (TR 02), o TR 03, utilizou um fluxo de conjugado maior (0,50µl/mm) com intuito de verificar se aumentava a intensidade da marcação das amostras que apresentaram perfil falso-negativo. Ambas as amostras continuaram com o mesmo perfil de resposta e, apesar de serem positivas fracas, exibiram resultados negativos. O perfil de resposta das amostras negativas não foi alterado.

Ainda com o objetivo de intensificar a marcação das amostras que apresentaram perfil falso-negativo (35b1 e 16b2), o TR 04 foi realizado nas mesmas condições anteriores (TR 03), apenas aumentando a concentração do antígeno para 60ng/mm. Novas amostras positivas fracas foram incluídas na análise. O aumento da concentração do antígeno não foi capaz de alterar o perfil de resposta de três amostras positivas, obtendo resultados falso-negativos. Novamente, o perfil de resposta das amostras negativas não foi alterado.

Os resultados dos TR 03 e TR 04 foram sintetizados na Tabela 5.23.

Tabela 5.23 – Resultados dos TR 03 e TR 04 para a proteína recombinante E.

Amostras	TR 03	TR 04
2b6-	N1	N1
5b3-	N1	N1
9b4-	N1	N1
12e6-	N1	N1
9b5-	N1	N1
10b4-	N1	N1
11b3-	N1	N1
4b5+	-	P1
10b3+	-	P1
8b6+	P1	P1
8b5+	-	N2
35b1+	N2	N2
16b2+	N1	N1
12e1+	-	P1

Amostras: - (negativa) e + (positiva).
Azul: falso-negativo.
- não avaliado.
P1 (reatividade fraca), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Ainda com a intenção de eliminar os resultados falso-negativos, uma nova impregnação foi realizada com o antígeno no fluxo de 80ng/mm no TR 05. Conforme apresentado na Tabela 5.24, de cinco amostras positivas fracas, apenas um

resultado falso-negativo foi obtido. O aumento do fluxo do antígeno não impactou na resposta das amostras negativas.

Tabela 5.24 – Resultados do TR 05 para a proteína recombinante E.

Amostras	TR 05
2b6-	N1
5b3-	N1
9b4-	N1
12e6-	N1
9b5-	N1
8b6+	P1
40b1+	P1
8b5+	P1
35b1+	N2/P1
16b2+	N2

Amostras: - (negativa) e + (positiva).

Azul: falso-negativo.

P1 (reatividade fraca),
N2/P1 (ponto de corte),
N2 (negativo com
sombra), N1 (negativo
absoluto).

O tampão de corrida usado no TR 05 (base fosfato bloqueio 1 - TC1b) possui soro de galinha em sua formulação. Assim como decidido para a proteína recombinante A, considerando o não controle imunológico de cada lote de soro de galinha, decidimos trocar a base da formulação retirando esse insumo. O TR 06 foi realizado nas mesmas condições anteriores utilizando um tampão de corrida base tris bloqueio 1 (TC2a). Foram analisadas amostras clínicas negativas do Hemorio e todas obtiveram resultados satisfatórios. Já as amostras positivas AEQ reproduziram os resultados obtidos no teste anterior (TR 05) conforme apresentado na Tabela 5.25.

Tabela 5.25 – Resultados do TR 06 para a proteína recombinante E.

Amostras	TR 06
32-	N1
58-	N1
60-	N1
94-	N1
98-	N1
99-	N1
142-	N1

Continua

Continuação

Amostras	TR 06
10b3+	P2
8b6+	P1
40b1+	P1
8b5+	P1
42b2+	P1
35b1+	N2/P1
16b2+	N2
12e1+	P1

Amostras: - (negativa)
e + (positiva).
Azul: falso-negativo.
P2 (reatividade média),
P1 (reatividade fraca),
N2/P1 (ponto de corte),
N2 (negativo com
sombra), N1 (negativo
absoluto).

Dessa forma, foi produzido um pré-lote para avaliar um número amostral maior. As características da produção e execução do teste (TR 07) estão informadas na Tabela 5.26.

Tabela 5.26 – Variáveis do pré-lote da proteína recombinante E.

Insumo	Tipo
Membrana de nitrocelulose	10µm
Antígeno recombinante	80 ng/mm
Conjugado de ouro com proteína A	0,50 µl/mm
Tampão de corrida TC2a	Base tris bloqueio 1

No pré-lote, foram analisadas 124 amostras sendo 61 amostras positivas para HCV provenientes do AEQ e 63 amostras clínicas negativas para HCV provenientes do Hemorio. O teste obteve índices de 96,72% de sensibilidade (duas amostras falso-negativas) e 100% de especificidade. Os resultados foram expressos em gráfico (Figura 5.9) e os dados apresentados em planilha no Anexo 9.6.

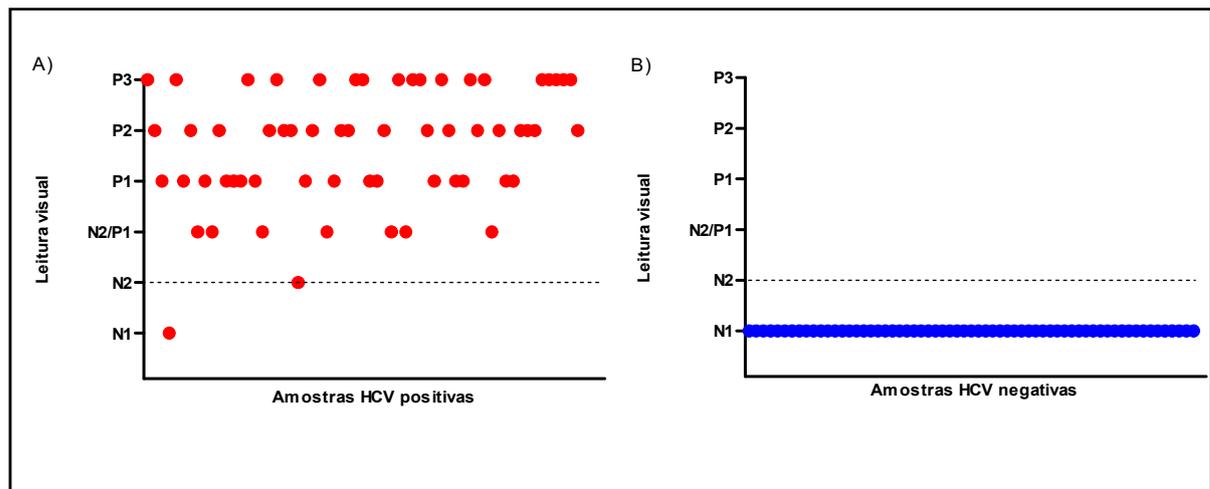


Figura 5.9 - Resultados do pré-lote para a proteína recombinante E. Onde: P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto). **A:** total de 61 amostras AEQ positivas para HCV: dois resultados falso-negativos. **B:** total de 63 amostras clínicas negativas para HCV: sem resultados falso-positivos.

Considerando os valores de sensibilidade e especificidade obtidos através da avaliação do pré-lote (~97%), foi possível calcular o número amostral mínimo obtido utilizando nível de confiança de 95% e erro de 2,8% para que fosse possível adequar a análise dentro das possibilidades de obtenção de amostras para a avaliação final.

Aplicando esses valores à fórmula da seção 4.2.5 da metodologia, serão necessárias pelo menos 143 amostras positivas para a avaliação final. Com relação às amostras negativas, devido à alta especificidade obtida no pré-lote (100%) poucas amostras seriam suficientes, porém, utilizamos uma amostragem maior para termos uma melhor avaliação com a variedade de perfis sorológicos de doadores saudáveis.

Considerando o erro amostral de 2,8% e a sensibilidade encontrada no pré-lote 96,72% (~97%), esperava-se encontrar, no lote final, a sensibilidade do teste entre 93,92% e 99,52% ($96,72 \pm 2,8$).

O teste final (TR 08) foi realizado analisando um total de 286 amostras clínicas, dentre as quais 168 eram positivas para HCV oriundas do IOC e 118 negativas para HCV procedentes do Hemorio. Esse lote final teve como índices: 98,21% de sensibilidade (três resultados falso-negativos) e 100% de especificidade. Os resultados foram plotados em gráfico (Figura 5.10) e os dados inseridos em planilha (Anexo 9.7).

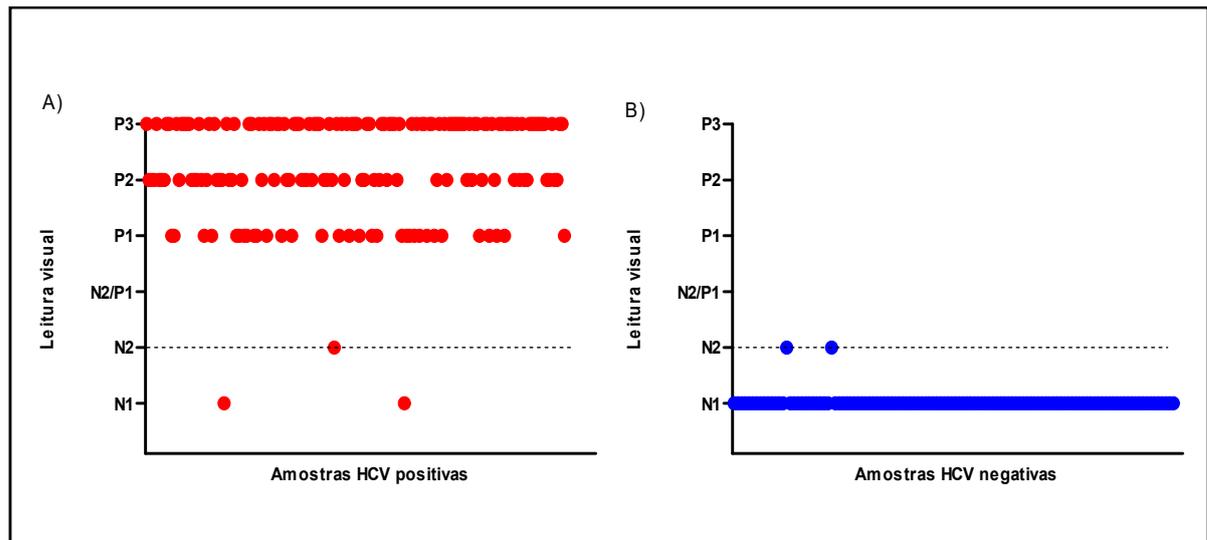


Figura 5.10 - Resultados do lote final para a proteína recombinante E. Onde: P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto). **A:** total de 168 amostras clínicas positivas para HCV: três resultados falso-negativos. **B:** total de 118 amostras clínicas negativas para HCV: sem resultados falso-positivos.

Diante de todos os dados reunidos durante avaliação das proteínas recombinantes, a proteína E demonstrou ser a mais promissora quando comparada às outras proteínas recombinantes, obtendo maiores índices de sensibilidade e especificidade. Considerando esses resultados e o desempenho superior da proteína recombinante E, os testes finais de reação cruzada, índice Kappa e amostras *spike* foram realizados apenas com essa proteína.

5.5 REAÇÃO CRUZADA

Com o objetivo de analisar possíveis reações cruzadas do TR HCV (E), foi realizada avaliação do teste frente a sete doenças infecciosas diferentes: HIV, outras hepatites (HBV), sífilis, doença de Chagas, HTLV-I e II, Zika e dengue. Foram utilizadas 10 amostras positivas para cada doença e não foram verificadas reações cruzadas. O resultado pode ser conferido no Anexo 9.8 e avaliado na Tabela 5.27.

Tabela 5.27 – Perfil de reações cruzadas provocadas por diferentes doenças no teste rápido.

	Doença						
	HIV	HBV	Sífilis	Chagas	HTLV	Zika	Dengue
nº Reativos / nº Total	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
% Reações Cruzadas	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

5.6 ÍNDICE KAPPA

Conforme Anexo 9.9, todas as amostras clínicas positivas para HCV provenientes do IOC foram avaliadas em um teste rápido comercial (147 reagentes) e também para carga viral, que variou entre 1,12 e 7,32 log UI/mL.

Das 147 amostras disponibilizadas pelo IOC:

- 20 possuíam informação sobre o genótipo, sendo sete amostras do genótipo 1a, outras sete do 1b e, por fim, seis amostras do genótipo 3;
- 127 possuíam informação de idade (média de 54 anos) e de sexo (89 eram do sexo feminino).

Uma análise comparativa entre os resultados do TR HCV Wama HCV (comercial) e o nosso kit foi determinada pelo índice Kappa de concordância através do pacote vcd no *software* R como pode ser resumido na Figura 5.11.

		TR HCV Wama		
		NEGATIVO REF	POSITIVO REF	TOTAL
TR HCV	NEGATIVO VALIDADO	118	3	121
	POSITIVO VALIDADO	0	144	144
	TOTAL	118	147	265

CONCORDÂNCIA	98,87%	É recomendado um valor de 100%
CONCORDÂNCIA POSITIVO	97,96%	
CONCORDÂNCIA NEGATIVO	100,00%	
KAPPA	97,7%	É recomendado um Kappa > 75%

Figura 5.11 – Análise comparativa entre os resultados com o TR Wama HCV e com o TR HCV (E).

O índice Kappa apresentou alta concordância entre o teste rápido comercial e o teste rápido em estudo. Foi utilizado, no cálculo, o intervalo de confiança (0,9514 - 1,0). Conforme pode ser conferido na seção 4.2.5 da metodologia, o valor de Kappa igual a 0,9771 (0,81 – 1,00) expressa uma correlação quase perfeita entre os testes utilizados para o diagnóstico da hepatite C.

5.7 AMOSTRAS SPIKE

Com a finalidade de simular a pesquisa em sangue total, foram misturados 20µl do concentrado de hemácia de um indivíduo sadio com 20µl do soro de interesse para a obtenção de amostras *spike*. Dessa maneira, foram obtidas 17 amostras *spike* negativas e 24 amostras *spike* positivas para HCV e foi realizada a avaliação com o teste padronizado final (TR HCV E). Todos os resultados se reproduziram satisfatoriamente quando comparados com a análise anterior realizada com soro mantendo o perfil de resposta da amostra, ou seja: as amostras não reagentes para hepatite C se mantiveram negativas e as amostras reagentes para hepatite C continuaram positivas. A síntese dos resultados obtidos está representada na Tabela 5.28 e a descrição completa destes pode ser encontrada no Anexo 9.10.

Tabela 5.28 – Resultado da simulação de teste com sangue total (*spike*).

	Negativas		Positivas	
	Soro	<i>Spike</i>	Soro	<i>Spike</i>
Positividade	17	17	24	24
Reprodutibilidade	100%		100%	

6 DISCUSSÃO

A Fiocruz, vinculada ao Ministério da Saúde, é a instituição de ciência e tecnologia em saúde que mais se destaca em toda América Latina, promovendo, gerando e propagando o conhecimento científico e tecnológico. Cumpre um papel estratégico para o desenvolvimento nacional, sendo Bio-Manguinhos uma das suas principais unidades técnico-científicas que atende, prioritariamente, às demandas de saúde pública do país no que tange à produção e desenvolvimento de vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico (BIO-MANGUINHOS, 2016b; FIOCRUZ, 2019).

Os reativos para diagnóstico auxiliam na prevenção, erradicação e monitoramento de diversas enfermidades, pois geram resultados rápidos, precisos e eficazes que são fundamentais para a detecção precoce de doenças. Desde a década de 80, eles são fornecidos por Bio-Manguinhos, sendo vitais para programas estratégicos do Ministério da Saúde. Dentro desse cenário, o Programa de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos investe na consolidação das plataformas tecnológicas de testes rápidos (TR) e busca diversificar e enriquecer seu portfólio, com atividades internas de pesquisa e desenvolvimento. Isso permite alcançar uma maior independência tecnológica, alavancando a capacidade de inovação no Brasil e fortalecendo o Complexo Industrial da Saúde (BIO-MANGUINHOS, 2016a, b).

O uso do TR é estratégico no cenário epidemiológico brasileiro, pois além de não precisar de estrutura laboratorial nem de profissionais especializados para sua execução, possui uma logística simples de transporte e armazenamento. Isso viabiliza ações em campo e a comunicação do resultado ao paciente ainda no momento do atendimento evitando a perda no seu acompanhamento. Dessa forma, os testes rápidos são ferramentas importantes para a ampliação das possibilidades de diagnóstico para variados agravos, incluindo a hepatite C (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; VILLAR et al., 2015).

A hepatite C é silenciosa e afeta mais de dois milhões de pessoas no Brasil. A maioria das pessoas infectadas pelo HCV não sabe seu diagnóstico o que contribui para a transmissão dessa infecção e a descoberta é tardia, em geral, depois de

décadas, já na fase crônica da doença, podendo levar ao óbito do paciente (OMS, 2017a; SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 2016).

Adicionadas as vantagens do uso do teste rápido no diagnóstico da hepatite C a todo conhecimento que Bio-Manguinhos possui na produção desse ensaio, foi proposta uma avaliação das proteínas recombinantes de HCV adquiridas pelo laboratório com o intuito de uso na plataforma de imunocromatografia de fluxo lateral. Destas, as proteínas recombinantes A, E, F e G são comerciais importadas, enquanto as proteínas B, C e D são nacionais ainda em desenvolvimento (LIMA, 2017).

Antes de iniciar, de fato, a avaliação das proteínas recombinantes, as amostras de soro humano foram caracterizadas. O uso de amostras bem caracterizadas é de extrema importância durante o desenvolvimento de um teste rápido, pois, nesse momento, é realizada a padronização do kit, definindo todos os parâmetros do ensaio.

HCV e HIV possuem rotas de transmissão em comum. Estima-se que cerca de 36,7 milhões de pessoas no mundo vivam com HIV. Destas, cerca de 2,3 milhões têm evidências sorológicas de infecção passada ou presente pelo HCV (OMS, 2017a).

Das 236 amostras anti-HCV positivas testadas para HIV, 14 foram reagentes, correspondendo a 5,93%. O boletim epidemiológico das hepatites virais informa que no período de 2007 a 2017, 9,4% (16.034) do total de casos notificados de hepatite C apresentaram coinfeção com o HIV. No entanto, estratificando os dados, observa-se uma redução no percentual de coinfeção ao longo desses anos que, em 2007, foi de 14,0% e, em 2017, passou para 7,7%, aproximando-se do valor encontrado neste estudo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Mais de 18 milhões de casos de dengue foram registrados em todo o continente americano entre 1995 e 2015, destes, 55% foram notificados pelo Brasil. Entre os países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), o Brasil apresentou a maior taxa de incidência de dengue: 294,02 por 100.000 habitantes em 2014 (FARES et al., 2015; NUNES et al., 2019). Estudos mostraram que resultados falso-negativos podem ser observados quando amostras dengue reativas foram analisadas em testes rápidos anti-HCV. Isso pode ocorrer devido à diminuição da produção de anticorpos anti-HCV durante a infecção pelo vírus da dengue como já observado (SCALIONI et al., 2014).

Considerando as altas incidência e prevalência de dengue na população brasileira, as amostras negativas para HCV oriundas do Hemorio cedidas no ano de 2017 foram submetidas ao kit comercial de dengue. Um total de 265 amostras foram analisadas, sendo que 3,77% foram reagentes (ou em faixa cinza) para dengue IgM e 29,06% para IgG. Quando os resultados em faixa cinza foram excluídos e analisados apenas os verdadeiramente reagentes para dengue, esses índices caem para 3,40% e 19,62% respectivamente.

Um estudo de 2012 realizou uma triagem sorológica para detectar a presença de anticorpos IgM e IgG específicos para os quatro sorotipos da dengue em 213 doadores de sangue. Não houve presença de anticorpos IgM nos doadores de sangue, mas 1,4% apresentaram resultados positivos na pesquisa de anticorpos IgG contra o vírus da dengue (RIBAS-SILVA; EID, 2012).

Além da doença não ter o mesmo perfil todos os anos, inclusive, ser desigual ao longo dos meses, sabe-se que muitos casos de dengue são assintomáticos, além de um percentual grande de subnotificação e classificações incorretas, com apenas uma notificação para cada vinte casos de dengue, fatores que podem levar à discrepância de dados encontrada (FARES et al., 2015; NUNES et al., 2019). Para este estudo, foram selecionadas apenas as amostras que obtiveram resultados verdadeiramente negativos para dengue (IgM e IgG) com o intuito de evitar interferentes para as etapas de padronização do ensaio.

Após a padronização e a escolha das amostras que seriam utilizadas no estudo, iniciou-se, de fato, o trabalho com as proteínas recombinantes. Primeiramente, pela técnica de SDS-Page e do Mapia, avaliou-se a integridade e a reatividade imunológica das proteínas respectivamente.

A degradação proteica pode comprometer o desempenho do teste e as sete proteínas encontravam-se íntegras de acordo com as especificações dos fornecedores. Muitos ensaios imunocromatográficos atuais são desenvolvidos utilizando uma combinação de antígenos (core, NS3, NS4 e NS5) e, pelo Mapia, pode-se constatar este fato, já que somente as proteínas recombinantes A, B, C, D e E, que possuem pelo menos três dessas proteínas virais, foram selecionadas por apresentarem reatividade imunológica satisfatória (JÚNIOR, 2001; KHUROO; KHUROO; KHUROO, 2015; LYASHCHENKO et al., 2000; SHIVKUMAR et al., 2012).

As cinco proteínas recombinantes selecionadas foram avaliadas na plataforma de teste rápido empregando método de padronização utilizado pelo laboratório para o desenvolvimento destes testes. As proteínas foram impregnadas

separadamente em diferentes membranas de nitrocelulose, totalizando 15 situações distintas e desafiadas com um grupo pequeno de amostras oriundas de painel AEQ.

À medida que os testes eram realizados, novas combinações eram determinadas aumentando ou diminuindo a concentração de impregnação da proteína, o fluxo do conjugado, o bloqueio do tampão de corrida ou, até mesmo, sua formulação. O objetivo era encontrar um equilíbrio entre todas essas variáveis a fim de evitar a ocorrência de resultados falso-positivos/falso-negativos, obtendo, ao final da padronização, índices aceitáveis de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da hepatite C.

Em todos os ensaios com as proteínas B e C, observou-se que a linha teste impregnada apresentava-se grossa, dispersa e sem nitidez, atributos inaceitáveis para um teste que emprega leitura visual dos resultados além do arraste já observado no ensaio de Mapia. Além disso, ambas as proteínas apresentaram inespecificidade e inconsistências em seus resultados que dificultaram suas padronizações. Portanto, baseado nos dados obtidos com a triagem inicial, foi dado prosseguimento ao estudo apenas com as proteínas A, D e E.

A proteína recombinante D que, inicialmente, apresentava resultados promissores, ao ser submetida a um grupo maior de amostras, mostrou-se inespecífica. Não foi possível chegar à uma padronização que resolvesse, principalmente, a baixa especificidade obtida nas avaliações sem afetar as respostas das amostras pouco reativas. Ademais, a concentração fornecida dessa proteína é muito baixa (0,25mg/mL), sendo necessária a utilização de um grande volume para realizar as impregnações, o que deixa a linha T grossa e visível, mesmo sem a aplicação do corante. Antes da execução do ensaio, é possível visualizar uma linha cinza escura grossa nessa região, o que pode levar a um erro na leitura do teste.

É interessante notar que as proteínas recombinantes B, C e D, além de ainda estarem em desenvolvimento, não possuem a região NS3 da poliproteína do HCV. Indivíduos infectados pelo HCV produzem anticorpos contra epítomos de proteínas estruturais e não-estruturais do vírus.

Em estudo publicado em 2002, Nikolaeva e colaboradores demonstraram que os primeiros anticorpos específicos para HCV detectáveis no soro são os que visam às regiões NS3 e core. De acordo com Netski e colaboradores (2005), no momento da soroconversão, os anticorpos contra proteínas não-estruturais são detectados com mais frequência do que os anticorpos contra a proteína do core. Um terceiro

estudo, publicado em 2009, aponta como os antígenos mais imunogênicos do HCV, proteínas do Core, NS4B, NS3 e NS5A (SILLANPÄÄ et al., 2009).

Pelos motivos listados, foi decidido excluir a proteína recombinante D do estudo e continuar as análises com as proteínas recombinantes A e E, entretanto, alterando a formulação do tampão de corrida utilizado em ambas, já que possuía soro de galinha.

Utilizando o conhecimento adquirido anteriormente em desenvolvimento de outros kits, sabe-se da dificuldade do controle imunológico de cada lote desse insumo, o que pode gerar inconsistências no desempenho do ensaio (TREVISOL, 2016). Seguindo estes princípios, decidiu-se trocar a base da formulação do tampão de corrida retirando o soro de galinha de sua composição que era utilizado até o momento.

Em seguida, foi dada continuidade à padronização dos testes com as proteínas recombinantes A e E utilizando a nova formulação de tampão de corrida acrescido de diferentes componentes que adicionavam poder de bloqueio leve, moderado, forte ou muito forte. As condições de padronização obtidas indicam que a proteína recombinante A seja menos específica quando comparada à E, pois, para alcançar 100% nas análises com as amostras negativas, foi necessário a utilização de um bloqueio alto para diminuir a reação inespecífica em detrimento do sinal das amostras positivas mais fracas, diminuindo assim a sensibilidade do ensaio.

Foram, então, realizados testes nessas condições, etapa chamada de pré-lote, para que pudesse ser calculado o número amostral de cada proteína para o lote final. No pré-lote, a proteína recombinante A obteve 91,67% de sensibilidade, enquanto a proteína E obteve 96,72%. Ambas atingiram 100% de especificidade.

O lote final foi produzido para cada proteína e o teste foi realizado seguindo as condições estabelecidas para o pré-lote. Não foi possível analisar o número total de amostras positivas estabelecido para a proteína recombinante A devido à falta de material (quantitativo disponível de amostras positivas para HCV e de conjugado impregnado), limitando o número de testes.

Para a proteína recombinante A, foram analisadas 168 amostras positivas para HCV, obtendo 93,45% de sensibilidade e 65 amostras negativas para HCV, obtendo 100% de especificidade. Já para a proteína recombinante E, foram analisadas 168 amostras positivas para HCV, obtendo 98,21% de sensibilidade e 118 amostras negativas para HCV, obtendo 100% de especificidade.

Um estudo publicado em 2017 avaliou o desempenho de testes rápidos anti-HCV utilizando amostras coinfetadas com HIV concluiu que, as amostras cujos resultados eram discordantes apresentavam carga viral HIV maior (BARBOSA et al., 2017). Como já observado anteriormente, isso pode ocorrer devido à baixa produção de anticorpos anti-HCV durante a infecção por HIV (CHAMIE et al., 2007).

Dentre as 17 amostras que apresentaram resultado falso-negativo nas etapas de pré-lote ou lote final do TR HCV com as proteínas recombinantes A e/ou E afetando a sensibilidade dos ensaios, apenas uma foi reagente para HIV (amostra 2024), correspondendo a 5,88% (1/17). Bonacini e colaboradores publicaram, em 2001, um estudo mostrando que cerca de 5,5% (6/110) dos pacientes HIV-positivos não conseguiram desenvolver anticorpos contra o HCV quando infectados, valor este que está em congruência com os resultados obtidos no TR HCV (E) (BONACINI; LIN; HOLLINGER, 2001). Já Smith e colaboradores encontraram um percentual maior, 11,3%, entretanto, na própria discussão de seu artigo, é mencionado que, em outros estudos, a média de resultados falso-positivos varia de 3,8 a 5,5% (SMITH et al., 2011).

Os testes rápidos utilizados no diagnóstico da hepatite C têm excelentes índices de sensibilidade e especificidade quando comparados a métodos laboratoriais (TANG et al., 2017). Em um estudo realizado pelo Instituto Oswaldo Cruz, Scalioni e colaboradores (2014) avaliaram o desempenho de três testes rápidos atualmente comercializados: Bioeasy HCV Rapid Test, WAMA Imuno-Rápido HCV e Oraquick HCV Rapid Test. Em amostras anti-HCV reagentes, a sensibilidade e a especificidade dos testes rápidos para o diagnóstico da hepatite C variou entre os diferentes fluidos biológicos de 76,03 a 93,84% e de 93,75 a 100%, respectivamente. Nessa mesma população, quando foram incluídas apenas amostras anti-HCV e HCV RNA detectados, a sensibilidade dos testes rápidos variou de 86,36% a 99,09% e não foi verificada alteração nos índices de especificidade.

No ano seguinte, outro estudo comparou o desempenho de oito testes rápidos de três empresas (MedMira, Chembio e OraSure) utilizando amostras de sangue total e fluido oral. Os resultados encontrados foram semelhantes: a sensibilidade variou de 79,1 a 92,7% e a especificidade de 99,2 a 100% (FISHER et al., 2015).

Outro estudo investigou o desempenho de dois testes rápidos para a detecção do anti-HCV (Teste Rápido Bioeasy e Imuno-Rápido HCV). Ambos

obtiveram índices de sensibilidade de 97,1% e especificidade de 100% quando comparados à quimioluminescência (DA ROSA et al., 2013).

Os resultados obtidos com as proteínas recombinantes A e E são comparáveis aos índices obtidos nesses estudos, entretanto, em todas as avaliações realizadas no pré-lote e no lote final, as amostras falso-negativas para a proteína recombinante E também não foram reativas para a proteína recombinante A. Portanto, diante dos resultados obtidos, foi decidido não adicionar múltiplas proteínas ao teste, pois não apresentariam ganho ao seu desempenho e acrescentariam custo ao produto. Diante do cenário das análises dos lotes finais, os próximos testes foram realizados apenas com a proteína recombinante E.

Com o intuito de analisar possíveis reações cruzadas, foi realizada avaliação do teste frente a sete doenças infecciosas diferentes: HIV, outras hepatites (HBV), sífilis, doença de chagas, HTLV-I e II, Zika, dengue. A escolha desses marcadores foi fundamentada na prevalência mundial/nacional das infecções, em estudos realizados anteriormente, por pertencer à mesma família de vírus ou até mesmo pela rota de transmissão em comum (MIKAWA, 2006; PEREIRA, 2011; SCALIONI et al., 2014; SOUZA, 2011). Não foi verificada reação cruzada com essas doenças.

A fim de avaliar a confiabilidade e a precisão do TR, o grau de concordância foi analisado pelo Índice Kappa, apresentando correlação quase perfeita quando comparado aos testes realizados no centro de referência – IOC (WAMA Imuno-Rápido HCV). Vale ressaltar que, para as três amostras que negativaram com o TR HCV (E), o TR Wama HCV obteve resultado reagente fraco.

No estudo realizado por Scalioni e colaboradores (2014) que avaliou o desempenho de testes rápidos, quando comparados a um ensaio imunoenzimático comercial e considerando os resultados das amostras de soro com anti-HCV e HCV RNA detectados, o índice kappa obteve resultados entre 94,02 e 100% para duas marcas: Wama e Bioeasy. Estes resultados indicam a boa correlação entre os resultados obtidos com testes comerciais e o teste desenvolvido neste trabalho.

Anticorpos anti-HCV foram detectados em 144/147 amostras positivas com HCV RNA detectável utilizando o TR HCV (E). A carga viral média dessas amostras foi de 5,12 log UI/mL, variando entre 1,12 e 7,32 log UI/mL. Analisando a carga viral das três amostras com resultados falso-negativos no TR HCV (E), não foi possível observar correlação direta entre o resultado negativo encontrado na sorologia e a carga viral da amostra.

O HCV tem considerável diversidade genética com sete genótipos conhecidos (MURPHY et al., 2015). De todas as amostras positivas para HCV analisadas, 20 possuíam informação sobre o seu genótipo (1a, 1b ou 3). Sabe-se que estes genótipos são os predominantes em grande parte dos países, principalmente, América Latina e Caribe (MESSINA et al., 2015). O TR HCV (E) deste trabalho foi capaz de detectar anticorpos anti-HCV nas 20 amostras supracitadas, sugerindo não haver influência do genótipo na acurácia do ensaio assim como encontrado em outros estudos (KHUROO; KHUROO; KHUROO, 2015; SCHEIBLAUER et al., 2006) Para confirmação de tal afirmação, são necessárias novas análises com número amostral maior.

Dentre as amostras avaliadas e fornecidas pelo IOC para determinação do Índice Kappa, 127 possuíam informação de idade, resultando em uma média de 54 anos. Um estudo publicado em 2013 mostrou que foi encontrada uma média de idade de 54,7 anos entre os portadores crônicos do HCV (DA ROSA et al., 2013). Em consonância, o boletim epidemiológico das hepatites virais mostra que, em 2017, as maiores taxas de detecção foram observadas na faixa etária de 55 a 59 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Ainda considerando as mesmas 127 amostras, mais da metade, 70,08% (89/127) dos casos eram do sexo feminino. Esse número difere dos achados em um estudo publicado em 2013 e do boletim epidemiológico das hepatites virais, nos quais a maior parte das pessoas infectadas eram do sexo masculino, 54,4% e 58,0% respectivamente (DA ROSA et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a). Entretanto, assim como este estudo (TR HCV – E), Scalioni e colaboradores (2014) verificaram um predomínio do sexo feminino (54,43%) durante a caracterização do painel de soros anti-HCV positivos, assim como outro estudo publicou em 2013, o qual mostrou que 54,6% dos pacientes recrutados eram do sexo feminino (PEREIRA et al., 2013).

Por último, foi realizado um procedimento com o intuito de simular o teste com amostras de sangue total como é esperado que seja utilizado como *Point of Care*, sendo esta uma plataforma de teste rápido.

A avaliação foi realizada com 41 amostras *spike*, sendo 17 obtidas a partir de soros negativos e 24 de soros positivos para HCV. Essa análise mostrou que o TR HCV está apto a ser utilizado com sangue total, não apresentando diferenças nos resultados obtidos entre os testes com soro ou sangue total. Resultados semelhantes também foram obtidos por Scalioni e colaboradores (2014). Neste

estudo, não foi observada alteração nos valores de sensibilidade e especificidade do kit Bioeasy HCV Rapid Test ao comparar os resultados obtidos com amostras de soro e sangue total.

De acordo com as avaliações realizadas neste trabalho, considera-se que o conjunto desenvolvido esteja apto para o diagnóstico da hepatite C com as atividades de pesquisa e desenvolvimento finalizadas. Porém, ainda são necessárias atividades complementares para a plena aceitação do conjunto diagnóstico, tais como, realização de estudos de repetitividade e reprodutibilidade; realização de ensaios com amostras positivas para malária a fim de verificar reação cruzada com o TR HCV devido à indisponibilidade de amostras e testes (tal reação cruzada foi verificada anteriormente por Scalioni e colaboradores em 2014); realização de testes de detecção do HCV RNA em amostras de soro com resultados duvidosos devido ao volume insuficiente de amostras. Estas atividades serão retomadas em momento oportuno.

Como próximos passos, é preciso produzir um lote protótipo na área de produção para confirmação dos resultados obtidos, uma vez que os equipamentos são de escala industrial, realizar uma análise de custo do produto e elaborar o manual de instrução de uso do kit. Ainda serão produzidos três lotes de consistência e realizados os testes de repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade e definido o limite de detecção como parte dos requerimentos para solicitação de registro junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa.

7 CONCLUSÕES

- Pela eletroforese, verificou-se que todas as proteínas estavam íntegras, apresentando seu peso molecular de acordo com as especificações dos fornecedores.
- Através da técnica de Mapia, as proteínas recombinantes F e G não apresentaram a reatividade esperada e foram eliminadas do estudo.
- Das cinco proteínas recombinante avaliadas na plataforma de teste rápido, a proteína E foi a mais promissora e a melhor candidata a alvo em um kit de imunocromatografia de fluxo lateral para diagnóstico da hepatite C.
- A combinação de membrana de poros de 10 μ m de diâmetro com a proteína recombinante E em concentração de 80 ng/mm, conjugado de proteína A com ouro coloidal em fluxo 0,50 μ l/ml e tampão de corrida base Tris bloqueio 1 aplicado no volume 100 μ l mostrou ser o melhor conjunto resultante da padronização para este teste rápido.
- O conjunto desenvolvido neste trabalho obteve 98,21% de sensibilidade, 100% de especificidade, 0,9771 de valor Kappa, 0% de reações cruzadas e 100% de reprodutibilidade com amostras *spike* que simulam sangue total.
- Comparado a estudos realizados com outros kits comerciais para a mesma finalidade, o conjunto analisado neste trabalho apresentou excelente desempenho, sendo promissor para aplicação em um teste rápido para detecção da Hepatite C.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 34 de 11 de junho de 2014**. Brasília, DF, 2014.

_____. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 75 de 02 de maio de 2016**. Brasília, DF, 2016.

BAHADIR, EB; SEZGINTÜRK, MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 286–316, 2016. [doi: 10.1016/j.trac.2016.06.006].

BARBOSA, JR et al. Performance of rapid diagnostic tests for detection of Hepatitis B and C markers in HIV infected patients. **Journal of Virological Methods**, v. 248, p. 244–249, 2017. [doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.001 PMID: 28782578].

BIO-MANGUINHOS. **Complexo industrial de biotecnologia em saúde: investindo na biotecnologia para desenvolvimento da saúde pública no Brasil**. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2016a.

_____. **Relatório de atividades 2015**. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2016b.

BLACKARD, JT et al. Acute hepatitis C virus infection: A chronic problem. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 321–331, 2007. [doi: 10.1002/hep.21902 PMID: 18161707. PMCID: PMC2277496].

BONACINI, M; LIN, HJ; HOLLINGER, B. Effect of coexisting HIV-1 infection on the diagnosis and evaluation of hepatitis C virus. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 26, n. 4, p. 340–4, 2001. [PMID: 11317075].

BRADA, D; ROTH, J. "Golden blot"--detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold complexes. **Analytical biochemistry**, v. 142, n. 1, p. 79–83, 1984. [PMID: 6083736].

BRAGA, ACS. **Regulação da expressão de proteínas de choque térmico pelo vírus da hepatite C**. [Doutorado em Microbiologia]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2017.

BRAGG, DA; CROWL, A; MANLOVE, E. Hepatitis C: A New Era. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 4, p. 631–642, 2017. [doi: 10.1016/j.pop.2017.07.006 PMID: 29132525].

BULTEEL, N et al. Factors associated with spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 2, p. 266–272, 2016. [doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.030 PMID: 27155531].

CASTRO, R et al. Chronic Hepatitis C: An Overview of Evidence on Epidemiology and Management from a Brazilian Perspective. **International Journal of Hepatology**, 2015. [doi: 10.1155/2015/852968 PMC4677022].

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **A Guide to Comprehensive Hepatitis C Counseling and Testing – in Public Health Settings**. Atlanta: CDC, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/Resources/Professionals/PDFs/CounselingandTesting.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2018.

_____. **Hepatitis C Questions and Answers for the Public**. Atlanta: CDC, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/cfaq.htm#overview>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

_____. **What is Viral Hepatitis?** Atlanta: CDC, 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/abc/index.htm>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

CHAMIE, G et al. Factors Associated with Seronegative Chronic Hepatitis C Virus Infection in HIV Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 4, p. 577–583, 2007. [PMID: 17243063].

CHEVALIEZ, S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 2, p. 116–121, 2011. [doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03418.x PMID: 21054664].

CHEVALIEZ, S; PAWLOTSKY, JM. HCV Genome and Life Cycle. In: SL, Tan (Org.). **Hepat. C Viruses Genomes Mol. Biol.** Norfolk (UK): Horizon Bioscience, 2006. p. 5–47. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1630>>. Acesso em: 27 mai. 2019.

CHOO, QL et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2451–2455, 1991. [PMCID: PMC51250].

CHOO, QL et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4902, p. 359–62, 1989. [PMID: 2523562].

COIMBRA, LD. **Padronização e aplicação do teste de avidéz anti-HCV IgG para confirmar exposição recente ao vírus da hepatite C.** [Mestrado em Medicina Tropical]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2016.

DA ROSA, L et al. Diagnostic performance of two point-of-care tests for anti-HCV detection. **Hepatitis Monthly**, v. 13, n. 9, p. e12274, 2013. [PMID: 24282422].

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2406–2415, 2007. [PMID: 17552023].

ECHEVERRÍA, N et al. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 6, p. 831–845, 2015. [PMID: 25937861].

FARES, RCG et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015. [PMID: 26413514].

FEINSTONE, SM et al. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. **New England Journal of Medicine**, v. 292, n. 15, p. 767–770, 1975. [PMID: 163436].

FERRERO, S et al. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: A 10-year survey (1990-2000). **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 82, n. 3, p. 229–234, 2003. [PMID: 12694118].

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.** Title 21, Part 58, 2016.

FOUNDATION FOR INNOVATIVE DIAGNOSTICS, CLINTON HEALTH ACCESS INITIATIVE (FIND/CHAI). **HCV Diagnostics Market Intelligence Report 2017: First Report on Screening and Diagnosis Market Growth**, 2017.

FISHER, D et al. Comparison of Rapid Point-of-Care Tests for Detection of Antibodies to Hepatitis C Virus. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, 2015. [PMID: 26269795].

FORSGREN, A; NORDSTRÖM, K. Protein A from *Staphylococcus aureus*: the biological significance of its reaction with IgG. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 236, n. 0, p. 252–66, 1974. [PMID: 4278611].

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Fundação** [sd]. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/fundacao>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

GE HEALTHCARE. **Recombinant protein purification handbook: principles and methods**. Björkgatan: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2009. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/promo_NOT_INDEXED/General_Information/1/ge-recombinant-protein-purification.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2019.

GUILLOU-GUILLEMETTE, HL et al. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2416–2426, 2007. [PMID: 17552024].

HAMES, BD. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.

HAN, JH et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 5, p. 1711–1715, 1991. [PMCID: PMC51094].

HE, LF et al. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. **The Journal of infectious diseases**, v. 156, n. 4, p. 636–40, 1987. [PMID: 3114389].

HEIAT, M; RANJBAR, R; ALAVIAN, SM. Classical and Modern Approaches Used for Viral Hepatitis Diagnosis. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 4, p. e17632, 2014. [doi: 10.5812/hepatmon.17632 PMID: 24829586. PMCID: PMC4006100].

HEIM, MH; THIMME, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S14–S25, 2014. [doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.035 PMID: 25443342].

HERMANSON, GT. Preparation of colloidal gold-labeled proteins. In: HERMANSON, Greg T. (Org.). . **Bioconjugate Tech.** 2. ed. New York (USA): Elsevier Academic Press, 2008. p. 924–935. [doi: 10.1016/B978-0-12-370501-3.00024-2].

HIJIKATA, M et al. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 175, n. 1, p. 220–8, 1991. [PMID: 1847805].

HONDA, M et al. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. **Virology**, v. 222, n. 1, p. 31–42, 1996. [PMID: 8806485].

HSIEH, HV; DANTZLER, JL; WEIGL, BH. Analytical Tools to Improve Optimization Procedures for Lateral Flow Assays. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, 2017. [PMID: 28555034].

INDOLFI, G; RESTI, M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 5, p. 836–843, 2009. [doi: 10.1002/jmv.21437 PMID: 19319981].

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL**. NIT-DICLA 035, 2018.

JONES, K; HOPKINS, A. Effects of adhesive migration in lateral-flow assays. **IVD Technology**, v. 6, n. 5, p. 57, 2000. Disponível em: <<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/00/09/006.html>>. Acesso em 3 fev. 2018.

JÚNIOR, JGS. **Eletroforese de proteínas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

KATO, N; HIJIKATA, M. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 24, p. 9524–8, 1990. [PMCID: PMC55204].

KHUROO, MS; KHUROO, NS; KHUROO, MS. Diagnostic Accuracy of Point-of-Care Tests for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121450, 2015. [PMCID: PMC4376712].

KOCZULA, KM; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 111–120, 2016. [doi: 10.1042/EBC20150012 PMID: 27365041. PMCID: PMC4986465].

KRUGMAN, S; GILES, JP; HAMMOND, J. Infectious Hepatitis. **JAMA**, v. 200, n. 5, p. 365–373, 1967. [doi: 10.1001/jama.1967.03120180053006 PMID: 4164595].

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970. [PMID: 5432063].

LAMEIRAS, AS. **Implantação dos itens da norma ABNT NBR ISO/IEC 17043 - Avaliação de Conformidade: Requisitos gerais para ensaio de proficiência na divisão de produção de painéis sorológicos de Bio-Manguinhos/Fiocruz**. [Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2017.

LANDIS, JR; KOCH, GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977. [PMID: 843571].

LAPERCHE, S et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3877–3883, 2005. [doi: 10.1128/JCM.43.8.3877-3883.2005 PMID: 16081925. PMCID: PMC1234013].

LAVANCHY, D. The global burden of hepatitis C. **Liver International**, v. 29, n. 1, p. 74–81, 2009. [doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01934.x PMID: 19207969].

LEUVERING, JHW et al. Sol Particle Immunoassay (SPIA). **Journal of Immunoassay**, v. 1, n. 1, p. 77–91, 1980. [doi: 10.1080/01971528008055777 PMID: 7014638].

LIMA, LFO. **Desenvolvimento e validação do potencial diagnóstico de antígenos recombinantes para a detecção da hepatite C**. [Doutorado em Biociências e Biotecnologia]. Curitiba: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas; 2017.

LINDENBACH, BD; RICE, CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933–938, 2005. [doi: 10.1038/nature04077 PMID: 16107832].

LYASHCHENKO, KP et al. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. **Journal of immunological methods**, v. 242, n. 1–2, p. 91–100, 2000. [PMID: 10986392].

MAKRIDES, SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews** v. 60, n. 3, p. 512-38, 1996. [PMID: 8840785].

MAMMAS, IN; SPANDIDOS, DA. The innovation of the subspecialty of Paediatric Virology: An interview with Research Professor of Molecular Virology Anna Kramvis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 4, p. 3335–3337, 2017. [doi: 10.3892/etm.2017.5008 PMID: 29042915. PMCID: PMC5639389].

MANNS, MP et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17006, 2017. [doi: 10.1038/nrdp.2017.6.10.1038/nrdp.2017.6].

MARTÍNEZ-BAUER, E et al. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 1, p. 20–27, 2008. [doi: 10.1016/j.jhep.2007.07.031 PMID: 17998149].

MARTINS, T; NARCISO-SCHIAVON, JL; SCHIAVON, LL. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2011. [doi: 10.1590/S0104-42302011000100024].

MDI (Advanced Microdevices Pvt. Ltd). **Polyester backed nitrocellulose membrane type CNPC**. Ambala Cantt: MDI, 2018. Disponível em: <www.mdimembrane.com>. Acesso em: 4 nov. 2018.

MESSINA, JP et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015. [doi: 10.1002/hep.27259 PMID: 25069599. PMCID: PMC4303918].

MEYER, D; ZEILEIS, A; HORNIK, K. **Visualizing Categorical Data**. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/vcd/vcd.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

MIKAWA, AY. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C.** [Doutorado em Análises Clínicas]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2006.

MILLER, RH; PURCELL, RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 6, p. 2057–2061, 1990. [PMCID: PMC53625].

MILLIPORE, EMD. **Rapid lateral flow test strips - Considerations for product development.** Billerica: Millipore, 2013. Disponível em: <https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201306.12550>. Acesso em: 23 jan. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais - 2018.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018a. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2018>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

_____. **Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/cibio_diretrizes_gerais_trabalho_contenc_ao_agentes_biologicos_3ed_.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2019.

_____. **Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018b. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2015/manual-tecnico-para-o-diagnostico-das-hepatites-virais>>. Acesso em: 4 fev. 2019.

_____. **O que são hepatites virais [sd].** Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-hepatites-virais>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

_____. **Portaria nº 1.376 de 19 de novembro de 1993. Diário Oficial da União.** Brasília, DF, 1993.

_____. **Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013. Diário Oficial da União.** Brasília, DF, 2013.

_____. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções: Relatório de Recomendação.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018c. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/atualizacao-do-pcdt-de-hepatite-c-e-coinfecoes>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

MORADPOUR, D; PENIN, F; RICE, CM. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. June, p. 453–463, 2007. [doi: 10.1038/nrmicro1645 PMID: 17487147].

MURPHY, DG et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from Central Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 967–972, 2015. [doi: 10.1128/JCM.02831-14 PMID: 25520447. PMCID: PMC4390628].

NETSKI, DM et al. Humoral Immune Response in Acute Hepatitis C Virus Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 667–675, 2005. [doi: 10.1086/432478 PMID: 16080089].

NEUMANN, AU et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5386, p. 103–7, 1998. [PMID: 9756471].

NIKOLAEVA, LI et al. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 9, n. 6, p. 429–437, 2002. [PMID: 12431205].

NUNES, PCG et al. 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, p. 329, 2019. [PMID: 30898104].

OFICINA SOBRE AS ESTRATÉGIAS DE AMPLIAÇÃO DO USO E DISTRIBUIÇÃO DOS TESTES RÁPIDOS DE HIV, SÍFILIS E HEPATITES B E C NO BRASIL, 3., 2019, Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/profissionais-de-saude/testes-rapidos>>. Acesso em: 26 mai. 2019.

OKAMOTO, H et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: Comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 11, p. 2697–2704, 1991. [doi: 10.1099/0022-1317-72-11-2697 PMID: 1658196].

OLIVEIRA, GM et al. Revisão sistemática da acurácia dos testes diagnósticos: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 2, p. 153–156, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912010000200013>>. Acesso em: 27 mai. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Combating hepatitis B and C to reach elimination by 2030**. Geneva: OMS, 2016a. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206453/1/WHO_HIV_2016.04_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 22 out. 2017.

_____. **First WHO prequalified hepatitis C rapid test opens the door to expanded treatment.** Geneva: OMS, 2018a. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/news/prequal_hvc/en/>. Acesso em: 25 out. 2018.

_____. **Global hepatitis report - infographics** [sd]. Disponível em: <<https://www.who.int/hepatitis/news-events/global-hepatitis-report2017-infographic/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

_____. **Global Hepatitis Report 2017.** Geneva: OMS, 2017a. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>> . Acesso em: 02 ago. 2017.

_____. **Guidance for procurement of in vitro diagnostics and related laboratory items and equipment.** Geneva: OMS, 2017b. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255577/9789241512558-eng.pdf;jsessionid=8BDB3B6B96F79F49E5794A31C28BA001?sequence=1>> . Acesso em: 29 mar. 2019.

_____. **Guidelines on hepatitis B and C testing.** Geneva: OMS, 2017c. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254621/1/9789241549981-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 22 out. 2017.

_____. **Hepatitis C** [2018b]. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

_____. **WHO Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection.** Geneva: OMS, 2016b. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615_eng.pdf?ua=1> . Acesso em: 14 out. 2017.

_____. **WHO list of prequalified in vitro diagnostic products.** Geneva: OMS, 2017d. Disponível em: <http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/171222_prequalified_product_list.pdf?ua=1>. Acesso em: 31 dez. 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Las hepatitis B y C bajo la lupa.** Washington: OPAS, 2016. Disponível em: <<http://>

iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31447/9789275319291-spa.pdf> .
Acesso em: 12 out. 2017.

PENIN, F et al. Structural Biology of Hepatitis C Virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5–19, 2004. [doi: 10.1002/hep.20032 PMID: 14752815].

PEREIRA, FM. **Avaliação da utilização do teste imunoblot Recombinante (RIBA) no diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em doadores de sangue com Anti-HCV reagente**. [Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa]. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; 2011.

PEREIRA, L et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 60, 2013. [PMID: 23374914].

PLOTZ, CM; SINGER, JM. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **The American journal of medicine**, v. 21, n. 6, p. 888–92, 1956. [PMID: 13372565].

POSTHUMA-TRUMPIE, GA; KORF, J; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569–582, 2009. [doi: 10.1007/s00216-008-2287-2 PMID: 18696055].

REHERMANN, B; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 215–229, 2005. [doi: 10.1038/nri1573 PMID: 15738952].

REIS, C et al. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, v. 29, p. 359–392, 2009. Disponível em: < <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2641> >. Acesso em: 27 mai. 2019.

RIBAS-SILVA, RC; EID, AA. Dengue antibodies in blood donors. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 193–195, 2012. [PMID: 23049418].

SAJID, M; KAWDE, A; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 689–705, 2015. [doi: 10.1016/j.jscs.2014.09.001].

SANTOS, MDC. **Caracterização genotípica dos vírus das hepatites B, C e Delta em cinco municípios do estado do Maranhão, Brasil**. [Doutorado em Biotecnologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

SCALIONI, LP et al. Performance of rapid hepatitis C virus antibody assays among high- and low-risk populations. **Journal of Clinical Virology**, v. 60, n. 3, p. 200–205, 2014. [doi: 10.1016/j.jcv.2014.04.001 PMID: 24794796].

SCHEIBLAUER, H et al. Evaluation of the performance of 44 assays used in countries with limited resources for the detection of antibodies to hepatitis C virus. **Transfusion**, v. 46, n. 5, p. 708–718, 2006. [PMID: 16686838].

SHIVKUMAR, S et al. Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 8, p. 558–566, 2012. [doi: 10.7326/0003-4819-157-8-201210160-00006 PMID: 23070489].

SILLANPÄÄ, M et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. **Virology Journal**, v. 6, n. 84, p. 1–12, 2009. [doi: 10.1186/1743-422X-6-84 PMID: 19549310. PMCID: PMC2709157].

SIMMONDS, P et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962–973, 2005. [doi: 10.1002/hep.20819 PMID: 16149085].

_____. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3173–3188, 2004. [doi: 10.1099/vir.0.80401-0 PMID: 15483230].

_____. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000672>> . Acesso em: 25 out. 2018.

_____. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 1053–1061, 1994. [doi: 10.1099/0022-1317-75-5-1053 PMID: 8176367].

_____. Variability of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 21, n. 2, p. 570–83, 1995. [PMID: 7531173].

SIQUEIRA, CS. **Desenvolvimento de teste rápido para sífilis utilizando proteínas treponêmicas no Brasil**. [Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos; 2017.

SMITH, BD et al. Performance of premarket rapid hepatitis C virus antibody assays in 4 national human immunodeficiency virus behavioral surveillance system sites. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 8, p. 780–786, 2011. [PMID: 21921221].

SMITH, DB et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014. [doi: 10.1002/hep.26744 PMID: 24115039. PMCID: PMC4063340].

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. Recomendações das Sociedades Brasileiras de Hepatologia (SBH) e Infectologia (SBI) para o tratamento da hepatite C no Brasil com novos medicamentos antivirais de ação direta (DAAs). **Braz J Infect Dis**, 2016. Disponível em: <<http://www.bjid.org.br/en-consenso-recomendacoes-das-sociedades-brasileiras-articulo-resumen-X1413867015518989>>. Acesso em: 25 out. 2018.

SOUZA, IO. **Validação de Ensaio Imunocromatográfico para a detecção Múltipla de Anticorpos Específicos Contra HIV, HBV e HCV**. [Mestrado em Biotecnologia]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2011.

STEINHAEUER, DA; DOMINGO, E; HOLLAND, JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. **Gene**, v. 122, n. 2, p. 281–8, 1992. [doi: 10.1016/0378-1119(92)90216-C PMID:1336756].

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69–82, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n1/4321.pdf>> Acesso em: 27 mai. 2019.

STUMPF, MPH; PYBUS, OG. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. **FEMS microbiology letters**, v. 214, n. 2, p. 143–52, 2002. [PMID: 12351222].

TAKAMIZAWA, A et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **Journal of virology**, v. 65, n. 3, p. 1105–13, 1991. [PMID: 1847440].

TANAKA, T et al. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. **J Virol**, v. 70, n. 5, p. 3307–3312, 1996. [PMCID: PMC190199].

TANG, W et al. Diagnostic accuracy of tests to detect Hepatitis C antibody: A meta-analysis and review of the literature. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. Suppl 1, p. 695, 2017. [PMID: 29143615].

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Protein expression handbook: Recombinant protein expression and purification technologies**. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2015. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-expression-handbook.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

TREVISOL, IM. Sistema Imune das aves. **Avicultura Industrial**, 2016. Disponível em: <<https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/sistema-imune-das-aves/20080911-111208-3311>>. Acesso em: 7 abr. 2019.

VAN DER MEER, AJ; BERENQUER, M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 1, p. S95–S108, 2016. [doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.039 PMID: 27641991].

VILLAR, LM et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. **World Journal of Virology**, v. 4, n. 4, p. 323–342, 2015. [doi: 10.5501/wjv.v4.i4.323 PMID: 26568915. PMCID: PMC4641225].

WALTHER, M; FRISSE, A. **A Guide to Diagnostic Rapid Test Development**. 1st ed. Dassel: Whatman, 2008.

WONG, NS et al. Prevalence of hepatitis C infection and its associated factors in healthy adults without identifiable route of transmission. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 25, n. 2, p. 161–170, 2018. [PMID: 29032634].

WONG, RC; TSE, H. **Lateral Flow Immunoassay**. 1st ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-240-3>>. Acesso em: 31 out. 2018.

YEUNG, CY et al. Vertical transmission of hepatitis C virus: current knowledge and perspectives. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 9, p. 643–651, 2014. [PMCID: PMC4179143].

ZELTINS, A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. **Molecular of Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 92-107, 2013. [doi: 10.1007/s12033-012-9598-4 PMID: 23001867].

9 ANEXOS

9.1 TR HIV EM AMOSTRAS POSITIVAS (AEQ E CLÍNICAS) PARA HCV

Amostra	TR HIV						
10b2	N1	39b5	N1	10	N1	400	P3
10b3	N1	3b2	N1	13	N1	404	N1
11b2	N1	3b3	N1	14	N1	422	N1
11b6	N1	3b5	N1	16	P2	443	N1
12e1	N1	40b1	N1	20	N1	481	N1
13b4	N1	40b2	N1	24	N1	491	N1
14b5	N1	40b6	N1	40	N1	500	N1
15b1	N1	41b3	N1	42	N1	507	N1
15b3	N1	42b2	N1	44	N1	510	P3
15b4	N1	42b5	N1	59	N1	535	N1
16b2	N1	43b1	N1	79	N1	553	N1
17b4	N1	43b6	N1	87	N1	627	N1
18b3	N1	44b3	N1	105	N1	677	N1
19b4	N1	44b6	N1	106	N1	695	N1
20b1	N1	45b2	N1	109	N1	699	N1
21b6	N1	45b4	N1	114	N1	712	N1
22b3	N1	45b5	N1	115	N1	714	N1
22b5	N1	46b3	N1	118	N1	717	N1
23b1	N1	47b1	N1	122	N1	730	N1
23b6	N1	47b5	N1	146	N1	738	N1
24b1	N1	47b6	N1	150	N1	770	N1
25b3	N1	4b1	N1	178	N1	771	N1
26b1	N1	4b2	N1	192	N1	794	N1
2b1	N1	4b5	N1	196	N1	815	N1
2b2	N1	5b1	N1	221	N1	823	N1
2b5	N1	5b2	N1	224	N1	850	N1
33b3	N1	6b5	N1	232	N1	939	N1
34b6	N1	6b6	N1	239	N1	946	N1
35b1	N1	7b3	N1	262	N1	954	N1
35b5	N1	7b4	N1	292	N1	958	N1
37b2	N1	8b5	N1	312	N1	965	N1
37b6	N1	8b6	N1	353	N1	968	N1
38b1	N1	9b1	N1	357	N1	970	N1
38b3	N1	3	N1	368	N1	985	N1
39b1	N1	4	N1	397	N1	989	N1

Continua

Continuação

Amostra	TR HIV	Amostra	TR HIV	Amostra	TR HIV
995	P2	1885	N1	2707	N1
998	N1	1903	P2	2722	N1
1003	N1	1929	N1	2745	N1
1005	N1	1945	N1	2798	N1
1010	N1	1980	N1	2818	N1
1039	N1	2004	N1	2835	N1
1055	N1	2006	N1	2836	N1
1081	N1	2024	P3	3045	N1
1087	N1	2025	N1	3046	N1
1108	N1	2051	N1	3135	N1
1126	N1	2088	N1	3161	N1
1146	P2	2090	N1	3254	N1
1147	N1	2118	N1	3310	N1
1214	N1	2137	N1	3323	N1
1240	N1	2144	N1	3407	N1
1250	N1	2146	N1	4000	N1
1285	N1	2151	N1	4020	N1
1296	P3	2153	N1	4070	N1
1327	P3	2200	N1	4111	N1
1383	N1	2239	N1	4192	N1
1384	N1	2257	N1	4202	N1
1393	P3	2287	N1	4288	N1
1414	N1	2298	N1	4450	P2
1421	N1	2300	N1	4473	N1
1497	P3	2315	N1	4565	N1
1523	P3	2358	N1	4570	N1
1531	N1	2410	N1		
1555	N1	2420	N1		
1572	N1	2476	N1		
1578	N1	2526	P3		
1586	N1	2532	N1		
1589	N1	2535	N1		
1605	N1	2545	N1		
1625	N1	2665	N1		
1683	N1	2683	N1		

Amostras positivas para HCV: (AEQ e clínica).

Em vermelho: amostras positivas para HIV.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), N1 (negativo absoluto).

9.2 EIE DENGUE EM AMOSTRAS CLÍNICAS NEGATIVAS PARA HCV

Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG	Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG	Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG
1	NR	NR	40	NR	NR	79	NR	FC
2	NR	NR	41	NR	NR	80	NR	NR
3	NR	NR	42	NR	NR	81	NR	NR
4	NR	NR	43	NR	NR	82	NR	FC
5	NR	NR	44	NR	NR	83	NR	NR
6	NR	NR	45	NR	NR	84	NR	FC
7	NR	NR	46	NR	R	85	NR	NR
8	NR	R	47	NR	NR	86	NR	FC
9	NR	NR	48	NR	NR	87	NR	FC
10	NR	NR	49	NR	NR	88	NR	NR
11	R	NR	50	NR	R	89	NR	NR
12	NR	NR	51	NR	NR	90	NR	FC
13	NR	NR	52	NR	NR	91	NR	NR
14	NR	NR	53	NR	R	92	NR	NR
15	NR	NR	54	NR	NR	93	NR	NR
16	NR	R	55	NR	NR	94	NR	NR
17	NR	NR	56	NR	NR	95	NR	NR
18	NR	R	57	NR	NR	96	NR	NR
19	NR	NR	58	NR	NR	97	NR	NR
20	NR	R	59	NR	NR	98	NR	NR
21	NR	NR	60	NR	NR	99	NR	NR
22	NR	NR	61	NR	NR	100	NR	R
23	NR	NR	62	NR	NR	101	NR	R
24	NR	NR	63	NR	NR	102	NR	R
25	NR	NR	64	NR	NR	103	NR	FC
26	NR	NR	65	NR	NR	104	NR	FC
27	NR	NR	66	NR	NR	105	R/R	NR
28	NR	NR	67	NR	NR	106	NR	R
29	NR	NR	68	NR	NR	107	NR	FC
30	NR	NR	69	NR	NR	108	NR/R	NR
31	NR	NR	70	NR	NR	109	NR	NR
32	NR	NR	71	NR	R	110	NR	R
33	NR	R	72	NR	NR	111	R	NR
34	NR	R	73	NR	R	112	NR	NR
35	NR	NR	74	NR	FC	113	NR	FC
36	NR	NR	75	NR	R	114	R/R	NR
37	NR	NR	76	NR	FC	115	NR	NR
38	NR	NR	77	NR	NR	116	NR	NR
39	NR	NR	78	NR	FC	117	NR	FC

Continua

Continuação

Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG	Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG	Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG
118	NR	NR	157	NR	NR	196	NR	NR
119	NR	NR	158	NR	FC	197	NR	NR
120	NR	NR	159	NR	NR	198	NR	NR
121	NR	R	160	NR	NR	199	NR	NR
122	NR	NR	161	NR	NR	200	NR	NR
123	NR	R	162	NR	NR	201	NR	R
124	NR	FC	163	NR	FC	202	NR	NR
125	R/R	NR	164	NR	NR	203	NR	FC
126	NR	FC	165	NR	R	204	NR	NR
127	NR	NR	166	NR	NR	205	NR	NR
128	NR	NR	167	NR	NR	206	NR	R
129	NR	R	168	NR	NR	207	NR	NR
130	NR	NR	169	NR	NR	208	NR	NR
131	NR	NR	170	NR	NR	209	NR	NR
132	NR	NR	171	NR	R	210	NR	R
133	NR	NR	172	NR	NR	211	NR	NR
134	NR	NR	173	NR	R	212	NR	NR
135	NR	NR	174	NR	NR	213	NR	NR
136	NR	NR	175	NR	NR	214	R	R
137	NR	NR	176	NR	NR	215	NR	NR
138	NR	NR	177	NR	NR	216	NR	NR
139	NR	NR	178	NR	NR	217	NR	NR
140	NR	NR	179	NR	R	218	NR	NR
141	NR	NR	180	NR	NR	219	NR	NR
142	NR	NR	181	NR	R	220	NR	NR
143	NR	NR	182	NR	NR	221	NR	R
144	NR	NR	183	NR	NR	222	NR	NR
145	NR	NR	184	NR	R	223	NR	NR
146	NR	R	185	NR	FC	224	NR	NR
147	NR	R	186	NR	NR	225	NR	FC
148	NR	NR	187	NR	NR	226	NR	NR
149	NR	R	188	NR	NR	227	NR	NR
150	NR	R	189	NR	R	228	NR	NR
151	NR	NR	190	NR	NR	229	NR	NR
152	NR	R	191	FC	R	230	NR	NR
153	NR	R	192	NR	NR	231	R	R
154	NR	NR	193	NR	FC	232	NR	NR
155	NR	NR	194	R	NR	233	NR	NR
156	NR	NR	195	NR	R	234	NR	NR

Continua

Continuação

Amostra	Dengue IgM	Dengue IgG
235	NR	R
236	NR	NR
237	NR	R
238	NR	NR
239	NR	NR
240	NR	NR
241	NR	NR
242	NR	NR
243	NR	NR
244	NR	R
245	NR	NR
246	NR	NR
247	NR	FC
248	NR	NR
249	NR	NR
250	NR	R
251	NR	FC
252	NR	R
253	NR	R
254	NR	NR
255	NR	R
256	NR	R
258	NR	R
259	NR	NR
260	NR	NR
261	NR	NR
262	NR	NR
263	NR	NR
264	NR	FC
265	NR	R
266	NR	R

Amostras negativas clínicas para HCV.

R: Reagente.

NR: Não Reagente.

FC: Faixa Cinza.

Amostras excluídas do estudo.

9.3 RESULTADOS DO TR 09 (PRÉ-LOTE) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE A

TR 09			
Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura
2b1	P1	28	N2
2b2	P1	29	N1
3b5	P1	30	N1
4b1	P1	31	N1
4b2	P3	32	N1
5b1	P2	35	N1
5b2	P1	36	N1
7b4	P1	37	N1
8b5	N2/P1	38	N1
8b6	P1	39	N1
9b1	P2	40	N1
10b2	P1	41	N1
10b3	N2/P1	42	N1
11b2	P1	43	N1
12e1	N1	44	N1
13b4	P1	45	N1
14b5	P2	47	N1
15b1	P3	48	N1
15b3	P1	49	N1
15b4	P2	51	N1
16b2	N2	52	N1
17b4	P1	54	N2
18b3	P1	55	N1
19b4	P2	56	N1
20b1	P1	57	N1
21b6	P2	58	N1
22b3	P2	59	N1
22b5	P1	60	N1
23b1	P3	61	N1
23b6	P1	62	N1
24b1	P1	63	N1
25b3	P1	64	N1
26b1	P3	65	N1
33b3	P3	66	N1
34b6	P3	67	N1
35b1	N1	68	N1
35b5	P2	69	N1
37b2	P2	70	N1
37b6	P1	72	N1

Continua

Continuação

Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura
38b1	P1	77	N1
38b3	P3	80	N1
39b1	P1	81	N1
39b5	P1	83	N1
40b1	N2	85	N1
40b2	P3	88	N1
40b6	P2	89	N1
41b3	P3	91	N1
42b2	N1	92	N1
42b5	P2	93	N1
43b1	P1	94	N1
43b6	P1	95	N1
44b3	P2	96	N1
44b6	P2	97	N1
45b2	P2	98	N1
45b4	P3	99	N1
45b5	P3	142	N1
46b3	P3		
47b1	P2		
47b5	P2		
47b6	P2		

116 amostras: 60 amostras AEQ positivas para HCV e 56 amostras clínicas negativas para HCV.

Azul: falso-negativo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

9.4 RESULTADOS DO TR 10 (LOTE FINAL) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE A

TR 10					
Amostra +	Leitura	Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura
3	P1	2257	P1	109	N1
4	P1	2287	N2/P1	112	N1
40	N2/P1	2298	P1	115	N1
44	P2	2358	P3	116	N1
59	P3	2410	P3	118	N1
79	P2	2420	P3	119	N1
114	P3	2476	P1	120	N1
178	P1	2526	P3	122	N1
192	P3	2532	P1	127	N1
196	P3	2535	P2	128	N1
221	N1	2545	P3	130	N1
224	N2/P1	2683	P2	131	N1
232	P3	2707	P3	132	N2
262	P2	2745	P3	133	N1
292	P3	2798	P3	134	N1
357	P2	2835	P1	135	N1
368	P3	2836	P2	136	N1
400	P2	2818	P3	137	N1
443	P2	3045	P2	138	N1
507	P1	4288	N1	139	N1
510	P1	2665	P2	140	N1
535	P3	2144	P1	141	N1
553	P1	2151	P2	143	N1
627	P1	2239	P1	144	N1
677	P1	2300	N1	145	N1
695	P1	2315	N2	148	N1
699	P1	2722	P3	151	N1
712	P3	3046	P2	154	N1
717	P1	3135	N1	155	N1
730	P1	3161	P3	156	N1
738	P2	4000	P2	157	N1
770	N2	3407	P1	159	N1
771	P2	3323	N2/P1	160	N1
794	P1	3310	P3	161	N1
815	P2	3254	P2	162	N1
850	P2	4020	P3	164	N1
939	N2/P1	4070	P2	166	N1
946	P1	4111	P3	167	N1
958	N2/P1	4192	P3	168	N1
985	N2/P1	4202	P2	169	N1

Continua

Continuação

Amostra +	Leitura	Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura
989	N2/P1	4450	P3	170	N1
995	P3	4473	P3	172	N1
1087	P2	4565	P3	174	N1
1126	N2	4570	P3	175	N1
1146	N2/P1	954	P1	176	N1
1214	P3	965	P2	177	N1
1240	P1	968	P1	178	N1
1250	P2	970	P2	180	N1
1285	N2	1147	P3	182	N1
1296	P2	998	P1	183	N1
1327	P3	1005	P3	186	N1
1383	P1	1010	P2	187	N1
1384	P3	1039	P2	188	N1
1393	P2	1055	P1	190	N1
1414	N2/P1	150	P1	192	N1
1421	P2	422	P1	196	N1
1497	P1	714	P1	197	N1
1523	P2	823	P3	198	N1
1531	P1	1003	P2	199	N1
1555	P3	239	P1	200	N1
1572	P3	353	P1	202	N1
1578	P2	481	P1	204	N1
1586	P1	1081	P1	205	N1
1589	P1	1108	P2	207	N1
1605	P2	10	P3	208	N1
1625	P3	14	P1		
1683	P2	24	P2		
1885	P3	105	P2		
1903	P3	491	P2		
1929	P3	87	P2		
1945	P1	397	P3		
1980	P2	20	P3		
2004	P1	404	P2		
2006	P2	500	P2		
2024	N1	106	P3		
2025	N1	13	P3		
2051	P3	16	P2		
2088	N1	146	P1		
2090	P3	122	P3		
2200	N2/P1	312	P1		
2153	P1	42	P1		
2146	P1	118	P3		
2137	P1	115	P3		
2118	P3	109	P1		

133 amostras: 168 amostras clínicas positivas para HCV (+) e 65 amostras clínicas negativas para HCV (-). Azul: falso-negativo. P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

9.5 RESULTADOS DO TR 05 PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE D

TR 05							
Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura	Amostra -	Leitura	Amostra -	Leitura
4b5+	N2/P1	51-	P1	82-	N1	113-	N2
10b3+	P2	52-	N2/P1	83-	N1	114-	N2
8b6+	P1	53-	N1	84-	N1	115-	N1
35b5+	P3	54-	P1	85-	N1	116-	N2
40b1+	N2/P1	55-	N1	86-	N2/P1	117-	N1
8b5+	N2/P1	56-	N1	87-	N2	118-	N2
42b2+	N2/P1	57-	N1	88-	N1	119-	N1
35b1+	N2	58-	N1	89-	N1	120-	N1
16b2+	N1	59-	N1	90-	N1	121-	N2/P1
12e1+	P2	60-	N1	91-	N1	122-	N1
11b6+	P2	61-	N1	92-	N1	123-	N1
		62-	N1	93-	N1	124-	N2/P1
		63-	N1	94-	N1	131-	N1
		64-	N2/P1	95-	N1	132-	N2
		65-	N1	96-	N1	133-	N2
		66-	P1	97-	N2	134-	N2
		67-	N1	98-	N1	135-	N2
		68-	N1	99-	N2	136-	N1
		69-	N1	100-	N2	137-	N2
		70-	N1	101-	N1	138-	N1
		71-	N1	102-	N2	139-	N2/P1
		72-	N1	103-	N2/P1	140-	N2
		73-	N1	104-	N1	141-	N2
		74-	N1	105-	N1	142-	N1
		75-	N1	106-	N1	143-	N1
		76-	N2/P1	107-	N2	144-	N2/P1
		77-	N1	108-	N1	145-	N2
		78-	N1	109-	N1	146-	N1
		79-	N1	110-	N1	147-	N1
		80-	N2	111-	N1	148-	N1
		81-	N1	112-	N1	149-	P1
						150-	N2/P1

105 amostras: 11 amostras AEQ positivas para HCV (+) e 94 amostras clínicas negativas para HCV (-).

Azul: falso-negativo.

Vermelho: falso-positivo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

9.6 RESULTADOS DO TR 07 (PRÉ-LOTE) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE E

TR 07			
Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura
2b1	P3	1	N1
2b2	P2	2	N1
3b5	P1	3	N1
4b1	N1	4	N1
4b2	P3	5	N1
5b1	P1	6	N1
5b2	P2	7	N1
7b4	N2/P1	9	N1
8b5	P1	10	N1
8b6	N2/P1	12	N1
9b1	P2	13	N1
10b2	P1	14	N1
10b3	P1	15	N1
11b2	P1	17	N1
11b6	P3	19	N1
12e1	P1	21	N1
13b4	N2/P1	22	N1
14b5	P2	23	N1
15b1	P3	24	N1
15b3	P2	25	N1
15b4	P2	26	N1
16b2	N2	27	N1
17b4	P1	28	N1
18b3	P2	29	N1
19b4	P3	30	N1
20b1	N2/P1	31	N1
21b6	P1	32	N1
22b3	P2	35	N1
22b5	P2	36	N1
23b1	P3	37	N1
23b6	P3	38	N1
24b1	P1	39	N1
25b3	P1	40	N1
26b1	P2	41	N1
33b3	N2/P1	42	N1
34b6	P3	43	N1
35b1	N2/P1	44	N1
35b5	P3	45	N1
37b2	P3	47	N1

Continua

Continuação

Amostra +	Leitura	Amostra -	Leitura
37b6	P2	48	N1
38b1	P1	49	N1
38b3	P3	51	N1
39b1	P2	52	N1
39b5	P1	54	N1
40b1	P1	55	N1
40b2	P3	56	N1
40b6	P2	57	N1
41b3	P3	58	N1
42b2	N2/P1	59	N1
42b5	P2	60	N1
43b1	P1	61	N1
43b6	P1	62	N1
44b3	P2	63	N1
44b6	P2	64	N1
45b2	P2	65	N1
45b4	P3	66	N1
45b5	P3	67	N1
46b3	P3	68	N1
47b1	P3	69	N1
47b5	P3	70	N1
47b6	P2	72	N1
		77	N1
		80	N1

124 amostras: 61 amostras AEQ positivas para HCV (+) e 63 amostras clínicas negativas para HCV (-).

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

9.7 RESULTADOS DO TR 08 (LOTE FINAL) PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE E

TR 08					
Amostra +	Leitura	Amostra +	Leitura	Amostra +	Leitura
3	P3	1497	P2	3135	P1
4	P2	1523	P2	3161	P3
40	P2	1531	P1	4000	P3
44	P2	1555	P3	3407	P1
59	P3	1572	P3	3323	P2
79	P2	1578	P3	3310	P3
114	P2	1586	P2	3254	P1
178	P2	1589	P2	4020	P3
192	P3	1605	P2	4070	P2
196	P3	1625	P3	4111	P3
221	P1	1683	P2	4192	P3
224	P1	1885	P3	4202	P3
232	P3	1903	P3	4450	P3
262	P2	1929	P3	4473	P3
292	P3	1945	P1	4565	P3
357	P3	1980	P2	4570	P3
368	P3	2004	P2	954	P2
400	P3	2006	P3	965	P3
443	P2	2024	P2	968	P2
507	P2	2025	N2	970	P3
510	P2	2051	P3	1147	P3
535	P3	2088	P1	998	P1
553	P2	2090	P3	1005	P2
627	P1	2200	P2	1010	P3
677	P2	2153	P3	1039	P3
695	P3	2146	P1	1055	P1
699	P1	2137	P3	150	P3
712	P3	2118	P3	422	P2
717	P2	2257	P3	714	P1
730	P2	2287	P1	823	P3
738	P2	2298	P2	1003	P3
770	N1	2358	P1	239	P1
771	P3	2410	P3	353	P3
794	P2	2420	P3	481	P3
815	P2	2476	P1	1081	P3
850	P3	2526	P2	1108	P2
939	P1	2532	P1	10	P3

Continua

Continuação

Amostra +	Leitura	Amostra +	Leitura	Amostra +	Leitura
946	P1	2535	P2	14	P2
958	P2	2545	P3	24	P3
985	P1	2683	P3	105	P2
989	P1	2707	P2	491	P2
995	P3	2745	P3	87	P3
1087	P3	2798	P3	397	P3
1126	P1	2835	P3	20	P3
1146	P1	2836	P2	404	P3
1214	P3	2818	P3	500	P3
1240	P2	3045	P1	106	P3
1250	P3	4288	N1	13	P3
1285	P1	2665	P1	16	P2
1296	P3	2144	P1	146	P2
1327	P3	2151	P3	122	P3
1383	P2	2239	P1	312	P2
1384	P3	2300	P3	42	P2
1393	P3	2315	P1	118	P3
1414	P1	2722	P3	115	P3
1421	P3	3046	P3	109	P1

168 amostras clínicas positivas para HCV (+).

Azul: falso-negativo.

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

TR 08			
Amostra -	Leitura	Amostra -	Leitura
81	N1	176	N1
83	N1	177	N1
85	N1	178	N1
88	N1	180	N1
89	N1	182	N1
91	N1	183	N1
92	N1	186	N1
93	N1	187	N1
94	N1	188	N1
95	N1	190	N1
96	N1	192	N1
97	N1	196	N1
98	N1	197	N1
99	N1	198	N1
109	N2	199	N1
112	N1	200	N1
115	N1	202	N1
116	N1	204	N1

Continua

Continuação

Amostra -	Leitura	Amostra -	Leitura
118	N1	205	N1
119	N1	207	N1
120	N1	208	N1
122	N1	209	N1
127	N1	211	N1
128	N1	212	N1
130	N1	213	N1
131	N1	215	N1
132	N2	216	N1
133	N1	217	N1
134	N1	218	N1
135	N1	219	N1
136	N1	220	N1
137	N1	222	N1
138	N1	223	N1
139	N1	224	N1
140	N1	226	N1
141	N1	227	N1
142	N1	228	N1
143	N1	229	N1
144	N1	230	N1
145	N1	232	N1
148	N1	233	N1
151	N1	234	N1
154	N1	236	N1
155	N1	238	N1
156	N1	239	N1
157	N1	240	N1
159	N1	241	N1
160	N1	242	N1
161	N1	243	N1
162	N1	245	N1
164	N1	246	N1
166	N1	248	N1
167	N1	249	N1
168	N1	254	N1
169	N1	259	N1
170	N1	260	N1
172	N1	261	N1
174	N1	262	N1
175	N1	263	N1

118 amostras clínicas negativas para HCV (-).
 N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

9.8 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS REAÇÕES CRUZADAS COM DIFERENTES DOENÇAS

HIV	TR	HBV	TR	Sífilis	TR	Chagas	TR	HTLV	TR	Zika	TR	Dengue	TR
26a1	N2	34b3	N1	7c5	N1	4a1	N1	4a3	N1	2a	N1	5a	N1
28a3	N1	33b6	N1	7c3	N1	4a2	N1	4a4	N1	13a	N1	9a	N1
30a2	N1	33b1	N1	6c2	N1	6a5	N1	5a5	N1	37a	N1	40a	N1
29a2	N1	34b5	N1	6c3	N1	7a6	N1	5a6	N1	38a	N1	27a	N1
12d4	N1	34b3	N1	6c4	N1	8a4	N1	6a2	N1	46a	N2	32a	N1
10a2	N1	35b2	N1	6c5	N1	9a4	N1	6a6	N1	62a	N1	21a	N1
12d3	N1	35b3	N1	8c2	N1	9a5	N1	7a2	N1	74a	N1	22a	N1
10a1	N1	35b6	N1	10c3	N1	10a5	N1	7a5	N1	78a	N1	12a	N1
9a2	N1	30b5	N1	12f3	N1	15a2	N1	8a3	N1	87a	N2	43a	N1
9a3	N1	27b1	N1	14c5	N2	15a4	N1	8a5	N1	85a	N1	11a	N1

N1 (negativo absoluto).

9.9 TR HCV: WAMA IMUNO-RÁPIDO HCV

Amostras	Sexo	Idade (anos)	Carga Viral UI/mL	Carga Viral Log (UI/mL)	Genótipo	Resultado TR Wama HCV
998	NI	NI	14.949.905	7,17	1a	Reagente*
1005	NI	NI	1.567.334	6,2	1a	Reagente*
1039	NI	NI	9.377.613	6,97	1a	Reagente*
1010	NI	NI	96.812	4,99	1a	Reagente*
1055	NI	NI	555.550	5,74	1a	Reagente*
954	NI	NI	3.165.864	6,5	1a	Reagente*
1147	NI	NI	35.779	4,55	1a	Reagente*
714	NI	NI	291.920	5,47	1b	Reagente*
1003	NI	NI	331.552	5,52	1b	Reagente*
970	NI	NI	70.286	4,85	1b	Reagente*
965	NI	NI	809.039	5,91	1b	Reagente*
968	NI	NI	579.244	5,76	1b	Reagente*
1081	NI	NI	3.347.163	6,52	1b	Reagente*
1108	NI	NI	121.813	5,09	1b	Reagente*
481	NI	NI	7.280.192	6,86	3	Reagente*
239	NI	NI	169.496	5,23	3	Reagente*
353	NI	NI	60.553	4,78	3	Reagente*
150	NI	NI	100.801	5	3	Reagente*
422	NI	NI	145.498	5,16	3	Reagente*
823	NI	NI	57.170	4,76	3	Reagente*
2144	M	68	213.977	5,33	NI	Reagente forte
2151	F	55	918.892	5,96	NI	Reagente forte
2239	F	60	5.811.949	6,76	NI	Reagente fraco
2300	M	66	945.136	5,98	NI	Reagente fraco
2315	F	31	1.243.757	6,09	NI	Reagente forte
2722	F	57	16.970	4,23	NI	Reagente forte
3045	M	57	1.242.164	6,09	NI	Reagente forte
3046	F	73	880.897	5,94	NI	Reagente forte
3135	M	56	287.315	5,46	NI	Reagente fraco
3161	F	35	168.082	5,23	NI	Reagente forte
3254	F	70	10.678.431	7,03	NI	Reagente fraco
3310	M	69	176	2,25	NI	Reagente forte
3323	M	62	969.876	5,99	NI	Reagente fraco
3407	F	43	198.228	5,3	NI	Reagente fraco
4000	F	27	173.271	5,24	NI	Reagente forte
4020	F	63	1.626.048	6,21	NI	Reagente forte
4070	M	68	5.335.391	6,73	NI	Reagente forte

Continua

Continuação

Amostras	Sexo	Idade (anos)	Carga Viral UI/mL	Carga Viral Log (UI/mL)	Genótipo	Resultado TR Wama HCV
4111	F	56	138.131	5,14	NI	Reagente forte
4192	F	70	2.256.716	6,35	NI	Reagente forte
4202	F	67	291.688	5,46	NI	Reagente forte
4288	M	60	9.496.165	6,98	NI	Reagente fraco
4450	M	46	47.577	4,68	NI	Reagente forte
4473	M	56	60	1,78	NI	Reagente forte
4565	F	20	120.843	5,08	NI	Reagente forte
4570	M	63	1.480.444	6,17	NI	Reagente fraco
3	F	33	3.334.779	6,52	NI	Reagente forte
4	F	37	996.726	6	NI	Reagente forte
40	F	68	2.292.418	6,36	NI	Reagente fraco
44	M	60	3.476.586	6,54	NI	Reagente forte
59	F	60	133.175	5,12	NI	Reagente forte
79	F	66	5.272.445	6,72	NI	Reagente forte
114	F	34	1.426.818	6,15	NI	Reagente fraco
178	F	63	938.654	5,97	NI	Reagente fraco
192	F	44	568.536	5,75	NI	Reagente forte
196	F	34	516.414	5,71	NI	Reagente forte
221	F	74	20.362.062	7,31	NI	Reagente fraco
224	M	40	119	2,07	NI	Reagente forte
232	F	27	1.729.733	6,24	NI	Reagente forte
262	F	37	1.073.886	6,03	NI	Reagente forte
292	F	48	48.291	4,68	NI	Reagente forte
357	F	41	87.160	4,94	NI	Reagente forte
368	F	58	754.534	5,88	NI	Reagente forte
400	M	35	362.518	5,56	NI	Reagente forte
443	F	56	18	1,26	NI	Reagente forte
507	M	65	1.528.401	6,18	NI	Reagente fraco
510	F	60	3.054.221	6,48	NI	Reagente forte
535	F	56	22.428	4,35	NI	Reagente forte
553	F	81	1.126.138	6,05	NI	Reagente forte
627	M	60	409.626	5,61	NI	Reagente forte
677	F	56	13	1,13	NI	Reagente forte
695	F	47	22	1,34	NI	Reagente forte
699	M	76	153	2,18	NI	Reagente fraco
712	F	58	73.557	4,87	NI	Reagente forte
717	M	61	882.014	5,95	NI	Reagente forte
730	F	46	4.620.712	6,66	NI	Reagente fraco
738	F	60	2,071	3,32	NI	Reagente forte
770	F	56	39	1,59	NI	Reagente fraco
771	F	42	1.172.945	6,07	NI	Reagente forte
794	M	68	13	1,12	NI	Reagente forte
815	F	60	5.150.765	6,71	NI	Reagente forte

Continua

Continuação

Amostras	Sexo	Idade (anos)	Carga Viral UI/mL	Carga Viral Log (UI/mL)	Genótipo	Resultado TR Wama HCV
850	F	41	401.370	5,6	NI	Reagente forte
939	F	80	14	1,14	NI	Reagente fraco
946	F	21	336.180	5,53	NI	Reagente fraco
958	F	40	1.362	3,13	NI	Reagente fraco
985	M	56	1.004.701	6	NI	Reagente fraco
989	M	69	1.018.811	6,01	NI	Reagente forte
995	M	45	74.029	4,87	NI	Reagente forte
1087	F	54	38	1,57	NI	Reagente fraco
1126	F	45	82	1,91	NI	Reagente fraco
1146	M	48	1.246.777	6,10	NI	Reagente forte
1214	F	64	541.710	5,73	NI	Reagente forte
1240	F	69	4.089.491	6,61	NI	Reagente fraco
1250	F	71	97	1,99	NI	Reagente forte
1285	F	73	326.240	5,51	NI	Reagente fraco
1296	F	62	93.434	4,97	NI	Reagente forte
1327	M	48	2.838	3,45	NI	Reagente forte
1383	F	26	1.092.420	6,04	NI	Reagente fraco
1384	F	62	297	2,47	NI	Reagente forte
1393	M	39	1.493.309	6,17	NI	Reagente forte
1414	F	33	4.904.889	6,69	NI	Reagente forte
1421	F	72	273.100	5,44	NI	Reagente forte
1497	M	41	20.999.538	7,32	NI	Reagente fraco
1523	F	68	1.959.757	6,29	NI	Reagente forte
1531	F	62	1.099.869	6,04	NI	Reagente forte
1555	M	68	151	2,18	NI	Reagente forte
1572	F	54	42.006	4,62	NI	Reagente forte
1578	M	61	1.874.226	6,27	NI	Reagente forte
1586	M	75	21	1,32	NI	Reagente fraco
1589	F	55	1.206.262	6,08	NI	Reagente forte
1605	F	66	204.644	5,31	NI	Reagente forte
1625	F	35	7.745	3,89	NI	Reagente forte
1683	F	65	546	2,74	NI	Reagente fraco
1885	F	77	820.352	5,91	NI	Reagente fraco
1903	M	40	5.597.576	6,75	NI	Reagente forte
1929	M	74	18.238.958	7,26	NI	Reagente forte
1945	F	69	4.189.542	6,62	NI	Reagente fraco
1980	M	44	17.984	4,25	NI	Reagente forte
2004	F	62	856.230	5,93	NI	Reagente fraco
2006	F	29	3.266	3,51	NI	Reagente forte
2024	M	43	505.825	5,7	NI	Reagente fraco
2025	F	14	3.133	3,5	NI	Reagente fraco
2051	F	68	15	1,19	NI	Reagente forte
2090	F	44	89	1,95	NI	Reagente forte

Continua

Continuação

Amostras	Sexo	Idade (anos)	Carga Viral UI/mL	Carga Viral Log (UI/mL)	Genótipo	Resultado TR Wama HCV
2118	F	48	90.573	4,96	NI	Reagente forte
2137	F	47	375.837	5,58	NI	Reagente forte
2146	M	36	416.869	5,62	NI	Reagente forte
2153	F	38	472.063	5,67	NI	Reagente forte
2200	M	72	29	1,47	NI	Reagente forte
2257	M	52	197.697	5,3	NI	Reagente forte
2287	F	35	13.459	4,13	NI	Reagente fraco
2298	F	72	9.661	3,99	NI	Reagente fraco
2358	F	72	381.066	5,58	NI	Reagente forte
2410	F	64	79.433	4,9	NI	Reagente forte
2420	F	60	9.479.818	6,98	NI	Reagente fraco
2476	F	76	432.779	5,64	NI	Reagente fraco
2526	M	56	178.649	5,25	NI	Reagente fraco
2532	F	34	879.562	5,94	NI	Reagente fraco
2535	F	58	68.004	4,83	NI	Reagente forte
2545	F	65	279.254	5,45	NI	Reagente forte
2665	F	43	6.935	3,83	NI	Reagente forte
2683	F	61	223.941	5,35	NI	Reagente forte
2707	F	56	850.585	5,93	NI	Reagente forte
2745	M	37	1.138.219	6,06	NI	Reagente forte
2798	F	70	694.155	5,84	NI	Reagente forte
2818	F	43	1.209.774	6,08	NI	Reagente forte
2835	F	39	104.863	5,02	NI	Reagente forte
2836	F	69	471.801	5,67	NI	Reagente fraco

NI: sexo, idade e/ou genótipo não informados

*: intensidade não informada

9.10 AMOSTRAS SPIKE

Amostra +	Soro	Spike	Amostra -	Soro	Spike
998	P1	P1	109	N2	N1
1055	P1	P2	112	N1	N1
714	P1	P2	115	N1	N1
239	P1	P2	119	N1	N1
25b3	P1	P1	140	N1	N2
10b2	P1	P2	144	N1	N1
17b4	P1	P1	159	N1	N1
11b2	P1	P1	161	N1	N1
21b6	P1	P1	162	N1	N1
24b1	P1	P1	166	N1	N1
39b5	P1	P1	174	N1	N1
43b1	P1	P1	178	N1	N1
43b6	P1	P1	180	N1	N1
7b4	N2/P1	N2/P1	196	N1	N1
954	P2	P2	198	N1	N1
968	P2	P2	98	N1	N1
1005	P2	P2	94	N1	N1
422	P2	P2			
1108	P2	P2			
965	P3	P2			
970	P3	P3			
1147	P3	P3			
150	P3	P2			
8b6	N2/P1	P1			

Amostras clínicas negativas para HCV (-).
N2 (negativo com sombra), N1 (negativo absoluto).

Amostras AEQ e clínicas positivas para HCV (+).

P3 (fortemente reativa), P2 (reatividade média), P1 (reatividade fraca), N2/P1 (ponto de corte).