

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

DANIELLE DE AGUIAR SOARES

**VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA IMUNOCROMATOGRÁFICO DE FLUXO  
LATERAL PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA  
HEPATITE C**

Porto Alegre  
2016

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

DANIELLE DE AGUIAR SOARES

**VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA IMUNOCROMATOGRÁFICO DE FLUXO LATERAL  
PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE C**

Porto Alegre

2016

DANIELLE DE AGUIAR SOARES

**VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA IMUNOCROMATOGRÁFICO DE FLUXO LATERAL  
PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz

Porto Alegre

2016

## Ficha Catalográfica

S676v Soares, Danielle de Aguiar

Validação de um Sistema Imunocromatográfico de Fluxo Lateral  
para a Detecção de Anticorpos contra o Vírus da Hepatite C /  
Danielle de Aguiar Soares . – 2016.

42.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Farmacêutica, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Thome Kreutz.

1. Hepatite C. 2. Diagnóstico. 3. Imunocromatografia. 4. Validação.  
I. Kreutz, Fernando Thome. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

## RESUMO

O vírus da hepatite C é uma das principais causas de doença hepática crônica, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Em geral, pode-se dizer que na última década houve grandes avanços no diagnóstico da hepatite C. Nesse período houve progressiva melhora na sensibilidade e especificidade dos testes imunoenzimáticos utilizados para detecção de anticorpos contra o HCV. Desde 1993, os imunoenaios de fluxo lateral, comumente chamados de testes rápidos, vêm sendo utilizados no Brasil, como uma alternativa diagnóstica para diversas doenças. Com o avanço das tecnologias de desenvolvimento e produção, os testes rápidos revelaram-se eficientes na investigação de doenças infectocontagiosas. Desde 2005, a utilização dos testes rápidos permite atender à crescente demanda pelo diagnóstico de doenças relevantes à saúde pública, visto que sua utilização aumenta a agilidade da resposta aos indivíduos e permite seu rápido encaminhamento para assistência médica e início de tratamento. O presente estudo visa a avaliação do desempenho de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral para a detecção de anticorpos anti-HCV com o objetivo de ampliar o número de opções de testes disponíveis no território nacional e garantir a confiabilidade destes testes utilizados como diagnóstico no Brasil. Ao final do estudo, o imunoteste apresentou sensibilidade diagnóstica de 95,4% e especificidade de 99,6%, sendo considerado satisfatório para um teste inicial, mas necessitando de ajustes e validações posteriores.

**Palavras-chave:** Hepatite C; Diagnóstico; Imunocromatografia; Validação.

## **ABSTRACT**

The hepatitis C virus is one of the major causes of chronic liver disease and is considered one of the biggest public health problems in the world. In general, it can be said that in the last decade there have been great advances in the diagnosis of hepatitis C. During this period there was a progressive improvement in the sensitivity and specificity of the immunoenzymatic tests used to detect antibodies against HCV. Since 1993, lateral flow immunoassays, commonly called point-of-care tests, have been used in Brazil as a diagnostic alternative for various diseases. With the advancement of development and production technologies, point-of-care tests proved to be efficient in the investigation of infectious-contagious diseases. Since 2005, the use of point-of-care tests has been able to meet the growing demand for the diagnosis of diseases that are relevant to public health, since their use increases the agility of response to individuals and allows them to be quickly referred for medical care and treatment. The present study aims at evaluating the performance of a lateral flow immunochromatographic test for the detection of anti-HCV antibodies with the aim of increasing the number of test options available in the national territory and guaranteeing the reliability of these tests used as diagnosis in Brazil. At the end of the study, the immunoassay presented diagnostic sensitivity of 95.4% and specificity of 99.6%, being considered satisfactory for an initial test, but requiring adjustments and later validations.

**Keywords:** Hepatitis C; Diagnosis; Immunochromatography; Validation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um dispositivo de imunocromatografia de fluxo lateral.....	17
Figura 2. Princípio do teste imunocromatográfico de fluxo lateral anti-HCV.....	18
Figura 3. Ensaio de estabilidade a temperatura ambiente.....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras utilizadas para a determinação da sensibilidade e especificidade relativa do ensaio imunocromatográfico anti-HCV, com seu respectivo ensaio comercial imunoenzimático utilizado como referência, e seus parâmetros. ....	21
Tabela 2. Resultados dos testes confirmatórios das amostras discordantes no teste imunocromatográfico Anti-HCV frente ao imunoensaio ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System™. ....	24
Tabela 3. Análise dos parâmetros de validação: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), índice kappa e acurácia, após realização do ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência. ....	25
Tabela 4. Análise dos parâmetros de Reprodutibilidade e Repetitividade, após realização de ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência. ....	26
Tabela 5. Especificações das 25 amostras do painel de soroconversão Anti-HCV Mixed Titer Performance Panel PHV207™ com respectivos resultados no teste ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System™ e no teste rápido Anti-HCV validado .....	28
Tabela 6. Resumo dos estudos de reação cruzada.....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
**CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
**FINEP** - Financiadora de Estudos e Projetos  
**UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
**UnB** – Instituto Nacional de Nanobiotecnologia  
**OSM** – Organização Mundial de Saúde  
**CDC** – Centro de Controle e Prevenção de Doenças  
**FP** - Falso-positivo  
**FN**- Falso negativo  
**VP** – Verdadeiro-positivo  
**VN** – Verdadeiro-negativo  
**VPN** – Valor Preditivo Negativo  
**VPP** – Valor Preditivo Positivo  
**HBV** - *Hepatitis B Virus* (Vírus da Hepatite B)  
**HCV** - *Hepatitis C Virus* (Vírus da Hepatite C)  
**HIV** - *Human Immunodeficiency Virus* (Virus da Imunodeficiência Humana)  
**RNA** - *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)  
**ALT** - Alanina aminotransferase  
**POCT** - *Point-of-care testing*  
**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**RIBA** - *Recombinant Immunoblot Assay*  
**LIA** – *Line Immuno Assay*  
**PNCQ** – Programa Nacional de Controle de Qualidade.  
**CEP-PUCRS** - Comitê de ética em Pesquisa da PUCRS.  
**LID-PUCRS** - Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUCRS  
**PUCRS** - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
**RS** - Rio Grande do Sul  
**SUS** - Sistema Único de Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. HEPATITE C</b> .....	1
1.1.1. HISTÓRICO.....	1
1.1.2. EPIDEMIOLOGIA .....	2
1.1.3. O AGENTE - CLASSIFICAÇÃO E BIOLOGIA DO VÍRUS HCV .....	5
1.1.4. TRANSMISSÃO, FATORES DE RISCO E ASPECTOS CLÍNICOS.....	7
1.1.5. DIAGNÓSTICO .....	10
<b>1.2. TESTE RÁPIDOS ANTI-HCV (POINT-OF-CARE)</b> .....	11
1.2.1. ASPECTOS GERAIS .....	11
1.2.2. IMUNOCROMATOGRAFIA.....	12
1.2.3. FK BIOTECNOLOGIA.....	14
1.2.4. LABORATORIO DE PESQUISA EM IMUNODIAGNÓSTICO .....	14
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
3.1. OBJETIVO GERAL .....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	17
4.1. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO ANTI-HCV .....	17
4.2. AMOSTRAS .....	19
4.3. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE .....	19
4.4. DETERMINAÇÃO DE REATIVIDADE CRUZADA.....	22
4.5. VALIDAÇÃO FRENTE A PAINÉIS DE SOROCONVERSÃO.....	22
4.6. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE A TEMPERATURA AMBIENTE .....	22
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	23
5.1. DESEMPENHO GERAL DO ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO ANTI-HCV .....	23
5.2. REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE .....	26
5.3. VALIDAÇÃO FRENTE A PAINÉIS DE SOROCONVERSÃO .....	27
5.4. REATIVIDADE CRUZADA.....	29
5.5. ESTABILIDADE À TEMPERATURA AMBIENTE .....	30
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	34
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HEPATITE C

#### 1.1.1. HISTÓRICO

A história do vírus da hepatite C (HCV) foi caracterizada por descobertas, desafios, oportunidades e dificuldades. Surtos de icterícia na população chinesa foram relatados há mais de cinco mil anos e na Babilônia há mais de 2500 anos. No século IV a.C, Hipócrates também relatou quadros de icterícia epidêmica sugerindo causa provavelmente infecciosa e que o órgão afetado seria o fígado (ANSALDI *et al*, 2014; FONSECA, 2010). Quadros de icterícia epidêmica ocorreram por séculos, principalmente nos períodos de guerra e catástrofes humanas, quando ocorria piora das condições sócio higiênicas locais originando as definições de "icterícia de campanha" e de "doença do soldado" (<http://sbhepatologia.org.br/>).

Somente no século XVIII, Bianchi JB introduziu o termo hepatite pela primeira vez por meio da publicação do trabalho científico clássico denominado *História hepática sem Thoria et praxis omnius morborum hepatitis et bilis* (FONSECA, 2010).

No Brasil, em princípio de 1940, ocorreram diversas mortes, no estado de Espírito Santo, causadas por um surto de icterícia pós-vacinação. Dois lotes da vacina produzida com soro humano foram possivelmente os responsáveis pela infecção primária. Nos Estados Unidos, foi relatado, em 1943, um surto de icterícia ocorrido entre um a quatro meses após transfusão de sangue ou plasma. Baseado em diferenças epidemiológicas, observadas entre hepatite infecciosa e icterícia por soro homólogo, foi por MacCallum (1947), o termo hepatite A e hepatite B na categoria dessas duas entidades e aceito posteriormente pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Em 1977, o agente Delta foi descoberto, componente de vírus que necessita do vírus da hepatite B para se multiplicar, agravando o quadro clínico do portador do vírus da hepatite B. Em 1988, foi identificado o vírus da hepatite E, denominado não A e não B de transmissão oral fecal. Apesar da descoberta de todos estes agentes continuavam a ocorrer casos de hepatites não A não B pós transfusionais sem nenhum vírus identificado. Nos primeiros anos da década de oitenta, foram realizados estudos experimentais in vivo no Centro de Controle de Atlanta EUA a fim de descobrir

este agente infeccioso. A pesquisa revelou a presença de um agente infeccioso com 60nm de diâmetro, revestido de um envelope lipoprotéico, genoma constituído de ácido ribonucléico (RNA), classificado inicialmente como pertencente à família *Togaviridae* e transmissível mediante sangue e hemoderivados. No momento da descoberta, Daniel Bradley e colaboradores o denominaram de Agente de forma tubular (FONSECA,2010; ANSALDI *et al*, 2014).

Somente em 1989, após seis anos de intensa investigação Qui-Lim-Choo, George Kuo, Daniel Bradley e Michael Houghthon identificaram, por meio de clonagem gênica, o genoma do vírus responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não A não B. Este agente infectante foi denominado como o vírus da hepatite C (HCV). No mesmo ano da descoberta deste agente infeccioso, George Kuo e colaboradores iniciaram o desenvolvimento de um teste sorológico para a detecção dos anticorpos contra a infecção pelo HCV (anti-HCV total) (<http://sbhepatologia.org.br/>).

As primeiras medidas para evitar a transmissão de hepatites por injeção e transfusão de sangue foram tomadas. O decreto 12.479 de 18 de outubro, publicado em 1978, definiu como obrigatório a realização de sorologia para hepatite B, além de sífilis e Chagas nos bancos de sangue. E, a partir da década de 90, com a disponibilidade de testes comerciais para identificação do vírus C, tornou-se obrigatória a inclusão da triagem sorológica também para este vírus (ANSALDI *et al*, 2014).

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Desde a descoberta do HCV por Choo *et al.* em 1989, a hepatite C vem sendo considerada como uma das principais causas de doença hepática crônica em todo mundo, portanto uma rigorosa avaliação da distribuição global da infecção tornou-se necessária como medida de prevenção e controle da doença ([http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_c\\_oifecoes.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_c_oifecoes.pdf)). Além disso, em consequência da falta de uma vacina contra hepatite C ou alguma forma de profilaxia pós exposição, tornou-se indispensável uma correta avaliação epidemiológica para o planejamento de ações preventivas primárias em qualquer população (MARTINS *et al*, 2011)

Variações significativas no perfil epidemiológico da infecção hepatite C pode ser encontrada em todo o mundo, incluindo distintas regiões geográficas (NAVEIRA *et al*, 2014). Calcula-se que 130 a 170 milhões de pessoas estão infectadas com HCV, com uma prevalência global estimada em 2% - 3%. Apesar de a hepatite C ser considerada endemia mundial, a prevalência da hepatite C é caracterizada por um elevado grau de variação geográfica de sua distribuição, diferença entre idades e grupos de risco dentro de cada país: isto pode ser parcialmente explicado pela característica da população analisada e o modo de transmissão primário (MARTINS *et al*, 2011; ANSALDI *et al*, 2014).

A prevalência da infecção pelo HCV é considerada baixa no Reino Unido, Escandinávia, Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul. Estima-se que 0,01 a 0,5% das pessoas estão infectadas pelo HCV nessas regiões. Prevalências intermediárias são encontradas no Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. Outros países com prevalência intermediária incluem Brasil, Europa Oriental, partes da África e Ásia. (MARTINS *et al*, 2011). No Egito, o país com a maior prevalência de HCV (17 a 26%), há evidências de uma distribuição da doença relacionada a faixa etária: soroprevalência de HCV varia de 19% em indivíduos <18 anos para > 50% em indivíduos na faixa etária de 30 anos. Neste país a hepatite C é endêmica e os níveis de transmissão do HCV são elevados, principalmente devido à insegurança nos procedimentos médicos e contatos domiciliares. O uso de procedimentos de esterilização inadequados durante a campanha de erradicação da esquistossomose realizada no Egito a partir de 1950 a 1980 levou a uma grande transmissão de HCV entre pessoas vivas, mas a transfusão de sangue e reutilização de agulhas continuam a ser os principais fatores de risco de transmissão do HCV (MARTINS *et al*, 2011; ANSALDI *et al*, 2014).

O Brasil é um país continental com grandes variações demográficas, sociais e culturais entre as suas diferentes regiões. As taxas oficiais de incidência e de prevalência são obtidas pela vigilância passiva de notificação compulsórias dos casos de hepatites virais. Paralelamente a este sistema atual, os padrões epidemiológicos da hepatite viral têm sido avaliados a partir de pesquisas realizadas em áreas geográficas restritas e grupos especiais de pessoas, como doadores de sangue, voluntários, HIV positivos, usuários de drogas injetáveis e populações indígenas (NAVEIRA *et al*, 2014). O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária

para hepatite C, porém, estudos de base populacional e com doadores de sangue revelam prevalências inferiores as estimadas, colocando o Brasil como de baixa endemicidade([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_coinfeccoes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_coinfeccoes.pdf)).

Os dados de notificação compulsória indicam um aumento na incidência de hepatite C de 1999 a 2011, respectivamente, a partir de 0,1-6,1 por 100 000 pessoas. De 2006 até 2012, a detecção do HCV permaneceu estável entre 5,0 e 6,0 por 100 000 pessoas. Em 2010, 10,3% dos casos de hepatite C foram relatados no Sistema de Informação para Notificação de Doenças (Sinan), como associados ao HIV / AIDS. No que diz respeito à idade, a mais alta taxa de detecção de HCV e coinfeção com HIV por 100 000 pessoas foi observada na faixa etária entre 40 e 44 anos (1,86), seguido por faixa etária 45 a 49 anos (1,65) e 35 a 39 anos (1,56). Em 2012, a incidência de HCV mudou em todo o país, com 1,7 no Norte, 1,5 no Nordeste, 2,5 no Centro-Oeste, 8,5 no Sudeste, e 8,0 (por 100 000 pessoas) na região Sul (NAVEIRA *et al*, 2014; MARTINS *et al*, 2011).

Além disso, desde os anos 80, um aumento na taxa de mortalidade foi observado devido a hepatite C. A partir de 1996, com a notificação do HCV, foi possível identificar taxas de mortalidade progressiva devido à hepatite C. A taxa de mortalidade devido à hepatite C aumentou de 0,14 mortes por 100 000 pessoas em 1996 para 0,73 em 2003. Observou-se um aumento em todas as 5 regiões, e os mais afetados eram pessoas entre 60 e 80 anos. Por volta de 2005, a taxa de mortalidade chegou a 1,01 por 100 000 pessoas, que se tornou estável por até 2010. ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_coinfeccoes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_coinfeccoes.pdf)).

Uma pesquisa domiciliar foi realizada em todo o Brasil entre os moradores das capitais e do Distrito Federal, e a soroprevalência de anti-HCV em todo o país foi estimada em 1,38%. A pobreza extrema, as idades mais elevadas, e o uso de drogas injetáveis foram os fatores de risco prevalentes. A soroprevalência varia de acordo com a região macro do Brasil, sendo tão baixo como 0,7% na região Nordeste e 0,9% no Distrito Federal, aumentando para 1,2% no Sul e 1,3% no Sudeste e Regiões Centro-Oeste, alcançando as taxas mais elevadas na região Norte com uma soroprevalência de 2,1%. (NAVEIRA *et al*, 2014).

Além disso, os pacientes com hepatite viral B e C estão em maior risco de desenvolver de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. No Brasil, 31% de cirrose e 64% de carcinoma hepatocelular são atribuíveis a hepatite viral. O vírus da hepatite C é a causa de 23% das cirroses e 21% dos carcinomas hepatocelular. Entre 1980 e 2010, houve 139 530 mortes relacionadas a câncer das vias biliares intra-hepática, dos quais 21% especificamente relacionada com carcinoma hepatocelular. Por volta de 2010, representava 4,3% das mortes entre todos tipos de neoplasias malignas e a sétima causa de morte por câncer entre as mulheres e o sexto lugar entre os homens ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_co\\_infeccoes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_co_infeccoes.pdf)). Apesar do aumento do número de casos confirmados, há baixa notificação ainda e o número de pessoas em tratamento está aumentando no Brasil, o que reforça a necessidade de discussão e implementação de estratégias para aumentar a qualificação e notificação dos estados e municípios (NAVEIRA *et al*, 2014)

### 1.1.3. O AGENTE - CLASSIFICAÇÃO E BIOLOGIA DO VÍRUS HCV

O HCV é um vírus envelopado com um genoma de RNA de aproximadamente 9400 pb de comprimento, que codificam um grande polipeptídeo precursor com cerca de 3.000 aminoácidos. O HCV é uma partícula esférica de 30-60 nm de diâmetro constituída por um envólucro no interior do qual está o genoma viral (AUGUSTO, *et al*). É classificado na família *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* embora sua organização do genoma seja distinta dos membros originais da família. O HCV é um tanto incomum para um vírus de RNA por ser capaz de estabelecer infecções persistentes na maioria dos indivíduos expostos (SIMMONDS *et al*, 2004). O processo de replicação do HCV ocorre no citoplasma do hepatócito e não é diretamente citopático. Sua taxa de replicação pode ser bastante elevada, variando entre  $10^{10}$  a  $10^{12}$  vírions por dia, com meia-vida viral estimada de 2 a 3 horas. Aproximadamente 1012 partículas virais são geradas diariamente em pacientes conicamente infectados com HCV. ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_co\\_infeccoes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_co_infeccoes.pdf); CHAN, 2014).

O genoma do HCV possui uma única região de leitura aberta contínua de cerca de 9024-9111 nucleotídeos dependendo do genótipo. Esta região é flanqueada por

regiões não traduzidas. Na extremidade aminoterminal do genoma (extremidade 5') existe uma região não codificada de 324 nucleotídeos precedendo a sequência codificada. Esta região é, aparentemente, a região mais conservada do genoma viral e pensa-se que tem um papel muito importante na replicação do vírus. Na extremidade carboxi-terminal (extremidade 3') existe, igualmente, uma região não transcrita (AUGUSTO *et al*; CHAN, 2014).

A região de leitura aberta do HCV codifica uma única poliproteína que é clivada por proteases do hospedeiro e virais em 10 proteínas virais individuais: três proteínas estruturais (core, E1 e E2) e sete não-estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (CHAN, 2014; SIMMONDS *et al*, 2004). Essas proteínas diferem nas suas funções no ciclo celular do vírus: a proteína do core constitui o nucleocapsídeo com várias funcionalidades envolvendo a ligação ao RNA, a modulação da resposta imune, sinalização celular, potencial oncogênico e autofagia (CHAN, 2014); E1 e E2 são glicoproteínas que formam o envelope funcional que facilita a entrada e fusão do vírus nas células do hospedeiro induzindo a proliferação de anticorpos neutralizantes; as proteínas não estruturais são necessárias para a replicação e empacotamento do genoma viral visto que apresentam várias atividades envolvidas na tradução do RNA, processamento pós-tradução, replicação do HCV, montagem e liberação de partículas infecciosas e propagação viral (ANSALDI *et al*, 2014; KAMILI *et al*, 2012; GIANNINI *et al*, 2003).

Devido à alta propensão de erros da RNA polimerase do o vírus, infecções por HCV apresentam grande diversidade genética permitindo uma rápida adaptação de resposta a anticorpos, resposta imune celular e resistência a drogas antivirais. Sequências virais relacionadas foram identificadas em cães, cavalos, roedores e morcegos. Esta grande diversidade genética é em parte explicada pela longa associação evolutiva entre o vírus e os seres humanos (CHAN, 2014; WEBSTER *et al*, 2015).

Com base na heterogeneidade da sequência genômica, o HCV é classificado em seis principais genótipos (designados de 1 a 6) e mais de 50 subtipos denominados com letras (ex 1a, 1b, 2a, 2b). As sequências nucleotídicas dos genótipos dos vírus individuais diferem aproximadamente 31-34%, e cerca de 20-23%, no grupo de subtipos. Os genótipos têm distribuição mundial: os genótipos 1, 2, 4 e 5



são endêmicos na África, enquanto os 3 e 6 evoluíram em Ásia (CZEPIEL *et al*, 2008; WEBSTER *et al*, 2015).

Os genótipos 1a e 1b são os mais comuns, representando 60% das infecções no mundo. No Brasil, são encontrados, principalmente, os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3, com predominância do genótipo 1 sobre genótipos não-1, com distribuição de 60% e 40%. Entre os portadores diagnosticados no Brasil que apresentam o genótipo 1, aproximadamente em 25% é observado o genótipo 3 e 5% são diagnosticados com o genótipo 2. Um estudo realizado em 2002 na região Sul encontrou prevalência semelhante entre genótipos 1 e 3. As frequentes mutações do HCV e os numerosos subtipos virais são alguns dos obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz ([http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_coinfeccoes.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_coinfeccoes.pdf)).

#### 1.1.4. TRANSMISSÃO, FATORES DE RISCO E ASPECTOS CLÍNICOS

O vírus da hepatite C é transmitido, principalmente, por via sanguínea, bastando uma pequena quantidade de sangue contaminado para transmiti-lo. Existem aproximadamente  $10^5$  a  $10^7$  partículas virais em 1 ml de sangue de um paciente infectado com a forma crônica da doença, e até  $10^9$  / mL em cerca de 15% dos pacientes. A quantidade do vírus nos fluidos e tecidos do corpo é muito menor (CZEPIEL *et al*, 2008).

Dentre as possíveis vias de contaminação destacam-se as transfusões sanguíneas, hemodiálise, contaminação por agulhas, seringas e materiais intravenosos. O potencial infeccioso por via sexual não é alto e a transmissão vertical também é considerada pouco comum (CORRÊA *et al*, 2008).

Grupos populacionais de risco para a infecção pelo HCV incluem usuários de drogas intravenosa que realizam compartilhamento de agulhas, crianças nascidas de mães infectadas pelo HCV, pacientes submetidos à hemodiálise e os indivíduos que receberam transfusões de sangue ou transplantes de órgãos antes da implementação dos rigorosos protocolos de triagem (antes de 1993) (MUKHERJEE *et al*, 2015). Os fatores que aumentam a progressão da doença incluem ingestão de álcool, infecção adquirida em idade avançada, obesidade, co-infecções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou vírus da hepatite B (HBV), sexo masculino,

esteatose hepática, resistência insulínica e atividade necroinflamatória na primeira biópsia hepática (POPESCU *et al*, 2014).

O paciente infectado por HCV tem um risco maior de co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, tendo em vista as formas similares de transmissão, frequentemente não se identifica a co-infecção. Apesar de ambos os vírus serem transmitidos por sangue contaminado, o HCV apresenta 10 vezes mais risco de ser transmitido em acidente de punção do que o HIV e é adquirido mais facilmente por usuários de drogas injetáveis do que o HIV (MUKHERJEE *et al*, 2015).

Estima-se que 0,3% dos indivíduos expostos a agulhas contaminadas com sangue HIV positivo serão infectados, comparados com 2% a 8% dos expostos ao HCV. A infecção de HIV interfere e modifica a história natural de infecção pelo HCV e conduz a uma progressão mais acelerada da doença, de cirrose, e hepatocarcinoma do que aqueles infectados somente por HCV (CORRÊA, *et al* 2008; MUKHERJEE *et al*, 2015).

O RNA do vírus da hepatite C torna-se detectável no período de 7 a 21 dias após a transmissão viral. No entanto, períodos de incubação mais longos podem ocorrer, especialmente em casos onde apenas pequenas quantidades de cargas virais foram transmitidas. Portanto a duração do período de incubação pode variar entre diferentes vias de transmissão (MAASOUMY *et al*, 2012).

Conforme Maasoumy *et al* (2012), o vírus da hepatite C pode causar três tipos de doenças: hepatite aguda, com resolução da infecção e recuperação em 20% dos casos; infecção crônica persistente, com 80% de possibilidade de progressão para doença em uma fase posterior da vida; e progressão rápida para cirrose em 20% dos pacientes. Para os doentes que desenvolvem cirrose, o risco de carcinoma hepatocelular é de cerca de 1-4% ao ano. Sem tratamento antiviral ou transplante de fígado, a deterioração hepática pode ocorrer, conduzindo ao estágio final da doença hepática e à morte (POPESCU *et al*, 2014)

Na forma aguda, a infecção pelo HCV apresenta uma resposta inflamatória pouco intensa, e, em geral, os sintomas são brandos. Na maioria dos casos (> 80%), a doença inicial é assintomática e anictérica. Em apenas 20% dos pacientes sintomáticos, os sinais ou sintomas podem aparecer cerca de 6 a 12 semanas após a exposição do HCV precedendo a soroconversão. Dentre esses sintomas destacam-

se desconforto estomacal, as vezes, sintomas do tipo gripal, mialgia e febre baixa. Icterícia e aumento do fígado são raros e ocorrem em aproximadamente  $\frac{1}{3}$  dos pacientes. A atividade da alanina aminotransferase (ALT) sérica começa a aumentar 2 a 8 semanas após exposição, traduzindo necrose do hepatócito, pode apresentar um valor 10 vezes o normal. Na hepatite C aguda autolimitada, que ocorre em 15 a 25% dos casos, os sintomas podem persistir durante semanas e diminuem com o declínio da ALT e dos níveis de HCV-RNA, não sendo mais detectados 6 meses após o início da infecção (CZEPIEL *et al*, 2008).

Em apenas 20 a 25% dos casos ocorre a eliminação do HCV de forma espontânea após a infecção aguda. Fatores genéticos, idade abaixo de 40 anos, sexo feminino e aparecimento de icterícia são alguns fatores do hospedeiro que têm sido associados à eliminação do vírus espontaneamente. A hepatite C fulminante é raramente relatada em uma fase aguda. Na ausência de tratamento, 70-80% dos doentes evoluem para a fase crônica da doença. Em média 20% podem evoluir para a cirrose e posteriormente carcinoma hepatocelular. Habitualmente, a hepatite C é identificada nesta fase. A hepatite C crônica é definida pela persistência do RNA do HCV viral durante seis meses depois da transmissão (MAASOUMY *et al*, 2012).

No curso do tempo da hepatite crônica permanente, são desenvolvidos danos graduais no fígado. Basicamente, a maioria dos indivíduos com hepatite crônica são assintomáticos durante muito tempo. Nos casos mais graves, ocorre progressão para cirrose e descompensação hepática, caracterizada por alterações sistêmicas e hipertensão portal cursando com ascite, varizes esofágicas e encefalopatia hepática. Dispepsia ou coceira aparecem raramente.

Níveis séricos de Alanina transaminase são normais ou ligeiramente elevados. Raramente gama glutamil transpeptidase no soro, níveis de fosfatase alcalina e bilirrubina são ligeiramente aumentados. Depois de 20 anos, 20% dos pacientes irão apresentar complicações e os sintomas típicos de cirrose hepática (CZEPIEL *et al*, 2008; [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_coifecoes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_coifecoes.pdf)).

Os indícios que apontam a associação da cronificação da doença pelo HCV com o desenvolvimento da cirrose e carcinoma hepatocelular fortalecem a necessidade da identificação precoce da doença e do tratamento dos pacientes com

risco para complicações relacionadas ao HCV, a fim de diminuir a morbidade e mortalidade.

#### 1.1.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de HCV, a seleção e monitorização do tratamento envolvem uma variedade de métodos diagnósticos. O CDC recomenda o rastreamento periódico de HCV para todas as pessoas em grupos de alto risco. Desde 1989, com o desenvolvimento dos primeiros testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o HCV (KUO *et al.* 1989), houve uma busca no aperfeiçoamento de técnicas visando o diagnóstico correto da hepatite C. Esse conjunto de ferramentas virológicas incluem os ensaios sorológicos, que são capazes de detectar os anticorpos anti-HCV e detectar/quantificar o antígeno do *core*. A introdução de testes para a detecção de anticorpos anti-HCV foi um marco na medicina, uma vez que transmissão de HCV associada a transfusão reduziu drasticamente. O teste anti-HCV é recomendado como o primeiro passo de triagem da infecção (MAASOUMY *et al.*, 2012).

O diagnóstico da hepatite C também pode ser realizado por ensaios baseados em biologia molecular, que são usados para detectar e quantificar o RNA viral, bem como para determinar os genótipos do HCV. As técnicas de biologia molecular são consideradas padrão ouro no diagnóstico da infecção pelo HCV, por serem capazes de detectar, quantificar e caracterizar o RNA viral, sendo importantes na definição e monitoramento do tratamento da infecção pelo HCV. Elas incluem os métodos de amplificação do RNA e de sequenciamento, além de outras técnicas (SILVA, 2014).

Desde a década de 90, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é o teste sorológico rotineiramente mais utilizado no diagnóstico da hepatite C, visando à detecção de anticorpos anti-HCV contra antígenos específicos. No decorrer dos anos, foram desenvolvidas três gerações de testes, utilizando proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos na captura de anticorpos anti-HCV. Apesar da excelente sensibilidade e especificidade apresentada pelos imunoenaios enzimáticos de terceira geração para a detecção de anti-HCV, o tempo de liberação dos resultados do teste é de pelo menos 1 dia, dificultando a entrega dos resultados de indivíduos testados na primeira consulta. (KAMILI *et al.*, 2012).

Os testes tipo *immunoblot* surgiram para confirmar a positividade para anti-HCV no teste de ELISA, sobretudo devido aos resultados falso-positivos. Para tanto,

apresentam alta especificidade, apesar de sensibilidade mais baixa. Dentre os testes confirmatórios mais utilizados, estão o RIBA (*Recombinant Immunoblot Assay*) e o LIA (*Line Immuno Assay*). Esses testes visam identificar anticorpos para antígenos recombinantes individuais ou peptídeos sintéticos do HCV. Devido ao seu custo elevado, a sensibilidade do ELISA de terceira geração e os ensaios moleculares serem considerados padrão-ouro, os testes tipo *immunoblot* são pouco utilizados rotineiramente (SILVA, 2014).

Recentemente, ensaios imunocromatográficos rápidos para a detecção de anticorpos anti-HCV, com base em antígenos recombinantes do core, NS3, NS4 e NS5, foram avaliados e mostraram possuir > 99% de especificidade e sensibilidade que varia entre 86% a 99%. Atualmente, o CDC recomenda o uso de um teste de triagem aprovado, ou um ensaio imunoenzimático ou um teste rápido, e o uso de um outro ensaio para confirmar um resultado positivo como um verdadeiro um positivo (ANSALDI *et al*, 2014).

## **1.2. TESTE RÁPIDOS ANTI-HCV (POINT-OF-CARE)**

### **1.2.1. ASPECTOS GERAIS**

Os testes rápidos disponíveis para a detecção de anticorpos anti-HCV também são baseados em antígenos recombinantes derivados de proteínas do core, NS3, NS4 e NS5 e exibem especificidade e sensibilidade comparável aos imunoenaios enzimáticos convencionais. Estes testes geram resultados dentro de uma hora e, portanto, podem ser usados para testes de “point- of- care”. Além disso, não exigem instrumentação complicada para realização, refrigeração ou pessoal técnico qualificado (KAMILI *et al*. 2012).

Testes de “Point-of-care” (POCT) são definidos como exames médicos realizados no ou perto do local de atendimento ao paciente. Isso aumenta a probabilidade de que o paciente, o médico e a equipe de atendimento recebam os resultados com maior rapidez, permitindo que decisões de gestão clínica sejam realizadas de forma imediata. Para ser útil e assegurar qualidade, um teste rápido ideal de POCT deve atender aos critérios “ASSURED” da Organização Mundial da Saúde (OMS), que são as seguintes: acessibilidade, sensibilidade, especificidade, simplicidade na realização (poucos passos, sem necessidade de treinamento),

robusto e rápido (menos de 30 minutos), livre de equipamento para a realização e disponibilidade para aqueles que necessitam do teste (ROZAND *et al*, 2014).

Atualmente, quando um novo método baseado em fluxo lateral é apresentado, o desempenho do novo sistema é muitas vezes referenciado com o desempenho de imunoenaios enzimáticos. (Geertruida, TP 2009). O CDC avaliou três testes rápidos para detecção de IgG anti-HCV (Orasure, Chembio e Medmira). Os mesmos demonstraram elevada especificidade > 99%, e sensibilidade que varia entre 86% a 99%, comprovando a equivalências destes parâmetros de validação com os imunoenaios enzimáticos convencionais. O teste rápido OraQuick HCV™ (Orasure) para a detecção de anticorpos anti-HCV IgG foi recentemente aprovado pela FDA para utilização de sangue total pela pontada no dedo, de indivíduos com idade ≥15 anos, de pessoas com sinais e sintomas da hepatite e em risco de infecção com o HCV. O teste tem o potencial para ser utilizado mais amplamente em consultórios médicos, clínicas comunitárias e organizações de base comunitária (KAMILI *et al*, 2012).

Desde 1993, os testes rápidos vêm sendo utilizados no Brasil, como uma alternativa para atender às necessidades populacionais em face das dificuldades geográficas, realidades epidemiológicas e condições de acesso aos serviços de saúde ([http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_co\\_infeccoes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_co_infeccoes.pdf)). A empresa nacional WAMA Diagnóstica produziu um Kit para determinação qualitativa do anticorpo anti-HCV (Imuno-Rápido HCV™), por método imunocromatográfico utilizando antígenos recombinantes imobilizados na membrana para identificação seletiva de anti-HCV em amostras de soro ou sangue total. Foram testados neste estudo, 127 amostras reagentes e 777 amostras não reagentes para anti-HCV, apresentando 1 resultado falso positivo. A sensibilidade e especificidade final do teste foram, respectivamente, 100% e 99,8% (WAMA DIAGNOSTICA, 2013).

### 1.2.2. IMUNOCROMATOGRAFIA

Os testes rápidos baseiam-se no princípio de imunoensaio de fluxo lateral/imunocromatografia. Ensaio de fluxo lateral são tiras pré-fabricadas de um material suporte contendo reagentes secos que são ativados através da aplicação do fluido de amostra. Um marco neste campo foi a comercialização de um teste de gravidez em papel, o que pode ser considerado um dos os testes mais frequentemente utilizados de “point-of-care” (ROZAND *et al*, 2014; GEERTRUIDA *et al*, 2009).

O Formato dos imunoenaios imunocromatográficos de fluxo lateral permitem movimento de uma amostra de líquido, ou o seu extrato contendo o analito de interesse, ao longo de uma tira de material polimérico passando assim por várias zonas onde ocorre interações específicas com o analito. Um formato típico de fluxo lateral consiste numa camada de superfície para transportar uma amostra a partir da área absorvente de aplicação da amostra seguindo da interação com o conjugado que migra ao longo da tira encontrando a zona de detecção. As membranas são muitas vezes finas e frágeis, de modo que é ligado a uma camada de base de plástico ou de nylon para permitir o corte e manuseamento. Além disso, para deixá-las mais sólidas, as tiras são alojadas num suporte de plástico (cassete), onde apenas janela de aplicação da amostra e uma janela de leitura estão expostas. Tiras de membrana atuais são produzidos a partir de nitrocelulose, nylon, polietersulfona, polietileno ou sílica fundida (PAROLOA *et al*, 2013; NERY *et al*, 2013).

Em uma extremidade da tira é composta por um material para aplicação da amostra que é geralmente feito de celulose ou sílica reticulada. Próximo a esta área há a zona de liberação de conjugado, feita de sílica reticulada. O analito marcado ou elemento de reconhecimento são secos sobre esta área e depois da adição da amostra, este material irá interagir com o fluxo de fluido; interações específicas irão continuar durante o processo de cromatografia (NERY *et al*, 2013).

O formato de imunoenasão de fluxo lateral é comparável ao do ensaio imunoenzimático, apesar de não substituí-lo. Os primeiros estudos de fluxo lateral utilizavam os mesmos componentes dos imunoenaios enzimáticos, porém a fase sólida de imobilização do anticorpo ou antígeno é uma tira de papel para cromatografia. Ao fazer isso, a vantagem pode ser obtida pela associação do princípio cromatográfico ao sistema de reconhecimento imunológico (GEERTRUIDA *et al.*, 2009).

As primeiras marcações utilizadas nos testes rápidos foram enzimas usadas nos ensaios imunoenzimáticos, mas a substituição por marcação com partículas apresentou um melhor resultado. A maioria dos testes rápidos de formato de fluxo lateral comerciais disponíveis (cerca de 94%) usam partículas de ouro coloidal (cor vermelho-rosa) para a marcação, enquanto o restante utiliza partículas de látex coloridas. As principais vantagens da conjugação com partículas de ouro são estabilidade, facilidade de utilização e otimização do reconhecimento antígeno-

anticorpo devido a superfície da partícula, o que aumenta os sinais de imunensaio e permite um fluxo regular através da membrana (KARAKUS *et al*, 2013; GEERTRUIDA *et al*, 2009).

### 1.2.3. FK BIOTECNOLOGIA

A FK Biotecnologia S.A é uma empresa nacional de base biotecnológica, fundada em 1999, atuando em pesquisa, desenvolvimento e inovação com foco na área de imunodiagnóstico humano, vacinas terapêuticas anticâncer e nanobiotecnologia. Vinculada ao Programa INOVAR da FINEP, a empresa atua como parceiro e colaborador de instituições como Instituto Nacional de Nanobiotecnologia (UnB), Instituto Nacional de Pesquisa Translacional em Medicina (UFRGS) e Projeto CABBIO (Centro Argentina-Brasil de Biotecnologia), via CNPq. A empresa é parceira do Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUCRS (LID-PUCRS).

Além da linha de produtos já desenvolvidos, a empresa investe mais de 60% de seu orçamento anual em atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação para produtos de alto valor agregado. O domínio da tecnologia que envolve o desenvolvimento, produção e manutenção de hibridomas é um dos pilares tecnológicos da FK Biotecnologia.

### 1.2.4. LABORATORIO DE PESQUISA EM IMUNODIAGNÓSTICO

Em 2009 foi inaugurado o Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUCRS (LID) que tem como missão o desenvolvimento de testes de base imunológica com tecnologia nacional. O projeto de criação do LID teve apoio financeiro da FINEP e da empresa parceira FK, além do apoio da própria Instituição. Os testes desenvolvidos no LID são para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da hepatite C, anticorpos e antígeno de hepatite B, e testes de terceira e quarta gerações para pesquisa de anti-HIV I/II. Atualmente, a empresa FK Biotecnologia desenvolve testes rápidos para diagnóstico de agentes causadores de DST e testes rápidos para detecção de  $\beta$ -HCG.



## 2. JUSTIFICATIVA

Para rastreio da infecção por HCV um imunoenensaio de formato de fluxo lateral de triagem para detectar anticorpos contra o vírus pode ser utilizado, comparável ao de ensaio imunoenzimático quanto a sensibilidade e especificidade. Em geral, os testes de fluxo lateral apresentam vantagens como: rapidez de resultado (2-5 min), facilidade de uso, baixo custo, portátil e altamente sensível e específico. Estes testes não necessitam de equipamento complicado e conhecimentos técnicos, que são parâmetros críticos para “point-of-care”. Recentemente, a empresa FK biotecnologia padronizou um ensaio imunocromatográfico que foi programado para detectar qualitativamente anticorpos anti-HCV em sangue total/soro. Buscando expandir nacionalmente a aplicação do teste rápido como ferramenta de diagnóstico para a infecção pelo HCV, devido as vantagens apresentadas por este sistema de imunocromatografia de fluxo lateral, sua utilização otimizará o diagnóstico precoce e subsequente encaminhamento dos indivíduos infectados para acompanhamento clínico e eventual tratamento no Sistema Único de Saúde (SUS).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a performance do imunoensaio de fluxo lateral previamente padronizado para a detecção de anticorpos da hepatite C (anti-HCV) utilizando protocolo de validação padrão estabelecido no laboratório; e comparar o desempenho frente ao Kit imunoenzimático anti-HCV validado no LID.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1. Avaliar o comportamento do teste para detecção de anticorpos específicos contra HCV frente a amostras que tiveram resultados positivos nos respectivos testes considerados como referência e as que apresentaram resultados negativos para HCV com o objetivo de estimar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia, índice kappa, repetitividade e reprodutibilidade do referido ensaio;

3.2.2. Avaliar o comportamento do teste para detecção de anticorpos específicos contra HCV frente a amostras de painéis de soroconversão.

3.2.3. Avaliar a existência de reação cruzada com amostras sorológicas com resultados positivos para os marcadores de outras infecções (Hepatite B e HIV), fator reumatoide e anti-núcleo, que tiveram resultados negativos para HCV com respectivos ELISA's imunoenzimáticos.

3.2.4. Realização de ensaios de estabilidade à temperatura ambiente para determinar o prazo de validade do teste.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO ANTI-HCV

A tira teste (membrana de nitrocelulose) contém uma mistura de proteínas recombinantes do HCV: core, NS3, NS4 e NS5 previamente padronizada. Consiste de quatro seções, como demonstrado na figura 1:

1. Área de amostra (celulose), onde é aplicada a amostra.
2. A Área intermediária (fibra de vidro), contém o conjugado, que é composto de ouro coloidal ligados a anticorpos anti-IgG (anticorpo);
3. A Área de teste, contém os antígenos fixados à membrana de nitrocelulose, onde se lê o resultado da amostra testada; e
4. Área de controle, é o local de controle da reação que permite a validação da reação, contém anticorpo (IgG).



Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um dispositivo de imunocromatografia de fluxo lateral. Fonte: Adaptado do manual do teste rápido Millipore.

Para alcançar uma melhor rigidez, antes de iniciar os ensaios de validação, a tira teste foi laminada sobre uma folha de plástico para permitir o corte e manuseamento. Sua apresentação final é em cassete deixando expostas somente a área de aplicação da amostra de leitura.

Primeiramente 50uL de amostra não diluída é colocada no local indicado na membrana (área A). Incuba-se durante 10 minutos. Como demonstrado na figura 2, os anticorpos presentes na amostra ligam-se ao conjugado ouro coloidal que flui pela membrana da placa-teste, no caso de amostra reagente ocorre a ligação aos antígenos do HCV imobilizados na área da reação positiva (T), determinando o surgimento de uma banda colorida. Na ausência de anti-HCV não haverá o aparecimento da banda colorida na área T. A mistura da reação continua a fluir pela membrana atingindo a área controle (C). O conjugado não ligado ao antígeno une-se a anticorpo IgG desta área produzindo uma banda colorida rosa clara, demonstrando que os reagentes estão funcionando corretamente. Caso não ocorra o aparecimento desta linha controle, o ensaio é considerado inválido e então deve ser repetido.

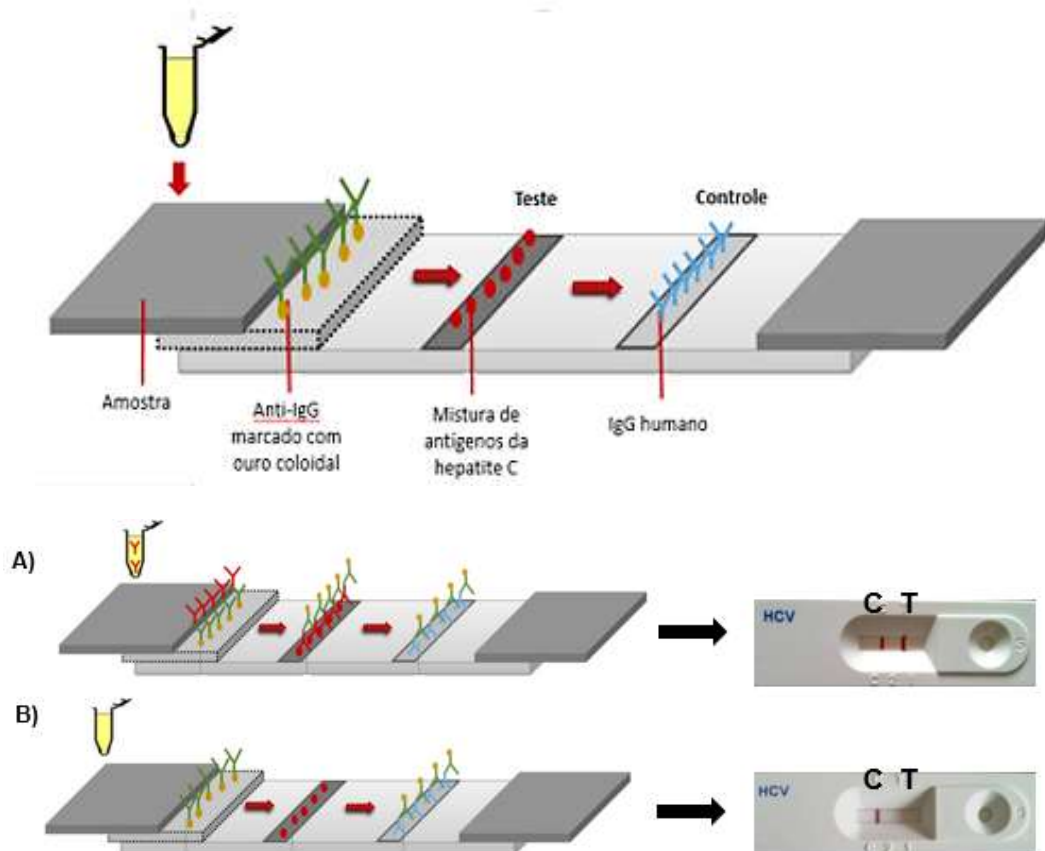


Figura 2. Princípio do teste imunocromatográfico de fluxo lateral anti-HCV. A) Resultado Anti-HCV reagente; B) Resultado Anti-HCV não reagente. Fonte: O autor, 2016.

#### 4.2. AMOSTRAS

As amostras de soro neste estudo foram provenientes do biorrepositório do LID, aprovado pelo CEP-PUCRS (protocolo nº 10/0497. As amostras estão catalogadas em um software personalizado e armazenadas a -80°C. As amostras Anti-HCV reagentes e não reagentes provenientes do biorrepositório foram testadas previamente no imunoenensaio quimioluminescente Ortho Vitros anti-HCV 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, United Kingdom) <sup>TM</sup>. Após testagem no teste rápido do estudo, as amostras com resultado discordante foram repetidas e re-testadas em um kit comercial de referência anti-HCV ORTHO (Johnson & Johnson) <sup>TM</sup>. Também foram testadas amostras provenientes de dois painéis de soro conversão (BBI Diagnostics<sup>TM</sup>) e amostras sabidamente reagentes para anti-HVC do Programa Nacional de Qualidade (PNCQ). Amostras contendo elevado grau de hemólise ou lipemia, com volume insuficiente ou sem valores fornecidos não foram utilizadas neste estudo. Todos os posteriores ensaios utilizando as amostras, bem como os testes rápidos, foram realizados nas dependências do LID-PUCRS. A repetitividade e reprodutibilidade foram verificadas a partir de 1 amostra controle anti-HCV reagente e 1 amostra controle anti-HCV não reagente para cada parâmetro do teste. Estas amostras foram testadas em 5 dias consecutivos (reprodutibilidade), e também cinco vezes no mesmo dia (repetitividade). Os resultados para esses parâmetros são expressos em porcentagem (%) de resultados concordantes, tanto para reprodutibilidade, quanto para repetitividade.

#### 4.3. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

O estudo de sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico anti-HCV desenvolvido foi realizado utilizando-se 1082 amostras, sendo 571 amostras sabidamente reagentes e 511 sabidamente não reagentes para anti-HCV. As amostras que apresentaram resultados falso-positivos ou falso negativos foram confirmadas no Kit imunoenzimático de referência anti-HCV ORTHO (Johnson & Johnson) <sup>TM</sup>.

De posse dos resultados no ensaio imunocromatográfico dos soros listados na Tabela 1, pode-se então determinar a quantidade de amostras que apresentaram resultados Verdadeiramente Positivos (positivas no ensaio referência e positivas no ensaio imunocromatográfico) e Verdadeiramente Negativos (negativas no ensaio referência e negativas no ensaio imunocromatográfico), bem como as amostras Falso

Positivas (negativas no ensaio referência e positivas no ensaio imunocromatográfico) e Falso Negativas (positivas no ensaio referência e negativas no ensaio imunocromatográfico).

Com esses resultados, pode-se então determinar os parâmetros Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e Acurácia do ensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos Anti-HCV, e do ensaio como um todo, através das seguintes fórmulas:

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

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

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FN}$$

$$\text{Acurácia} = \text{VP} + \text{VN} / \text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}$$

Onde:

VP–Verdadeiramente Positivo

VN –Verdadeiramente Negativo

FP –Falso Positivo

FN –Falso Negativo

Tabela 1. Amostras utilizadas para a determinação da sensibilidade e especificidade relativa do ensaio imunocromatográfico anti-HCV, com seu respectivo ensaio comercial imunoenzimático utilizado como referência, e seus parâmetros.

<b>NÚMERO DE AMOSTRAS E STATUS SOROLÓGICO</b>	<b>ENSAIO UTILIZADO COMO REFERÊNCIA</b>	<b>SENSIBILIDADE/ ESPECIFICIDADE DO ENSAIO DE REFERÊNCIA</b>
571 amostras de soro positivas para a presença de anticorpos Anti-HCV	Ortho Vitros anti-HCV 3.0	100%/99,76%
511 amostras de soro negativas para a presença de anticorpos Anti-HCV		

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DE REATIVIDADE CRUZADA

Os imunoenaios são passíveis de reatividade parcial inespecífica (reações cruzadas) entre diferentes patógenos. Por esta razão, foram avaliadas possíveis interferências de outros anticorpos. Foram testadas amostras de soro sabidamente reagentes para anti-HIV e anti-HBc e amostras com presença de auto anticorpos (anticelulares e fator reumatoide).

#### 4.5. VALIDAÇÃO FRENTE A PAINÉIS DE SOROCONVERSÃO

Para avaliar o desempenho do imunoteste de fluxo lateral também foram utilizados dois painéis de soroconversão padrão internacional SeraCare BBI Diagnostics™: Anti-HCV Mixed Titer Performance Panel (PHV 207)™ e Hepatitis C Seroconversion Panel PHV 918 (M)™. O painel PHV 207™ contém um conjunto de 25 alíquotas de plasma não diluídas variando de fracamente a fortemente reagentes para anti-HCV. Foram incluídas como controle duas alíquotas que são negativas para todos os métodos de triagem. O painel PHV 918 (M)™ contém 7 alíquotas de plasma não diluídas coletadas de um único doador de sangue durante o período de soroconversão.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE A TEMPERATURA AMBIENTE

Para avaliar a estabilidade à temperatura ambiente, tiras-testes em cassete foram embaladas unitariamente em embalagem metalizada lacrada a vácuo, contendo um agente dessecante (sílica) e mantidas à temperatura ambiente (19 a 27°C) em sala climatizada com temperatura controlada. O ensaio foi realizado no dia 0 e após 90 dias utilizando controles reagentes e não reagentes para anti-HCV.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inseridos em um arquivo do Excel e analisados usando o programa JavaStat 2-way Contingency table analyses version 2..



## 5. RESULTADOS

### 5.1. DESEMPENHO GERAL DO ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO ANTI-HCV

Foram testadas 571 amostras sabidamente reagentes e 511 amostras de soro sabidamente não reagentes para anti-HCV. Os resultados discordantes foram confirmados no teste imunoenzimático de referência anti-HCV ORTHO (Johnson & Johnson) <sup>TM</sup>. No total foram encontrados 28 resultados discordantes, sendo 26 falsos negativos e 2 falsos positivos, como demonstrado na tabela 2. Com isso, como visto na tabela 3, pode-se determinar uma sensibilidade de 95,4% (94,5-95,7), especificidade de 99,6% (98,6-99,9), acurácia de 97,4% (96,5-97,7) e um índice kappa de 0,94 (0,929-0,954) representando uma alta correlação entre o ensaio imunocromatográfico e os ensaios de referência (LANDIS &KOC, 1977).

O teste imunocromatográfico também foi testado frente a 3 amostras provenientes do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) sabidamente reagentes para anti-HCV, todas as amostras confirmaram o resultado comprovando a sensibilidade imnoteste do estudo.

Tabela 2. Resultados dos testes confirmatórios das amostras discordantes no teste imunocromatográfico Anti-HCV frente ao imunoensaio ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System™. *Cut off* do imunoensaio: 0,414. DO: Densidade óptica; POS: positivo, NEG: negativo.

<b>AMOSTRA</b>	<b>TESTE RÁPIDO ANTI-HCV</b>	<b>ORTHO HCV Version 3.0 (DO/RESULTADO)</b>
3476	NEG	2,613 (POS)
3472	NEG	1,258 (POS)
142	NEG	5,000 (POS)
167	NEG	0,876 (POS)
2802	NEG	1,202 (POS)
2848	NEG	1,706 (POS)
2858	NEG	0,672 (POS)
2860	NEG	0,659 (POS)
2894	NEG	0,518 (POS)
3075	NEG	1,146 (POS)
2982	NEG	1,399 (POS)
3000	NEG	0,604 (POS)
678	NEG	4,767 (POS)
2975	NEG	0,651 (POS)
2776	NEG	0,499 (POS)
3024	NEG	4,055 (POS)
3590	NEG	1,973 (POS)
3653	NEG	4,469 (POS)
3714	NEG	2,650 (POS)
3729	NEG	1,197 (POS)
3778	NEG	2,603 (POS)
3779	NEG	3,237 (POS)
3006	NEG	1,151 (POS)
3115	NEG	0,753 (POS)
3569	NEG	0,765 (POS)
3537	NEG	0,987 (POS)
753	POS	0,117 (NEG)
944	POS	0,121 (NEG)

Tabela 3. Análise dos parâmetros de validação: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), índice kappa e acurácia, após realização do ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência. Entre parênteses encontra-se o intervalo de confiança (95%)

	<b><i>SENSIBILIDADE</i></b> (%)	<b><i>ESPECIFICIDADE</i></b> (%)	<b><i>VPP</i></b> (%)	<b><i>VPN</i></b> (%)	<b><i>ÍNDICE KAPPA</i></b>	<b><i>ACURÁCIA</i></b> (%)
<b><i>TESTE RÁPIDO ANTI-HCV</i></b>	95,4 (94,5-95,7)	99,6 (98,6-99,9)	99,6 (98,7-99,9)	95,1 (94,2-95,4)	0,94 (0,92-0,95)	97,4 (96,5-97,7)

## 5.2. REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Os resultados dos ensaios com amostras controle testadas em cinco dias consecutivos e cinco vezes no mesmo dia foram concordantes, com isso foram encontrados 100% de reprodutibilidade e 100% de repetibilidade para a detecção de anticorpos anti-HCV no ensaio imunocromatográfico, como visto na tabela 4.

Tabela 4. Análise dos parâmetros de Reprodutibilidade e Repetitividade, após realização de ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência. As fórmulas utilizadas para os cálculos encontram-se listadas nos Materiais e Métodos. Entre parênteses encontra-se o intervalo de confiança (95%)

	<b>REPRODUTIBILIDADE</b> (%)	<b>REPETIBILIDADE</b> (%)
<b>TESTE RÁPIDO</b>	100	100
<b>ANTI-HCV</b>	(99,5-100)	(99,5-100)

### 5.3. VALIDAÇÃO FRENTE A PAINÉIS DE SOROCONVERSÃO

Para avaliar o desempenho do teste imunocromatográfico, também foram utilizados painéis de soroconversão. Painéis de soroconversão são compostos por amostras não diluídas, colhidas de único doador durante o desenvolvimento da infecção e subsequente resposta imune. Para esta validação utilizamos dois painéis da hepatite C: Anti-HCV Mixed Titer Performance Panel (PHV 207)™ e Hepatitis C Seroconversion Panel PHV 918 (M)™. O painel PHV 207 apresenta 25 alíquotas de plasma não diluídas variando de fracamente a fortemente reagentes para anti-HCV, como visto na tabela 5. O resultado do ensaio com este painel apresentou concordância com 19 amostras. Total de 6 amostras apresentaram resultados discordantes, 4 amostras reagentes e 2 amostras indeterminadas apresentaram resultados negativos no teste do estudo. O painel PHV 918(M) apresenta 7 amostras de plasma coletadas de um único doador durante o período de soroconversão, sendo 5 amostras não reagentes, 1 indeterminada e 1 positiva. O imunoteste confirmou o resultado de 6 amostras, exceto a amostra indeterminada que apresentou resultado negativo.

Tabela 5. Especificações das 25 amostras do painel de soroconversão Anti-HCV Mixed Titer Performance Panel PHV207™ com respectivos resultados no teste ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System™ e no teste rápido Anti-HCV validado. POS: positivo, IND: indeterminado; NEG: negativo. +/-, 1+, 2+, 3+ e 4+ :nível de reatividade contra cada antígeno da hepatite C de cada amostra.

Amostras	C100 (NS4)	C33c (NS3)	c22 (CORE)	NS5 (NS5)	ORTHO HCV Version 3.0 ELISA	Teste Rápido Anti-HCV
PHV207-01	1+	1+	3+	1+	POS	POS
PHV207-02	+/-	1+	-	-	IND	POS
PHV207-03	1+	3+	-	-	POS	POS
PHV207-04	4+	4+	4+	-	POS	POS
PHV207-05	-	-	-	-	NEG	NEG
PHV207-06	3+	4+	4+	-	POS	POS
PHV207-07	1+	2+	-	-	POS	NEG
PHV207-08	1+	2+	3+	+/-	POS	NEG
PHV207-09	1+	4+	4+	-	POS	POS
PHV207-10	2+	1+	-	-	POS	POS
PHV207-11	-	3+	4+	-	POS	POS
PHV207-12	-	+/-	3+	-	IND	NEG
PHV207-13	4+	4+	3+	4+	POS	POS
PHV207-14	3+	2+	-	+/-	POS	NEG
PHV207-15	-	1+	2+	-	POS	NEG
PHV207-16	1+	1+	1+	-	POS	POS
PHV207-17	-	+/-	3+	-	IND	POS
PHV207-18	+/-	+/-	2+	-	IND	NEG
PHV207-19	2+	2+	4+	3+	POS	POS
PHV207-20	-	1+	2+	-	POS	POS
PHV207-21	+/-	2+	2+	-	POS	POS
PHV207-22	-	3+	-	-	IND	POS
PHV207-23	1+	4+	-	-	POS	POS
PHV207-24	4+	4+	-	3+	POS	POS
PHV207-25	-	-	-	-	NEG	NEG

#### 5.4. REATIVIDADE CRUZADA

Como demonstrado na tabela 6, foram testadas amostras reagentes para anti-HIV, fator reumatoide, autoanticorpos anti celulares (FAN), anti-HBc e HBsAg. Somente uma amostra anti-HIV reagente apresentou resultado falso positivo.

Tabela 6. Resumo dos estudos de reação cruzada

<b>TIPO DE AMOTRA</b>	<b>N</b>	<b>RESULTADO FALSO POSITIVO</b>
Anti-HIV reagente	41	1
Fator Reumatoide	21	0
Autoanticorpos anti celulares	6	0
Anti-HBC reagente	30	0
HBsAg reagente	35	0

### 5.5. ESTABILIDADE À TEMPERATURA AMBIENTE

Para avaliar a estabilidade à temperatura ambiente, o teste imunocromatográfico foi testado no dia 0 e 90 dias após a montagem do teste sob as mesmas condições. Como demonstrado na figura 3, pode-se notar que o mesmo não perdeu sua estabilidade, visto que tanto a banda teste como controle não degradaram após 90 dias.



Figura 3. Ensaio de estabilidade a temperatura ambiente. Tiras-testes em cassete foram embaladas unitariamente em embalagem metalizada lacrada a vácuo, contendo um agente dessecante (sílica) e mantidas à temperatura ambiente (19 a 27°C) O ensaio foi realizado no dia 0 e após 90 dias utilizando controles reagentes (A) e não reagentes para anti-HCV (B).



## 6. DISCUSSÃO

O vírus da hepatite C (HCV) infecta aproximadamente 130- 170 milhões de pessoas em todo mundo. Os testes sorológicos para pesquisa do anti-HCV normalmente são empregados para rastreamento diagnóstico e levando em consideração a prevalência estimada do HCV de 3%, estes testes precisam apresentar alta sensibilidade (SCALIONI *et al*, 2014). Em 2011 Smith e colaboradores avaliaram o desempenho de três testes rápidos disponíveis no mercado OraQuick HCV Rapid Antibody Test®, Chembio DPP HCV test® e Multiplo Rapid HIV/HCV Antibody Test®. Os mesmos foram comparados à quimioluminescência e ao RIBA de terceira geração quando necessário. A sensibilidade e especificidade dos 3 testes rápidos variou de 86,8% a 97,8% e de 99,6% a 99,8%, respectivamente. Um outro estudo multicêntrico avaliou estes mesmos testes em uma população de alto risco para hepatite C e observou grande variabilidade de resultados. A sensibilidade oscilou de 78,9% a 97,4% e a especificidade de 80,0% a 100,0%. (SMITH *et al*, 2011). A sensibilidade e especificidade encontradas para a pesquisa de anti-HCV neste estudo foram respectivamente de 95,4% (94,5-95,7) e 99,6% (98,6-99,9) (Tabela 3), demonstrando ser comparável a testes já empregados no mercado (KAMILI,2012).

Testes para a pesquisa de anticorpos anti-HIV são conhecidos por serem menos sensíveis em pacientes submetidos a terapia antiviral (O'CONNELL *et al*, 2003). Os títulos de anticorpos anti-HCV são conhecido por diminuir após a resposta virológica contínua, e aproximadamente 1,2% dos doentes podem ainda soroconverterem (KEE *et al*, 2012). Os resultados falso-negativos neste estudo podem ser devido ao menor título de anticorpos presentes no soro ou alguns fatores desconhecidos que interferiram.

Os painéis de soroconversão foram utilizados no estudo para analisar também a sensibilidade com amostras seriais de indivíduos no período de soroconversão. O teste imunocromatográfico apresentou concordância de 76% e 86% frente aos dois painéis de soroconversão PHV 207 e PHV 918 (M), respectivamente. As amostras dos painéis com resultados indeterminados pelo imunoensaio anti-HCV ORTHO (Johnson & Johnson) <sup>TM</sup> apresentaram resultado negativo no teste imunocromatográfico. Este fato pode ser explicado devido a baixos títulos de anticorpos anti-HCV, visto que estas amostras apresentam anticorpos contra somente 1 ou 2 antígenos da hepatite C.

Um teste diagnóstico é considerado de alta reprodutibilidade quando se obtém praticamente o mesmo resultado após várias testagens repetidas e de forma independente. O teste imunocromatográfico apresentou resultados consistentes quando realizados independentemente ou sob as mesmas condições, visto que apresentou reprodutibilidade e repetitividade de 100% (tabela 4). O índice kappa é um parâmetro de grande valor em validação de ferramentas diagnósticas. O teste em estudo apresentou índice kappa de 0,94 (tabela 3), que é considerado de alta correlação (valores acima de 0,80). O valor de acurácia também foi considerado excelente, visto que o teste apresentou 97, 4% (tabela 3).

A especificidade do teste imunocromatográfico também foi avaliada por meio de testes com amostras reagentes para outros patógenos. Amostras fator reumatoide e autoanticorpos anti celulares reagentes também foram escolhidas pois estudos já demonstraram a alta taxa de interferência destes anticorpos heterófilos em imunoenaios, visto que são anticorpos polirreativos contra antígenos heterógenos (MARSON *et al*, 1991; TATE *et al*, 2004). O teste confirmou sua ótima especificidade, visto que de todas as amostras interferentes testadas somente uma amostra anti-HIV reagente apresentou resultado falso positivo, o que já havia sido preconizado na literatura.

O teste imunocromatográfico validado apresenta algumas limitações para sua utilização. O teste pode ser apenas utilizado com amostras de soro ou plasma, o que inviabiliza sua utilização em trabalho de campo, onde é fundamental que possam ser utilizadas amostras de sangue total. Portanto, necessita ser realizado em ambientes que possuam centrífuga e pipeta calibrada.

Produtos submetidos ao estudo de estabilidade devem ser armazenados na embalagem original como as usadas para sua comercialização, à temperatura ambiente ou na temperatura recomendada para sua conservação e também em condições que acelerem o seu envelhecimento (ANVISA). O teste imunocromatográfico Anti-HCV em estudo apresentou excelente estabilidade após 90 dias embalado, porém foi testado somente em temperatura ambiente. Este experimento precisa ser refeito para determinar a real estabilidade e definir o prazo de validade, através de testes de estabilidade acelerada utilizando metodologias propostas pela ANVISA.

Embora o nosso estudo demonstrou boa sensibilidade clínica, outros estudos com pacientes na fase precoce da infecção são necessários para confirmar a utilidade clínica do teste. Também, a fim de melhorar a sensibilidade do teste, sugere-se uma avaliação com amostras de pacientes anti-HCV reagentes co-infectados com HIV, visto que pesquisadores do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relataram um aumento nos resultados falso negativos em alguns testes para pesquisa de Anti-HCV em pacientes co-infectados com anti-HIV (MARCELLIN *et al*, 1994; BONACINI *et al*, 2011).

## **7. CONCLUSÃO**

Embora novos estudos de validação são necessários para confirmar os dados desta pesquisa, o teste imunocromatográfico de fluxo lateral anti-HCV apresentou resultados compatíveis aos testes de mesma tecnologia já disponíveis no mercado para triagem sorológica de hepatite C. O imunoteste apresentou rapidez, simplicidade e flexibilidade na execução e leitura do resultado, possibilitando no futuro, o acesso a populações de risco, prevenindo, assim, a transmissão da doença e promovendo um acolhimento imediato, pela estrutura assistencial do SUS, e encaminhamento do paciente para diagnóstico confirmatório e tratamento.

## 8. REFERÊNCIAS

ALTER *et al.* The natural history of community-acquired hepatitis c in the United states. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 27, 1992.

ALTER, J.M. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n.17, p. 2436-2441, 2007.

ALTER, J.M., KUHNERT, L.W., FINELLI, L. Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 52, p. 1-16, 7 fev. 2003.

ANSALDI, F. *et al.* Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9633-9652, ago. 2014.

BONACINI, M., LIN, H.J., HOLLINGER, F.B. Effect of coexisting HIV-1 infection on the diagnosis and evaluation of hepatitis C vírus. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 26, n. 4, p. 340-344, mar. 2011.

BRYCE, D.S. *et al.* Evaluation of Three Rapid Screening Assays for Detection of Antibodies to Hepatitis C Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 825–831, 15 set. 2011.

CHA JY, M.D *et al.* Performance Evaluation of the OraQuick Hepatitis C Virus Rapid Antibody. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 33, n. 3, p. 184-189, maio 2013.

CHAN, C.P., CHEUNG, Y., RENNEBERG, R., *et al.* New Trends in Immunoassays. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v.109, p.123–154, 2008.

CHAN, J. Hepatitis C. **Disease-a-Month**, v. 60, p. 201–212, 2014.

CORRÊA, S.; BORGES, P.K. Hepatite C: aspectos epidemiológicos e clínicos de uma doença. **Revista Eletrônica InterBio**, v. 2, n.1, 2008.

CZEPIEL, J., BIESIADA, G., MACH, T. Viral Hepatitis C. **Hepatology Infectious Diseases**, v. 118, n.12, p. 734-740, 2008.

D'SOUZA, R., FOSTER, G.R. Diagnosis and treatment of hepatitis C. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 97, p. 223-225, maio 2004.

DEUFFIC-BURBAN, S., YAZDANPANA, Y. It is time to change the paradigm for Hepatitis C Virus Testing. **Clinical Infectious Diseases**. v. 54, p. 9, 1 maio 2012.

ESCOBAR-GUTIERREZ, A., VAZQUEZ-PICHARDO, M., CRUZ-RIVERA, M., *et al.* Identificación of Hepatitis C Virus Transmission Using a Next-Generation Sequencing Approach. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n.4, p.1461-1463, abr. 2012.

ESPINOSA, M.E.L. Diagnosis of hepatitis C virus infection. **Mexican Journal of Gastroenterology**, v. 67, n. 2, p. 29-35, 30 Sep 2002.

FERREIRA, O.C. *et al.* Avaliação de testes rápidos para detecção anti-HIV no Brasil. **Lippincott Williams & Wilkins**, v.19, n. 4, p. 70-75, 2005.

FONSECA, J. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322-330, 2010.

FRICK, D.N. The Hepatitis C Virus NS3 Protein: A Model RNA Helicase and Potential Drug Target. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, n.1, p.1–20, jan. 2007.

GEERTRUIDA, A. *et al.* Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569–582, set. 2008.

GETCHELL, P.J. *et al.* Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 62, n.18, p. 362-365, maio 2013.

GHANY, M.G., STRADER, D.B., THOMAS, D.L., *et al.* Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, abr. 2009.

GIANNINI, C., BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death and Differentiation**, v.10, p. 27-38, mar. 2003.

GOWER, E., ESTES, C., BLACH, S. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 545-557, nov. 2014.

KAMILI, S., DROBENIUC, J., ARAUJO, A.C., *et al.* Laboratory Diagnostics for Hepatitis C Virus Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n.1, p.43–48, 15 jul. 2012.

KARAKUS, C., SALIH, B.A. Comparison of the lateral flow immunoassays (LFIA) for the diagnosis of Helicobacter pylori infection. **Journal of Immunology**, v. 396, p. 8–14, 28 ago. 2013.

KEE, K.M. *et al.* Decreased anti-hepatitis C virus titer and associated factors in chronic hepatitis C patients after sustained virological response: a prospective study. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 6, jun 2012.

KOSACK, S.C. *et al.* Diagnostic accuracy evaluation of the ImmunoFlow HCV rapid immunochromatographic test for the detection of hepatitis C antibodies. **Journal of Virological Methods**, v. 204, p. 6–10, ago. 2014.

KRABBE, J.G.; BARTHOLOMEW, J.A., MOVIG, K.L. Analytical validation of point of care analysis of lithium. **Medimate**, v. 1, fev. 2014.

MAASOUMY, B., WEDEMEYER, H. Natural history of agude and chronic hepatitis c. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 4, p. 401-412, 2012.

MAITY, S. *et al.* Performance and diagnostic usefulness of commercially available enzyme linked immunosorbent assay and rapid kits for detection of HIV, HBV and HCV in India. **Virology Journal**, v. 9, n. 290, 26 nov. 2012.

MARCELLIN, P. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) viremia in human immunodeficiency virus seronegative and seropositive patients with indeterminate hcv recombinant immunoblot assay. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 2, p. 433–435, ago. 1994.

MARQUES, W.P. *et al.* Avaliação de um Teste Rápido para Detecção de Anticorpos Anti-HIV. **NewsLab**, v. 84, p. 176-184, 2007.

MARTINS, T., SCHIAVON, J., SCHIAVON, L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n.1, p.107-112, 2011.

MENEGHISSE S.C. **Boas Práticas de Fabricação e o Processo de Validação no Desenvolvimento e Produção de Kit de imunodiagnóstico**. 2007. 157p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MUKHERJEE, R., BURNS, A., RODDEN, D., *et al.* Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 5, 2015.

NAVEIRA, M., BARBOSA, J., SERENO, L. 12 Years of Universal Access to Hepatitis C Treatment: Brazil's Comprehensive Response. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care**, v. 13, n. 6, p. 560–567, 2014.

NERY, E.W., KUBOTA, L.T. Sensing approaches on paper-based devices: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7573–7595, 2013.

NERY, W.E., KUBOTA, T.L. Sensing approaches on paper-based devices: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7573–7595, set. 2013.

O'CONNELL, R.J. *et al.* Performance of the OraQuick rapid antibody test for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in patients with various levels of exposure to highly active antiretroviral therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, maio 2003.

OFFERMANN, N. *et al* Development and validation of a lateral flow assay (LFA) for the determination of IgG-antibodies to Pr3 (cANCA) and MPO (pANCA). **Journal of Immunological Methods**, v. 403, p. 1–6, jan. 2014.

PARANA, R., ALMEIDA, D. **História das hepatites virais**. Disponível online em: <http://sbhepatologia.org.br/>. Acesso em 05/05/2015.

PAROLO, C., MERKOÇI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. **Chemical Society Review**, v. 42, p. 450-457, 2013.



PEELING, W.R., MABEY, D. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 8, p. 1062–1069, ago. 2010.

POPESCU, C.I., RIVA, L., VLAICU, O. Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. **Biology**, v. 3, n. 4, p. 892-921, 2014.

RIBEIRO, E.J. *et al.* **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral c e coinfeções. Normas e Manuais Técnicos. Disponível online em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos\\_diretrizes\\_hepatite\\_viral\\_c\\_coifeccoes.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_coifeccoes.pdf)** . Acesso em 06/07/2015.

ROZAND, C. Paper-based analytical devices for *point-of-care* infectious disease testing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p.147–156, fev. 2014.

SCALIONI, L., CRUZ, H., PAULA, V. Performance of rapid hepatitis C antibody assays among high-and low- risk populations. **Journal of Clinical Virology**, v. 60, n. 3, p. 200- 205, 2014.

SCALIONI, P.L. *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, jul. 2014.

SEEFF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n.5, p. 35-46, nov. 2002.

SHARMA, S.D. Hepatitis C virus: Molecular biology and current therapeutic options. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 17-34, jan. 2010.

SILLANPA, M., MELÉN, K., PORKKA, P., *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, 23 jun. 2009.

SILVA, N.R.C, SANTOS, L.E., SOUZA, A.L. **Manual de treinamento para teste rápido hepatites B (HBsAg) e C (anti-HCV). Disponível online em: <http://se.corens.portalcofen.gov.br/wp->**

[content/uploads/2013/12/manual\\_para\\_capacitacao\\_de\\_tr\\_para\\_as\\_hepatites\\_b\\_17745-1.pdf](#) . Acesso em 05/02/2015.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3173–3188, nov. 2004.

TUCKER, D.J, BIEN, H.C., PEELING, W.R. Point-of-care testing for sexually transmitted infections: recent advances and implications for disease control. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 73–79, fev. 2013.

WASSIE *et al.* Development of a proof of concept immunochromatographic lateral flow assay for point of care diagnosis of Mycobacterium Tuberculosis. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 202, maio 2013.

WEBSTER, P.D, KLENERMAN, P., GEOFFREY, M. **Hepatitis C. Disponível online em:** [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(14\)62401-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(14)62401-6/fulltext). Acesso em 09/11/2015.

XIANG, T. *et al.* A novel double antibody sandwich-lateral flow immunoassay for the rapid and simple detection of hepatitis c virus. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 5, p.1041-1047, nov. 2012.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)