

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

THICIANY BLENER LOPES

**DESENVOLVIMENTO E PROTOTIPAGEM DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
PARA HEPATITE D**

Belo Horizonte

2019

THICIANY BLENER LOPES

**DESENVOLVIMENTO E PROTOTIPAGEM DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
PARA HEPATITE D**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Coorientadoras: Dra. Ana Paula Salles Moura
Fernandes e Dra. Natália Salazar de Castro

Belo Horizonte

2019

043

Lopes, Thiciany Blener.

Desenvolvimento e prototipagem de métodos de diagnóstico para Hepatite D [manuscrito] / Thiciany Blener Lopes. – 2019.

83 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli. Coorientadoras: Prof. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes; Dra. Natália Salazar de Castro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Hepatite D. 3. Testes Sorológicos. 4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 5. Cromatografia de Afinidade. I. Gazzinelli, Ricardo Tostes. II. Fernandes, Ana Paula Salles Moura. III. Castro, Natália Salazar de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE THICIANY BLENER LOPES. Aos vinte dias do mês de agosto de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Desenvolvimento e prototipagem de métodos de diagnóstico para hepatite D", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Cristiane Faria de Oliveira Scarponi (Fundação Ezequiel Dias), aprovada; Dr. Leonides Rezende Júnior (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Natalia Salazar de Castro - Coorientadora (CT-Vacinas), aprovada; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de agosto de 2019.

Dra. Cristiane Faria de Oliveira Scarponi (Fundação Ezequiel Dias)

Dr. Leonides Rezende Júnior (UFMG)

Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes - Coorientadora (UFMG)

Dra. Natalia Salazar de Castro - Coorientadora (CT- Vacinas)

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (UFMG)

Prof. Eda Quirino Castro
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha família. Aos meus pais, Marcileia e Antonio, por todo apoio, força e incentivo que sempre me deram, especialmente durante esses últimos anos. A minha irmã, Viviany, pelos momentos de risada e descontração. A todos os meus parentes pelo constante apoio.

Ao prof. Dr. Ricardo Gazzinelli, meu orientador, pela oportunidade que me foi concedida, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade mesmo quando não se encontrava presente e confiança em mim depositada.

A prof.^a Dra. Ana Paula Fernandes, minha coorientadora, também pela confiança, pela orientação e dedicação. Por sempre estar disposta a me auxiliar no desenvolvimento do projeto.

A Dra. Natália Salazar, minha coorientadora, por ir para a bancada e me ensinar tudo sobre expressão de proteínas recombinantes e todas as etapas envolvidas. Por me auxiliar, orientar e ajudar sempre que precisei.

Aos meus companheiros do CT Vacinas, em especial a Marta e Ana Raquel, que me ensinaram, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e que tornaram meus dias no laboratório mais divertidos e produtivos.

Aos professores Dra. Santuza Teixeira, Dra. Lara Godoi e Dr. Flávio da Fonseca por todo o ensinamento, ajuda e sugestões de melhorias para o projeto.

Ao Laboratório de Virologia Molecular (Fiocruz/Rondônia), em especial a Dra. Deusilene Dall'Acqua e o Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo, que disponibilizaram as amostras de soro utilizadas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, que tanto ajudaram no final desse processo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

A hepatite D acomete cerca de 15 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a prevalência dos casos na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia, África subsaariana e América do Sul. Ela é causada pelo vírus da hepatite D (HDV) e é responsável pela forma mais grave de hepatite viral, uma vez que possui rápida progressão para cirrose e descompensação hepática. Isso gera um aumento da necessidade de um diagnóstico precoce, tornando-se de grande importância o desenvolvimento de novos produtos de baixo custo para o diagnóstico dessa doença. Com o objetivo de desenvolver e prototipar dois insumos para o diagnóstico sorológico da hepatite D foram expressas duas proteínas recombinantes derivadas do antígeno delta do HDV, a DTH10.1 e a DTH10. Ambas as proteínas foram expressas através do sistema da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas por cromatografia de afinidade a metal com coluna de níquel, devido a presença de uma cauda de histidina na região C-terminal das proteínas. As duas proteínas recombinantes foram utilizadas no desenvolvimento e prototipagem de duas metodologias de diagnóstico para hepatite D, sendo elas ELISA e teste imunocromatográfico de fluxo lateral. No ELISA, ambas as proteínas DTH10.1 e DTH10 mostraram ser capazes de detectar anticorpos IgG anti-HDV no soro de pacientes infectados com o HDV, ao tempo que não reagem com amostras de hepatite B, hepatite C, de fator reumatoide e de indivíduos saudáveis. O ELISA com a proteína DTH10.1 apresentou sensibilidade por dupla entrada de 75,7% e especificidade de 99%, enquanto a DTH10 apresentou 77,3% e 99%, além de ter se mostrado capaz de gerar resultados reprodutíveis. A DTH10.1 apresentou excelente estabilidade da fase sólida em condições de agressão ao sistema. Através do teste imunocromatográfico, a DTH10.1 mostrou ser capaz de reproduzir os resultados obtidos no ELISA com essa proteína, gerando uma sensibilidade de 77, 5% e especificidade de 100%. Com isso conclui-se que ambos os insumos desenvolvidos se tratam de métodos promissores para o diagnóstico da hepatite D.

Palavras-chave: Hepatite D. Diagnóstico sorológico. ELISA. Teste imunocromatográfico.

ABSTRACT

Hepatitis D affects 15 to 20 million people worldwide, with South American, especially the Amazon basin, being one of the regions with the highest prevalence of cases. Hepatitis D is caused by the hepatitis D virus (HDV) and is responsible for the most severe form of viral hepatitis as it has rapid progression to cirrhosis and liver decompensation. This increases the need for early diagnosis, making the development of new forms of diagnosis for this disease very important. In order to develop and prototype a serological method for the diagnosis of hepatitis D, two recombinant proteins derived from the HDV delta antigen, DTH10.1 and DTH10, were expressed. Both proteins were expressed by the *E. coli* BL21 strain (DE3) system and purified by metal affinity chromatography with nickel columns due to the presence of a histidine tail in the C-terminal region of the proteins. Both recombinant proteins were used in the development and prototyping of two diagnostic methodologies for hepatitis D, namely ELISA and lateral flow immunochromatographic test. In ELISA both DTH10.1 and DTH10 were shown to be able to detect anti-HDV IgG antibodies in the serum of HDV-infected patients while not reacting with hepatitis C, rheumatoid factor and healthy samples, reacting with only a hepatitis B sample. The DTH10.1 ELISA showed 75.7% double-entry sensitivity and 99% specificity, while DTH10 showed 77.3% and 99%. In addition to being able to generate reproducible results and excellent stability of the solid phase under conditions of aggression to the system. Through the immunochromatographic test, DTH10.1 was able to reproduce the ELISA results with this protein, generating a sensitivity of 77.5% and specificity of 100%. It follows that both developed methodologies are promising methods for the diagnosis of hepatitis D.

Keywords: Hepatitis D. Serological diagnosis. ELISA. Immunochromatographic test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial do HDV.....	14
Figura 2 - O vírus da hepatite D	15
Figura 3 - Representação das três formas de RNA do HDV	16
Figura 4 - Replicação do genoma do HDV	17
Figura 5 - Ciclo de replicação do HDV dentro dos hepatócitos	18
Figura 6 - Edição do RNA antigenômico.	19
Figura 7 - Representação gráfica dos vírus das hepatites A, B, C, D e E.....	21
Figura 8 - Evolução clínica da A. coinfeção e B. superinfecção pelo HDV.	23
Figura 9 - Perfil sorológico da coinfeção por HDV e HBV	27
Figura 10 - Perfil sorológico da superinfecção por HDV.....	27
Figura 11 - Etapas do processo de ELISA indireto	29
Figura 12 - Estrutura do teste imunocromatográfico lateral.....	30
Figura 13 - Possíveis leituras no teste imunocromatográfico lateral.....	30
Figura 14 - Registros de patentes relacionadas a hepatite D	31
Figura 15 - Representação esquemática do vetor de clonagem pET-24a(+).	39
Figura 16 - Sequência consenso do HDAg com regiões antigênicas em sobrelinha.....	39
Figura 17 - Sequência das proteínas recombinantes.....	40
Figura 18 - Titulação da proteína a ser conjugada.....	46
Figura 19 - Parâmetros a serem padronizados no teste imunocromatográfico.....	48
Figura 20 - Alinhamento das sequências consenso do HDAg obtidas para os oito genótipos do HDV com a proteína recombinante	49
Figura 21 - Análise da proteína DTH10.1 por SDS-PAGE.....	51
Figura 22 - Teste de solubilidade da proteína recombinante DTH10.....	52
Figura 23 - Titulação do antígeno DTH10.1	54
Figura 24 - Titulação das amostras de soro.	54
Figura 25 - Titulação do conjugado anti-IgG	55
Figura 26 - Uso de diferentes concentrações de BSA na solução de bloqueio	55
Figura 27 - Titulação do antígeno DTH10	56
Figura 28 - Titulação das amostras de soro	56
Figura 29 - Uso de diferentes concentrações de BSA na solução de bloqueio	57
Figura 30 - Análise de reação cruzada com a proteína recombinante.	58
Figura 31 - Sensibilidade e Especificidade pela curva ROC para ELISA com a DTH10.1.....	58
Figura 32 - Sensibilidade e Especificidade pela curva ROC para ELISA com a DTH10.....	59

Figura 33 - Teste de estabilidade acelerada.....	60
Figura 34 - Determinação da concentração de proteína a ser impregnada.....	62
Figura 35 - Determinação do tratamento da nitrocelulose e tampão de corrida.....	63
Figura 36 - Determinação volume de amostra e tempo de leitura.....	63
Figura 37 - Parâmetros determinados para o teste imunocromatográfico para diagnóstico para hepatite D.....	64
Figura 38 - Determinação da sensibilidade e especificidade do teste	64

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Características dos cinco principais vírus causadores das hepatites virais	21
Quadro 2 - Marcadores utilizados no diagnóstico sorológico de hepatite B e D	26
Tabela 1 - Interpretação do diagnóstico sorológico para hepatite D	26
Tabela 2 - Kits comerciais para o diagnóstico sorológico de hepatite D.....	33
Tabela 3 - Kits comerciais para o diagnóstico molecular de hepatite D	34
Tabela 4 - Dupla entrada para cálculo de sensibilidade e especificidade.....	45
Tabela 5 - Grau de similaridade entre sequências do HDAg de cada genótipo com as proteínas recombinante DTH10.1 e DTH10	50
Tabela 6 - Coeficiente de variação (CV) para testes de repetitividade e reprodutibilidade. ...	60
Tabela 7 - Listagem das amostras utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade e os resultados obtidos utilizando as metodologias de ELISA com a DTH10.1, ELISA com a DTH10 e teste imunocromatográfico com a DTH10.1.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Ampere
Ag	Antígeno
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Au	Ouro
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fc	Fragmento cristalizável do anticorpo
FR	Fator reumatoide
HAV	Vírus da hepatite A
HBcAg	Antígeno core do HBV
HBsAg	Antígeno de superfície do HBV
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDAg	Antígeno delta
HDV	Vírus da hepatite D
HEV	Vírus da hepatite E
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR	Índice de Reatividade
KCl	Cloreto de potássio
kDa	kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
LC	Linha Controle
LoD	Limite de detecção

LT	Linha Teste
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NTCP	<i>Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OMPI	Organização Mundial de Propriedade Intelectual
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Janela de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato-salino
PEG-INF- α	Interferon- α peguilado
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPM	Rotação por minuto
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real via transcrição reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
ssRNA	RNA de fita simples
TBS-T	Tampão Tris-Salino com Tween 20
TMB	3,3',5,5' de tetrametil-benzidina
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Distribuição geográfica	14
1.2	O Vírus	15
1.2.1	Replicação viral	16
1.2.2	O antígeno delta.....	19
1.2.3	Diferentes vírus causadores da hepatite.....	20
1.3	A doença.....	22
1.3.1	Aspectos clínicos da doença.....	22
1.3.2	Tratamento.....	24
1.4	Diagnóstico.....	24
1.4.1	Diagnóstico Sorológico	25
1.4.2	Diagnóstico Molecular	28
1.5	Patentes Registradas	28
1.6	Mercado.....	32
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Materiais	37
4.1.1	Soluções utilizadas	37
4.1.2	Meios de cultura utilizados.....	38
4.1.3	Características do vetor	38
4.1.4	Amostras de soro	39
4.2	Métodos	39
4.2.1	Desenho das sequências DTH10.1 e DTH10	39
4.2.2	Análise das sequências da DTH10.1 e DTH10 por bioinformática	40
4.2.3	Transformação de bactéria competente	40
4.2.4	Expressão da proteína recombinante em E. coli BL21.....	41
4.2.5	Análise de solubilidade da proteína recombinante em E. coli BL21	41
4.2.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)	41
4.2.7	Western blot da proteína recombinante	42
4.2.8	Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade	42

4.2.9	Quantificação das proteínas recombinantes	42
4.2.10	Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.....	43
4.2.10.1	Determinação das condições ideais de reagentes	43
4.2.10.2	Análise de Reação Cruzada	44
4.2.10.3	Determinação da sensibilidade e especificidade	44
4.2.10.4	Teste de estabilidade acelerado	45
4.2.10.5	Repetitividade e reprodutibilidade	45
4.2.11	Desenvolvimento de teste imunocromatográfico de fluxo lateral	45
4.2.11.1	Preparo da solução de ouro coloidal.....	45
4.2.11.2	Conjugação do ouro coloidal.....	46
4.2.11.3	Preparo do suporte do conjugado	46
4.2.11.4	Preparo das membranas de nitrocelulose	47
4.2.11.5	Bloqueio da membrana de nitrocelulose	47
4.2.11.6	Padronização das condições do teste	47
4.2.11.7	Determinação da sensibilidade e especificidade	48
4.2.12	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Análise das sequências da DTH10.1 e DTH10 por bioinformática	49
5.2	Análise de expressão e purificação das proteínas recombinantes	50
5.3	Quantificação da proteína recombinante	53
5.4	Desenvolvimento de um ELISA indireto	53
5.4.1	Determinação das condições ideais de reagentes	53
5.4.2	Análise de reação cruzada	57
5.4.3	Determinação da sensibilidade e especificidade	58
5.4.4	Teste de estabilidade acelerada.....	59
5.4.5	Repetitividade e Reprodutibilidade	60
5.5	Desenvolvimento de teste imunocromatográfico de fluxo lateral	61
5.5.1	Conjugação do ouro coloidal.....	61
5.5.2	Padronização das condições do teste	61
5.5.3	Determinação da sensibilidade e especificidade	64
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO - Certificado de aprovação no CEP	77
	APÊNDICE - Listagem das amostras utilizadas durante o estudo.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição Geográfica

As infecções causadas pelo vírus da hepatite D (HDV) ocorrem em todo o mundo (Figura 1), com prevalência na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, centro e norte da Ásia, África subsaariana e América do Sul (RIZZETTO; PONZETTO; FORZANI, 1991; WEDEMEYER; MANNNS, 2010; AGHASADEGHI *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018; DAW *et al.*, 2018).

Devido a diversidade no genoma do HDV, já foram descritos até o momento oito genótipos diferentes para o vírus, considerando a sequência de nucleotídeos e a distribuição geográfica das infecções (LE GAL *et al.*, 2006; CHAO *et al.*, 2015). O genótipo I (HDV-1) é o mais comum e abrangente de todos e pode ser encontrado na Europa, Oriente Médio, América do Norte e Norte da África (Figura 1). O genótipo II (HDV-2) pode ser encontrado no Japão, Taiwan e Rússia, enquanto o genótipo III (HDV-3) se encontra exclusivamente na América do Sul (Peru, Colômbia, Venezuela e Brasil). O genótipo IV (HDV-4) é encontrado no Japão e Taiwan, enquanto os genótipos V, VI, VII e VIII (HDV-5 ao HDV-8) são encontrados na África (RADJEF *et al.*, 2004; LE GAL *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2017; DAW *et al.*, 2018).

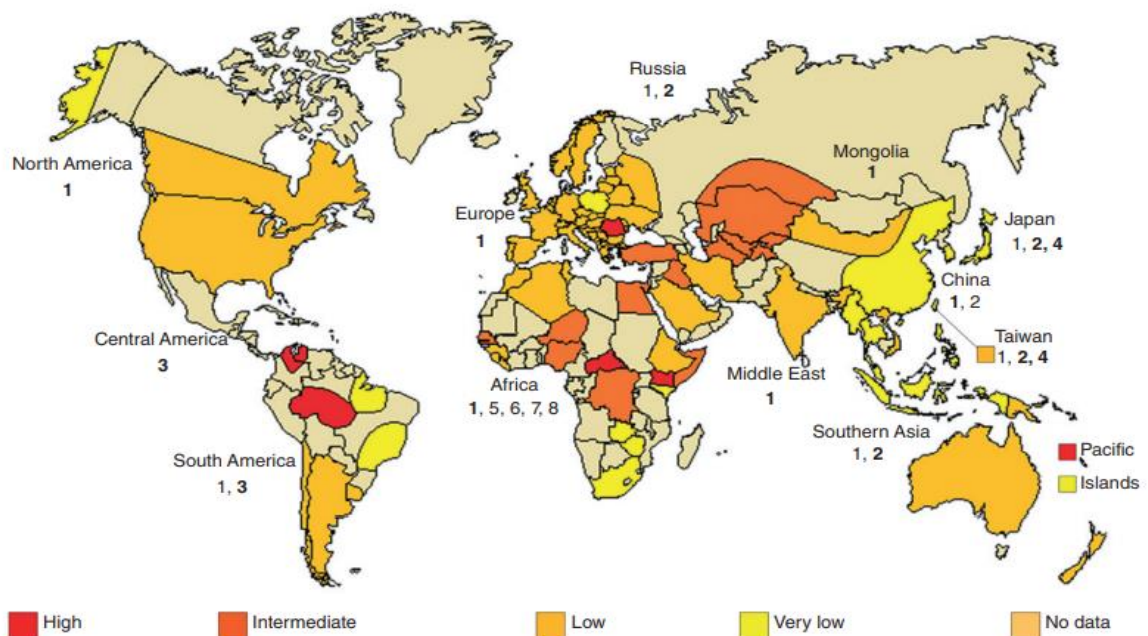


Figura 1 - Distribuição geográfica mundial do HDV. Os números em negrito indicam o genótipo predominante em cada região. Fonte: Pascarella; Negro (2011).

1.2 O Vírus

O vírus da hepatite D foi descoberto em 1977, quando Rizzetto *et al.* detectaram o antígeno delta (HDAg) no hepatócito de pacientes com caso grave de hepatite B. Após experimentos, eles concluíram que esse antígeno era um componente estrutural de um vírus transmissível dependente da presença do vírus da hepatite B (HBV) para completar seu ciclo de infecção (RIZZETTO *et al.*, 1977).

Devido à sua estrutura e sequência únicas, o HDV é classificado como o único membro de um novo gênero, o *Deltavírus*, fato reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017; DAW *et al.*, 2018).

O HDV (Figura 2) é um vírus de aproximadamente 36nm de diâmetro, formado por um genoma de RNA complexado a proteína estrutural HDAg, rodeado por um envelope lipoproteico esférico. Este contém HBsAg, um antígeno de superfície do vírus da hepatite B em suas três isoformas: pequena (S-HBsAg), média (M-HBsAg) e longa (L-HBsAg), tornando o HDV defeituoso por depender do HBV para a sua montagem e propagação (AHN; GISH, 2014; LE GAL *et al.*, 2017; FARCI; NIRO, 2018).

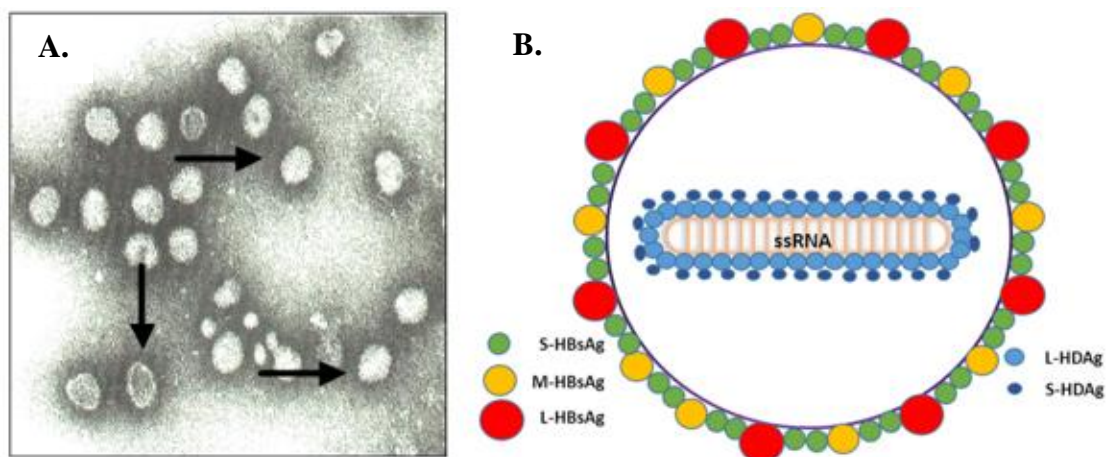


Figura 2 - O vírus da hepatite D **A.** Microscopia eletrônica de transmissão do HDV. As partículas virais estão indicadas pelas setas. **B.** Representação da partícula viral com todos seus componentes. L-HDAg: antígeno delta longo; S-HDAg: antígeno delta pequeno; S-HBsAg: antígeno de superfície do HBV pequeno; M-HBsAg: antígeno de superfície do HBV médio; L-HBsAg: antígeno de superfície do HBV longo; ssRNA: RNA de fita simples. Fonte: Rizzetto (1983); Aldabe *et al.* (2015).

O genoma é composto por uma fita simples de RNA circular com sentido negativo e é considerado o menor genoma viral identificado, apresentando cerca de 1700 nucleotídeos (WEDEMEYER; MANN, 2010; NOUREDDIN; GISH, 2014). Devido ao grande número de

pareamento de bases que ocorre dentro do RNA, este se assemelha a uma haste de fita dupla (ABBAS; AFZAL, 2013; BRICHLER *et al.*, 2014).

Durante seu ciclo de vida o HDV apresenta o RNA em três formas (Figura 3): (i) RNA genômico, (ii) RNA antigenômico, que é uma cópia complementar exata do RNA genômico, e (iii) RNA antigenômico linear, o RNA mensageiro (mRNA). O RNA genômico e antigenômico contêm um domínio ribozima, de cerca de 80 a 100 nucleotídeos, com a atividade de autoclivagem e autoligação, o que a torna essencial para replicação de RNA viral (ABBAS; AFZAL, 2013; NEGRO, 2013).

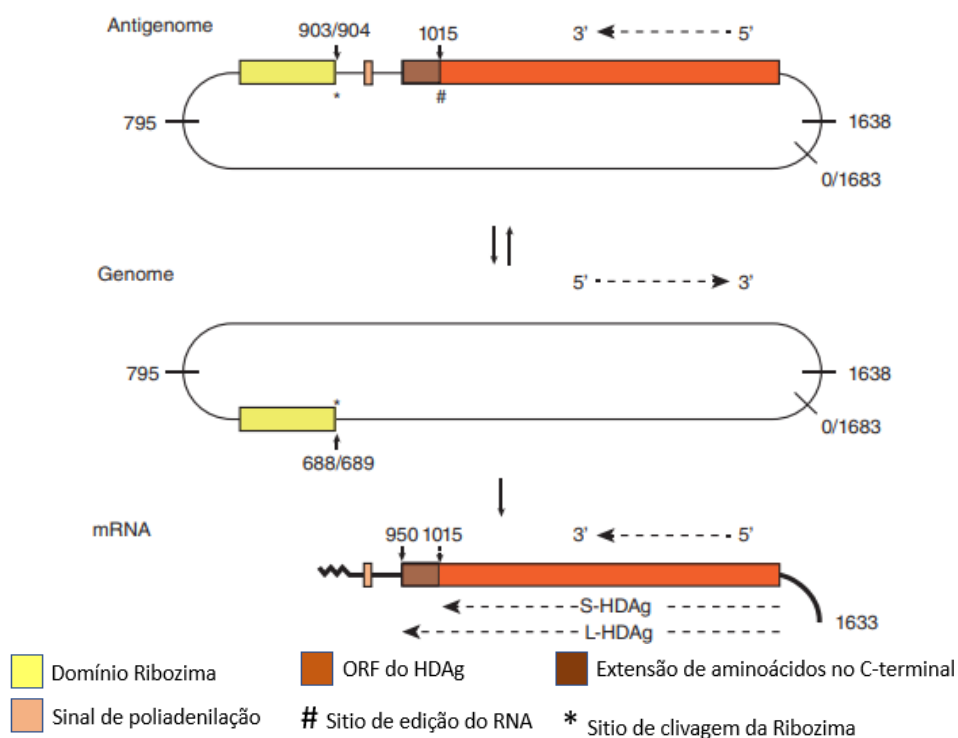


Figura 3 - Representação das três formas de RNA do HDV: RNA genômico, RNA antigenômico e RNA mensageiro. Fonte: Pascarella; Negro (2011).

1.2.1 Replicação viral

O HDV contém apenas uma janela de leitura aberta (ORF – *Open Reading frame*), que é capaz de codificar a única proteína estrutural do vírus, o HDAG, em suas duas isoformas (FARCI; NIRO, 2018; TAYLOR, 2015). Como o vírus não é capaz de codificar sua própria replicase ou RNA polimerase, ele utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para realizar os processos de replicação, transcrição, modificações pós-transcricionais e translacionais (HUANG; LO, 2010; ABBAS; AFZAL, 2013).

Os detalhes do processo de replicação do vírus ainda não estão totalmente esclarecidos, mas sabe-se que ele ocorre dentro de hepatócitos que devem estar infectados pelo HBV e pelo HDV. A infecção do hepatócito ocorre devido à interação do L-HBsAg com o receptor de membrana NTCP (*sodium-taurocholate cotransporting polypeptide*). Este fato explica a dependência do HDV de um envelope composto pelo HBsAg do HBV (AHN; GISH, 2014; ALDABE *et al.*, 2015).

Ao entrar nos hepatócitos o HDV perde o envelope e a ribonucleoproteína (RNA do HDV complexado ao HDAg) é transportada para o núcleo devido a uma sinalização feita pelo sítio de localização nuclear presente no HDAg. Uma vez dentro do núcleo, o RNA genômico é transcrito pela RNA polimerase I em RNA antígenômico no nucléolo, enquanto o RNA antígenômico é transcrito pela RNA polimerase II em novo RNA genômico no nucleoplasma. Esse processo, mostrado na Figura 4, ocorre através de um mecanismo chamado de ciclo de rolamento (*rolling cycle mechanism*) e envolve a replicação unidirecional do RNA genômico para produzir um RNA antígenômico linear de mais de uma unidade de comprimento do genoma, passando duas vezes pelo local de clivagem da ribozima (HUANG; LO, 2010; ABBAS; AFZAL, 2013; NEGRO, 2013). Devido a atividade intrínseca da ribozima, o RNA antígenômico é então clivado entre os nucleotídeos 688 e 689 e as extremidades dos fragmentos formados são ligadas para formar um RNA antígenômico circular, que irá servir de molde para produção do RNA genômico (HUANG; LO, 2010; ABBAS; AFZAL, 2013; NEGRO, 2013; AHN; GISH, 2014).

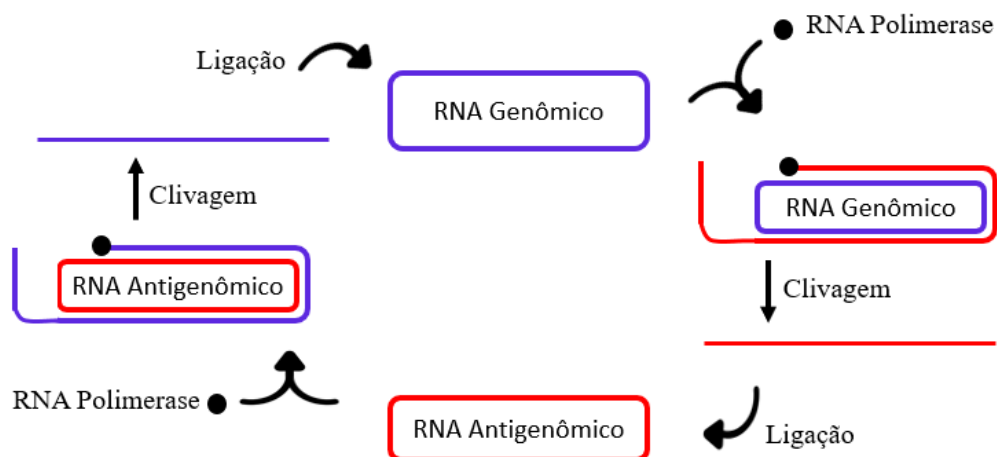


Figura 4 - Replicação do genoma do HDV. Fonte: Autoria Própria (2019).

Também no nucleoplasma, o RNA genômico será transcrito pela RNA polimerase II em mRNA que, por sua vez, migra para o citoplasma, onde é traduzido em S-HDAg e em L-HDAg (AHN; GISH, 2014; ALDABE *et al.*, 2015; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017).

As duas isoformas de HDAG são enviadas para o núcleo onde serão complexadas ao novo RNA genômico formando uma nova ribonucleoproteína. Esta é exportada para o citoplasma onde irá se associar ao envelope composto por HBsAg formando uma nova partícula viral infectante que será liberada da célula, finalizando o ciclo de replicação viral como mostrado na Figura 5. (ALDABE *et al.*, 2015; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017).

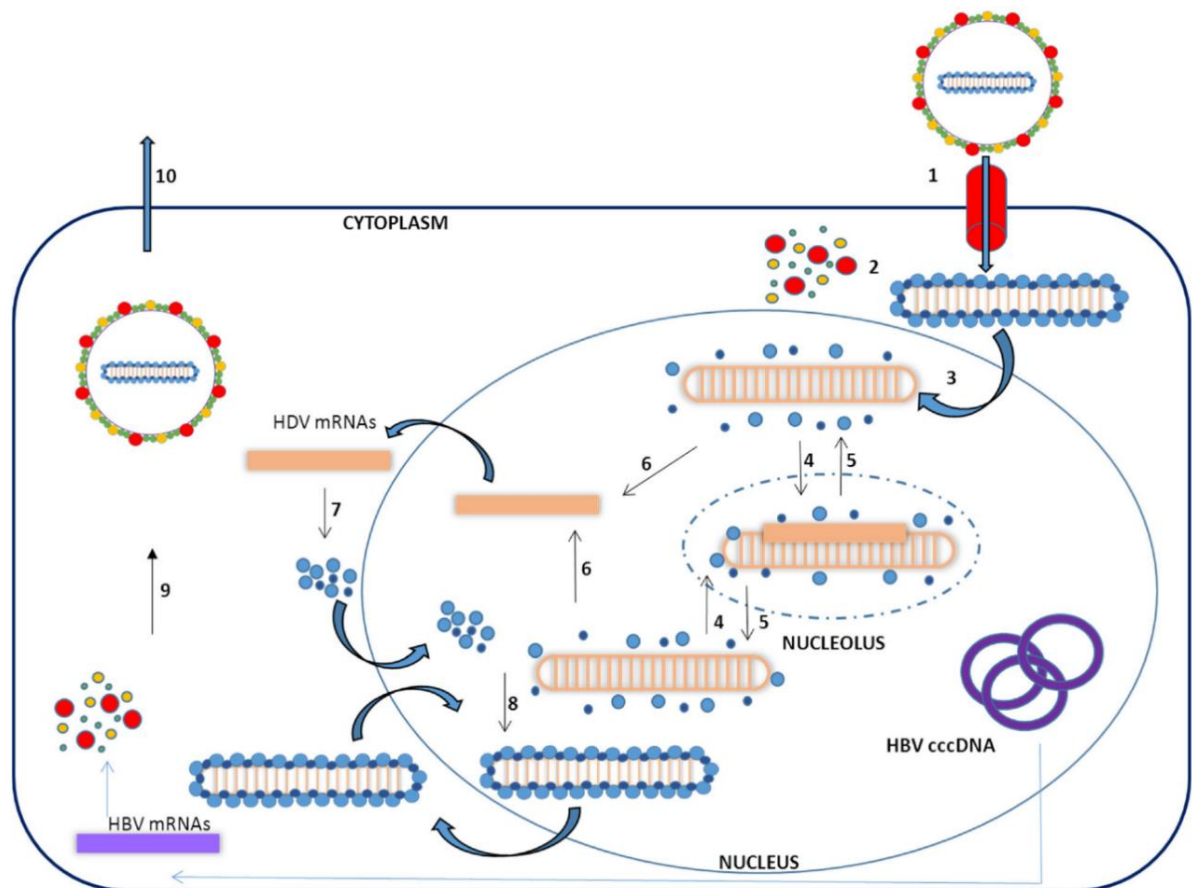


Figura 5 - Ciclo de replicação do HDV dentro dos hepatócitos. (1) Ligação do HDV ao NTCP do hepatócito; (2) perda do envelope viral; (3) transporte da ribonucleoproteína para o núcleo; (4) Transcrição do antígeno genômico no nucléolo. (5) Produção de RNA genômico no nucleoplasma; (6) transcrição do mRNA; (7) Tradução de HDAG; (8) montagem das ribonucleopartículas; (9) tradução do HBsAg no citoplasma e formação da partícula viral; (10) liberação do vírus. Fonte: Aldabe *et al.* (2015).

É, portanto, evidente que o HDV não depende em nada do HBV durante o processo de replicação da ribonucleoproteína, dependendo dele apenas para realizar a infecção da célula, montagem e exportação do vírus (ABBAS; AFZAL, 2013).

1.2.2 O antígeno delta

Durante os estágios mais avançados do ciclo de replicação, algumas moléculas de RNA antigenômico sofrem uma modificação pós-transcricional no códon de parada UAG do gene que codifica o S-HDAg. Essa edição é catalisada pela enzima celular ADAR-1 (*adenosine deaminase acting on RNA*), que substitui uma adenosina por uma inosina, que posteriormente é trocada por uma guanina durante a replicação do genoma, formando o códon UGG (Figura 6). Essa modificação gera a codificação de um triptofano, estendendo a janela de leitura em 57 nucleotídeos até o próximo códon de parada, gerando um antígeno com 19 aminoácidos adicionais no C-terminal, o L-HDAg. (ABBAS; AFZAL, 2013; ALVES *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2015; TAYLOR, 2015; FARCI; NIRO, 2018). Portanto, o genoma viral codifica uma proteína com duas isoformas: a proteína pequena S-HDAg de 24kDa que contém 195 aminoácidos, e a proteína longa L-HDAg de 27kDa que compreende 213 ou 214 aminoácidos, dependendo do genótipo do vírus (CUNHA *et al.*, 2015; VILLIERS *et al.*, 2015).

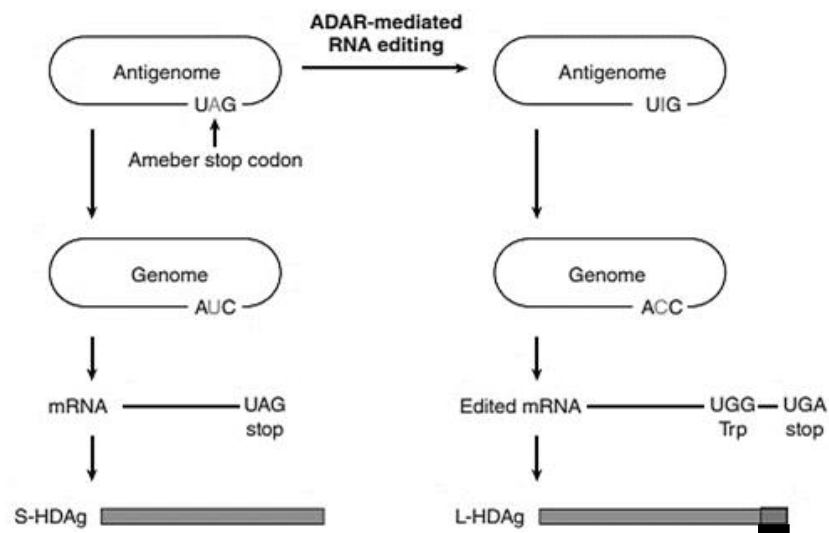


Figura 6 - Edição do RNA antigenômico. Fonte: Pascarella; Negro (2011).

Foi demonstrado que apesar de compartilhar 195 aminoácidos no N-terminal, os 19 aminoácidos adicionais conferem ao L-HDAg funções biológicas distintas da outra isoforma. O S-HDAg ativa a replicação do genoma viral, dependendo de seu status de fosforilação, enquanto o L-HDAg age como um inibidor da replicação promovendo a interação do genoma viral com as três isoformas do HBsAg gerando o empacotamento do RNA em partículas virais (RADJEF *et al.*, 2004; HUANG; LO, 2010; VILLIERS *et al.*, 2015; FARCI; NIRO, 2018). O L-HDAg também é capaz de regular a sua própria síntese ao inibir a replicação viral, o que impede a edição do stop códon necessário para a expressão do L-HDAg (ABBAS; AFZAL, 2013).

As modificações pós-tradicionais são muito importantes para modular as funções das duas isoformas do HDAg, estas são: sumoilação, fosforilação e acetilação para S-HDAg, e acetilação, fosforilação e farnesilação para L-HDAg. A sumoilação é uma modificação pós-traducional recém-conhecida que envolve a conjugação de S-HDAg com uma pequena proteína semelhante à ubiquitina e resulta no aumento da síntese do RNA genômico e mensageiro. A fosforilação do S-HDAg é crucial para sua interação com a RNA polimerase II celular, o que gera um aumento dos níveis de replicação do HDV. A acetilação de ambos os antígenos está associada a modulação da replicação do HDV. A farnesilação é a modificação mais importante do L-HDAg, onde um grupo farnesil (lipídeo) é adicionado no motivo terminal CXXQ sendo importante para ancorar o genoma do HDV ao HBsAg durante a montagem da partícula viral (ABBAS; AFZAL, 2013; ALDABE *et al.*, 2015; VILLIERS *et al.*, 2015; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017; FARCI; NIRO, 2018).

1.2.3 Diferentes vírus causadores da hepatite

As hepatites virais são causadas principalmente por cinco vírus distintos com tropismo primário pelo fígado: o vírus da hepatite A (HAV), da hepatite B (HBV), da hepatite C (HCV), da hepatite D (HDV) e o vírus da hepatite E (HEV). Esses vírus apresentam características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais semelhantes, embora também possuam características próprias (BRASIL, 2005, 2018a; COLAVITTI; GARCIA, 2007).

As hepatites possuem um amplo espectro clínico, que varia desde formas assintomáticas até a insuficiência hepática aguda grave (fulminante), sendo grande parte dos casos assintomática, independente do vírus causador. A distribuição das hepatites virais é mundial, variando de acordo com a região. No Brasil, também há grande variação regional na prevalência de cada hepatite (BRASIL, 2005, 2018a).

Os cinco principais vírus possuem características próprias que ajudam na identificação (Quadro 1). As hepatites A e E são normalmente causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados e geram a doença na fase aguda. As hepatites B, C e D são transmitidas por fluidos corporais de pacientes contaminados e podem evoluir para a fase crônica (WHO, 2019).

Quadro 1 - Características dos cinco principais vírus causadores das hepatites virais

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Família	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviridae</i>	Não possui	<i>Hepeviridae</i>
Envelope	Não possui	HBsAg	Glicoproteínas E1 e E2	HBsAg	Não possui
Capsídeo	VP1, VP2 e VP3	HBcAg	Proteína C	Não possui	HEVAg
Genoma	RNA de fita simples, com polaridade positiva	DNA parcialmente duplicada	RNA com polaridade positivo	RNA circular de fita simples e polaridade negativa	RNA fita simples e polaridade positiva
Tamanho do genoma	7,5kb	3,2kb	9,6kb	1,7kb	7,2kb
Tamanho do vírus	27nm	42nm	65nm	32-37nm	32nm

Fonte: Autoria Própria, 2019.

Com exceção do HBV que possui DNA, todos os outros vírus possuem genoma na forma de RNA, podendo ou não ser envolto por um capsídeo e/ou envelope proteico (figura 7). Os HAV e HEV não possuem envelope, mas possuem capsídeo. Já os HBV e HCV possuem ambos capsídeo e envelope composto por antígenos próprios. Como já mencionado, o HDV possui um envelope composto pela proteína do HBV uma vez que não codifica sua própria proteína de envelope (BRASIL, 2005, 2018a; COLAVITTI; GARCIA, 2007).

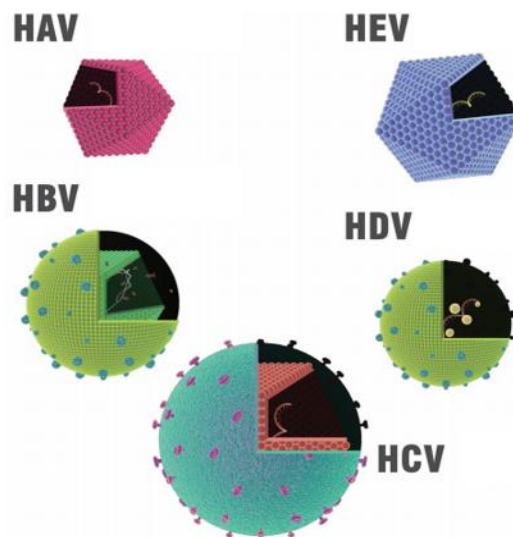


Figura 7 - Representação gráfica dos vírus das hepatites A, B, C, D e E. Fonte: TELELAB (2014).

1.3 A doença

As hepatites virais são doenças infecciosas sistêmicas que geram inflamação no fígado, podendo ser causadas pelos vírus da hepatite A, B, C, D e E. Elas são um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, uma vez que podem ser assintomáticas e não diagnosticadas, resultando em danos ainda mais graves ao fígado (BRASIL, 2008). De acordo com a *World Hepatitis Alliance* (2018), aproximadamente 325 milhões de pessoas vivem com alguma forma de hepatite viral. Sendo uma das principais causas de morte no mundo, as hepatites respondem por 1,34 milhões de mortes por ano, mais do que as mortes por HIV/Aids, tuberculose ou malária.

O HDV causa a forma mais agressiva de hepatite viral, com rápida progressão para cirrose e descompensação hepática, em comparação com as outras formas de hepatite (AHN; GISH, 2014; HUANG; LO, 2014; ALDABE *et al.*, 2015; RIZZETTO; ALAVIAN, 2013). Após o início da campanha de vacinação contra a hepatite B na década de 1990, os casos de hepatite B e D diminuíram e com isso diminuiu-se também a preocupação do governo e da população com essa doença. Acredita-se que com o declínio da conscientização sobre a doença, diminuíram-se os testes, levando a relatos de uma grande redução dos casos (RIZZETTO, 2012; AHN; GISH, 2014). Isso gerou uma queda nos esforços para melhorar a precisão e disponibilidade dos testes de diagnóstico e para ampliar as opções de tratamento. No entanto, nos últimos anos, foi observado uma estabilização e até mesmo aumento dos casos em alguns países (ALDABE *et al.*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 257 milhões de pessoas possuem hepatite B, das quais 15 a 20 milhões também estão infectadas com o HDV (WHO, 2019). Porém esse número se trata de uma estimativa, baseada no cálculo de que 5% dos pacientes com HBV estejam infectados com HDV, uma vez que um número preciso não pode ser determinado devido ao fato de muitos lugares ainda não terem dados relacionados aos casos dessa doença (AHN; GISH, 2014; CHEN *et al.*, 2018).

1.3.1 Aspectos clínicos da doença

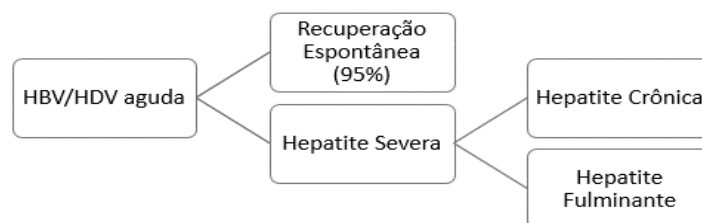
Como o HDV necessita da presença do HBV para montagem e liberação do vírus, só haverá infecção com HDV se também existir a infecção com o HBV. Essa infecção poderá ocorrer como uma coinfeção ou como uma superinfecção (ABBAS; AFZAL, 2013; NEGRO, 2013).

A coinfeção ocorre quando o indivíduo é infectado ao mesmo tempo com HDV e com HBV, desenvolvendo ambas as doenças na forma aguda (Figura 8A). O resultado mais comum dessa forma de infecção é a eliminação de ambos os vírus com desenvolvimento de anticorpos protetores, o que ocorre em 95% dos casos. Porém, em algumas situações, essa infecção pode evoluir para um quadro de hepatite D crônica ou fulminante, podendo gerar casos de insuficiência hepática aguda. (NEGRO, 2013; AHN; GISH, 2014; HUANG; LO, 2014; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017).

Já a superinfecção ocorre quando um indivíduo com hepatite B crônica é infectado com o HDV (Figura 8B). Isso causa uma hepatite D aguda grave que em até 90% dos pacientes evolui para cronicidade. Quando a infecção por HDV se torna crônica, a doença hepática preexistente causada pelo HBV geralmente é agravada e rapidamente progride para cirrose, aumento da descompensação hepática, carcinoma hepatocelular e, eventualmente, morte, quando comparados com pacientes com monoinfecção por HBV. (ALVES *et al.*; 2013; AHN; GISH, 2014; CUNHA *et al.*, 2015; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017).

A forma crônica da hepatite D é a mais grave, independente da forma de infecção, e a que progride mais rapidamente entre todas as hepatites virais crônicas, gerando um quadro de cirrose ainda mais rápido em 70% dos casos (BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017). A infecção por HDV também é capaz de suprimir a replicação do HBV durante a fase aguda da infecção, podendo manter essa supressão mesmo na fase crônica (FONSECA, 2002; XIRIDOU *et al.*, 2009; NEGRO, 2013; HUANG; LO, 2014), porém isso não impede o indivíduo de transmitir ambos os vírus a outras pessoas (XIRIDOU *et al.*, 2009).

A. Co-infecção



B. Superinfecção

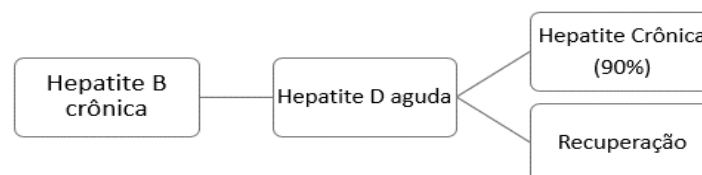


Figura 8 - Evolução clínica da **A.** coinfeção e **B.** superinfecção pelo HDV. Fonte: Autoria Própria (2019).

A transmissão do HDV ocorre da mesma forma que a do HBV, ou seja, por relações sexuais desprotegidas, transfusão de sangue infectado, via parenteral (compartilhamento de agulhas e seringas, tatuagens, *piercings* e outros objetos perfurantes) e de mãe para filho. (BRASIL, 2008, 2018a). A única forma de prevenir a infecção por HDV é através da vacinação contra hepatite B de indivíduos negativos para a doença, uma vez que a vacinação de pessoas já infectadas com HBV não oferece proteção contra o HDV (WHO, 2019).

1.3.2 Tratamento

A maior parte dos tratamentos contra infecções virais envolve a inibição das atividades do vírus em seu processo de replicação. No entanto, o HDV é dependente da maquinaria do hospedeiro para realizar todo o processo de replicação, de forma que esta estratégia não funciona para esse vírus, uma vez que ele não possui alvos para o ataque dos antivirais. Assim, as estratégias atuais têm como objetivo prevenir as interações do HDV com o hospedeiro ou com as proteínas HBsAg que formam o envelope do vírus (CIANCIO; RIZZETTO, 2014)

O único tratamento existente para hepatite D crônica é o mesmo da década de 1980 e se trata do uso prolongado de interferon- α . O mais utilizado é o interferon- α peguilado (PEG-IFN- α) 2a ou 2b durante um ano, porém sua eficiência é baixa, apresentando redução dos títulos virais em apenas 15-40% dos casos. (ALVES *et al.*, 2013; YURDAYDIN *et al.*, 2017a; WHO, 2019). Esse medicamento também está associado a uma variedade de efeitos colaterais, como sintomas semelhantes aos da gripe, eventos neuropsiquiátricos, anemia e trombocitopenia (ALDABE *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2015).

Algumas novas drogas que interferem no ciclo do HDV estão em fase de testes clínicos. Essas drogas são inibidoras do receptor NTCP, polímeros de ácidos nucleicos e inibidores da farnesiltransferase (WEDEMEYER; HARDTKE; MANNS, 2013; FARCI; NIRO, 2018; RIZZETTO, 2018).

1.4 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico de hepatite D é realizado através de histórico médico, exame físico e laboratorial, sendo o último por meio de testes sorológicos e moleculares. Entretanto, existem poucos métodos aprovados para diagnóstico e uma baixa disponibilidade desses métodos, principalmente nas regiões menos desenvolvidas. Também existe uma limitação imposta pela falta de padronização para as metodologias de detecção de RNA do vírus (WHO, 2019).

Os testes laboratoriais são baseados na busca de marcadores específicos da infecção por HBV em pacientes não diagnosticados, seguido da busca de marcadores da infecção de HDV desses pacientes e dos diagnosticados com hepatite B crônica. Os marcadores mais analisados são anticorpos, antígeno e RNA viral (BRASIL, 2018a).

O diagnóstico de hepatite D é feito, primeiramente, através da detecção de imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM) anti-HDV em indivíduos que possuem resultado positivo para HBsAg. Como os indivíduos em fase de recuperação da doença também podem apresentar anticorpos residentes anti-HDV, é necessário a confirmação da infecção contínua através da detecção do RNA do vírus no soro desses indivíduos (WEDEMEYER; MANNNS, 2010; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017; WHO, 2019). Caso seja constatado a presença de RNA viral no soro do paciente, pode-se confirmar a infecção ativa por HDV (ALVES *et al.*, 2013; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017). Também é recomendado que os pacientes com HDV positivo tenham suas funções hepáticas avaliadas, e sejam monitorados para carcinoma hepatocelular, uma vez que são característicos dos estágios avançados da doença (WEDEMEYER; MANNNS, 2010).

1.4.1 Diagnóstico Sorológico

Normalmente apenas pessoas positivas para HBsAg ou pacientes com hepatite B crônica que apresentaram um agravamento do quadro da doença são testados para hepatite D (NOUREDDIN; GISH, 2014). Na maior parte dos casos, o prognóstico de superinfecção é mais grave, o que torna de extrema importância distinguir entre as formas de infecção (DI BISCEGLIE; NEGRO, 1989; NOUREDDIN; GISH, 2014; BOTELHO-SOUZA *et al.*, 2017).

Para isso é feita uma busca dos marcadores específicos (Quadro 2) para a hepatite B, que são HBsAg, anti-HBc, anti-HBs e IgM anti-HBc, e para a hepatite D, IgG e IgM anti-HDV e HDAg. Através do resultado da análise desses marcadores é possível determinar se o indivíduo é positivo para a doença, se ele foi coinfestado ou superinfestado e se a infecção é ativa ou foi curada (FONSECA, 2002; BRASIL, 2005; NUNES; MONTEIRO; SOARES, 2007).

Quadro 2 - Marcadores utilizados no diagnóstico sorológico de hepatite B e D

Marcadores	Definição
HDAg	Antígeno do vírus da hepatite D. Presente na fase inicial da infecção aguda pelo HDV, por curto tempo.
IgM anti-HDV	Anticorpo classe IgM contra o HDV. É detectado no início da doença e indica infecção aguda. Sua presença persistente indica tendência a cronicidade
IgG anti-HDV	Anticorpo classe IgG contra o HDV. É detectado no fim da infecção aguda e sua permanência por longo período com altos títulos indica estado crônico da hepatite D. Pode persistir durante toda a vida.
HBsAg	Antígeno de superfície do HBV. Vai estar presente desde o início da infecção, uma vez que o HDV depende dele para completar seu ciclo. Nos casos de cura passa a ser indetectável.
IgM Anti-HBc	Anticorpo classe IgM contra o HcAg. Marcador de infecção recente por HBV.
IgG Anti-HBc	Anticorpo classe IgG contra o HBcAg. Marcador de infecção passada. Pode permanecer durante toda a vida em indivíduos infectados com HBV.
Anti-HBs	Apresenta-se como anticorpo neutralizante, conferindo imunidade natural para a infecção por HBV.
ALT	Alanina Aminotransferase (ALT) é uma enzima que normalmente se encontra extremamente elevada durante o curso de doenças hepáticas.

FONTE: Fonseca (2002), Nunes; Monteiro; Soares (2007), Prasadthratsint; Stapleton (2019).

A confirmação da infecção (Tabela 1) por HDV se dá pelo resultado positivo para HBsAg e para anti-HDV total. É considerada uma coinfeção quando o paciente apresenta IgM anti-HBc positivo e anti-HBs negativo, e é superinfecção se o paciente apresenta ambos IgM anti-HBc e anti-HBs, negativos. O paciente considerado curado da hepatite D normalmente vai apresentar HBsAg negativo e anti-HDV total positivo devido a permanência do IgG na corrente sanguínea (YURDAYDIN *et al.*, 2007; NOUREDDIN; GISH, 2014).

Tabela 1 - Interpretação do diagnóstico sorológico para hepatite D

Formas	HBsAg	Anti-HBc Total	Anti-HBc IgM	Anti-HBs	Anti-HDV total
Coinfeção	+	+	+	-	+*
Superinfecção	+	+	-	-	+*
Cura	-	+	-	+	+**

*O anti-HDV IgM e IgG em altos títulos **O anti-HDV IgG positivo em baixos títulos. Fonte: Brasil (2008).

No caso da coinfeção (Figura 9), a replicação viral deve acompanhar o aparecimento de HBsAg na circulação. Apesar de haver a produção do HDAg, este raramente é detectado, uma vez que fica por pouco tempo no soro. O IgM anti-HDV fica presente no soro durante 2 a 6 semanas e o IgG anti-HDV pode estar presente em um nível baixo ou talvez seja indetectável (NOUREDDIN; GISH, 2014; HUNT, 2016;).

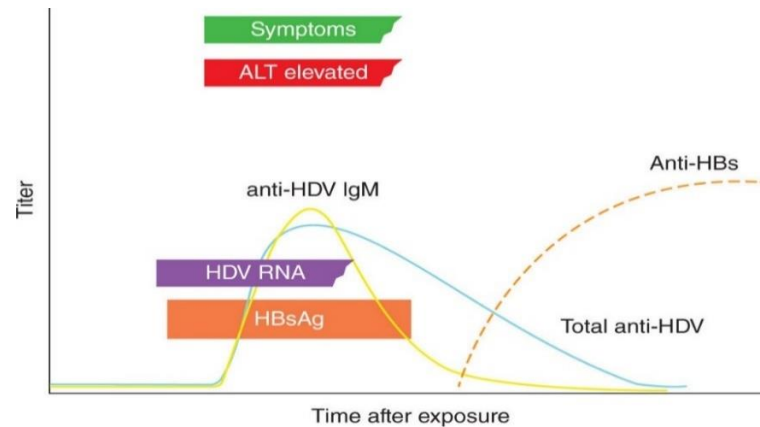


Figura 9 - Perfil sorológico da coinfeção por HDV e HBV. Barra verde: sintomas; barra vermelha: ALT elevado; barra roxa: RNA do HDV; barra laranja: HBsAg; linha amarela: IgM anti-HDV; linha azul: anti-HDV total; linha pontilhada marrom: anti-HBs. Fonte: Obgyn Key (2017).

Na superinfecção ocorre um rápido aumento no nível das enzimas hepáticas, principalmente da ALT (Figura 10). O HDAg pode ser detectado no soro, seguido do IgM anti-HDV e do IgG anti-HDV, sendo que o último pode atingir níveis elevados. Como a maior parte dos casos se torna crônica, HBsAg e RNA viral podem ser detectados durante todo o curso da infecção (NOUREDDIN; GISH, 2014; HUNT, 2016).

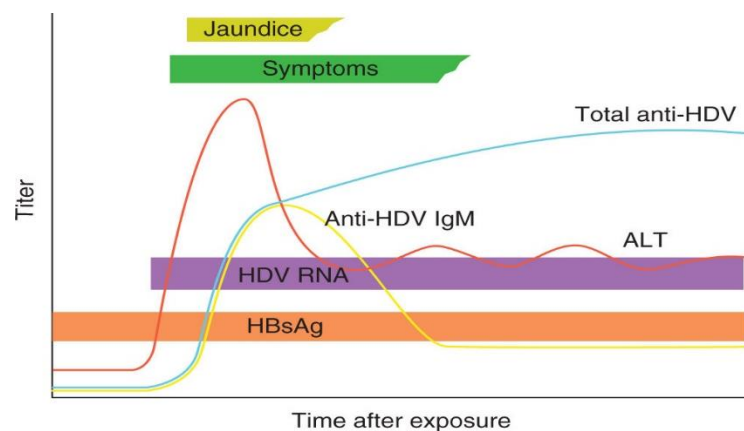


Figura 10 - Perfil sorológico da superinfecção por HDV. Barra verde: sintomas; barra amarela: icterícia; barra roxa: RNA do HDV; barra laranja: HBsAg; linha amarela: IgM anti-HDV; linha azul: anti-HDV total; linha vermelha: ALT. Fonte: Obgyn Key (2017).

O diagnóstico de hepatite D crônica é realizado com base na detecção de altos títulos dos anticorpos IgG ou IgM anti-HDV ou pela presença do HDAg no tecido hepático (NUNES; MONTEIRO; SOARES, 2007).

1.4.2 Diagnóstico Molecular

Após o resultado sorológico positivo para hepatite D, recomenda-se a realização da confirmação da infecção ativa através da detecção do RNA viral (AHN; GISH, 2014). A presença do RNA viral no soro normalmente indica alta infectividade e sua permanência por um longo tempo indica progressão para estado crônico da hepatite D, enquanto seu desaparecimento indica um caso de hepatite D aguda autolimitada, isto é, com cura espontânea (FONSECA, 2002; LEMPP; URBAN, 2017).

A quantificação do RNA do HDV é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo HDV. Seu uso é importante para monitorar a resposta do paciente ao tratamento com PEG-IFN, principalmente a resposta virológica sustentada, que normalmente significa a cura da doença (YURDAYDIN *et al.*, 2017a; PRASIDTHRATHSINT; STAPLETON, 2019).

Atualmente, a detecção do RNA do HDV, através das técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou hibridização molecular, é a única forma confiável de detectar a replicação viral. (WEDEMEYER; MANNS, 2010; BRICHLER *et al.*, 2013). Porém, esse método não é rotineiramente utilizado para o diagnóstico de pacientes, mas sim por laboratórios de pesquisa (FONSECA, 2002; LEMPP; URBAN, 2017). Isso porque durante muito tempo os laboratórios se baseavam em protocolos internos sem um padrão internacional, o que gerava discrepância entre os resultados de diferentes laboratórios (ALVES *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018). Com a criação de um padrão de RNA do vírus em 2013 para servir como controle de qualidade, (YURDAYDIN *et al.*, 2007) espera-se que haja um aumento no desenvolvimento de testes eficientes para detectar o RNA do HDV.

1.5 Imunoensaios para o diagnóstico sorológico

1.5.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

O ELISA é uma técnica simples e rápida capaz de detectar anticorpos ou antígenos ligados a uma superfície sólida sem precisar de equipamentos caros e sofisticados. Ela é um dos imunoensaios mais sensíveis e possui alto valor comercial no diagnóstico de biomarcadores de diversas doenças (LIN, 2015; KONSTANTINOOU, 2017). No ELISA indireto (Figura 11), o

antígeno é imobilizado em placas de poliestireno de 96 poços por absorção passiva. Um tampão de bloqueio é adicionado para saturar todos os locais não ligados no poço seguido da incubação com um anticorpo primário específico para o antígeno, normalmente através de amostras de soro. Um anticorpo secundário conjugado com uma enzima, tipicamente uma peroxidase, é adicionado para se ligar ao anticorpo primário. Por último, o substrato da enzima é adicionado e convertido pela enzima gerando uma mudança de coloração proporcional a quantidade de anticorpo primário presente na amostra (LIN, 2015).

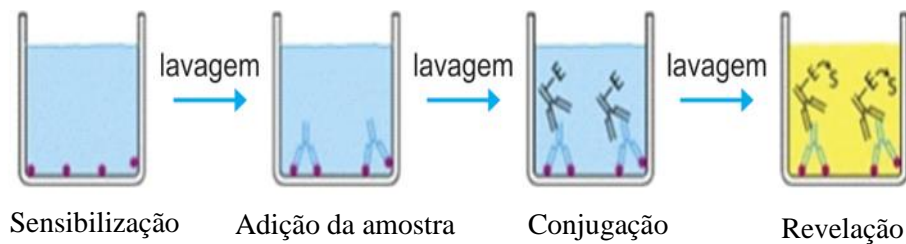


Figura 11 - Etapas do processo de ELISA indireto. Fonte: Câmara (2013).

1.5.2 Teste imunocromatográfico de fluxo lateral

O teste imunocromatográfico de fluxo lateral, também chamado de teste rápido, é uma ferramenta muito utilizada para o diagnóstico de uma variedade de doenças devido a sua fácil e rápida execução, que não depende de estrutura laboratorial elaborada (JAPOLLA, 2015).

Os testes imunocromatográficos são compostos por membranas para absorver amostra e conjugado, membrana de nitrocelulose e membrana de absorção (Figura 12A). A membrana que absorve a amostra promove a distribuição uniforme e controlada da amostra até a porção do conjugado. A membrana que retém o conjugado tem a função de liberar as partículas do detector (anti-IgG conjugado ao ouro coloidal) durante o fluxo da amostra e conduzir o fluxo para a membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose é localizada na região analítica do sistema e apresenta o papel de adsorver as linhas teste e controle e permitir a ligação ou captura dos reagentes de detecção. A membrana de absorção, porção final da tira-teste, tem a finalidade de absorver todo o excesso de amostra e tampão de corrida adicionado no início da tira-teste (MILLIPORE, 2013; O'FARRELL, 2009).

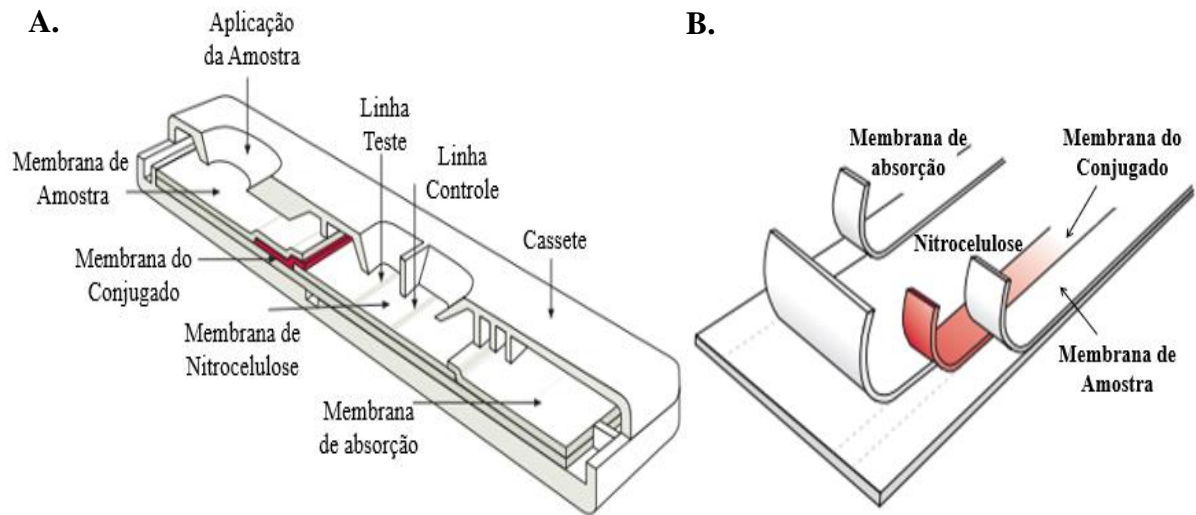


Figura 12 – Estrutura do teste imunocromatográfico lateral. **A.** Componentes do teste imunocromatográfico. **B.** Montagem das membranas no cartão adesivo. Fonte: Millipore, 2013.

Os componentes do teste são sobrepostos e aderidos em um cartão adesivo, denominado *backing sheet* (Figura 12B). A amostra de soro foi adicionada no orifício do cassete na qual está localizada a membrana de amostra, posteriormente foi adicionado o tampão de corrida, e por capilaridade, ocorreu a migração da amostra para o suporte do conjugado formando um complexo antígeno-anticorpo. Devido o contato entre as membranas (membrana contendo o conjugado e membrana de nitrocelulose), esse complexo formado migrou para a membrana de nitrocelulose e os anticorpos específicos foram capturados pelo antígeno específico imobilizado, previamente, na linha teste, e o excesso capturado pela linha controle. Por fim, a membrana de absorção acondicionou o excesso do fluxo (O'FARRELL, 2009).

A leitura do teste é realizada após a amostra ter percorrido toda a tira-teste. Caso seja observado as linhas teste e controle reagentes o resultado do teste é positivo, se houver reatividade apenas na linha controle (LC) o resultado é negativo, e se não houver reatividade em nenhuma das linhas ou apenas na linha teste o resultado é inválido (Figura 13).

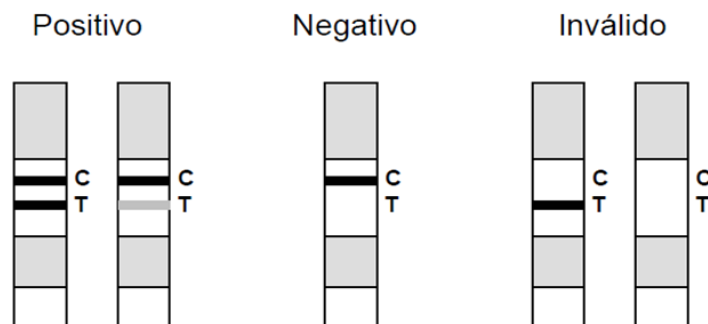


Figura 13 – Possíveis leituras no teste imunocromatográfico lateral. Fonte: Indavidas (2018).

1.6 Patentes Registradas

De acordo com a Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI), “uma patente é um direito exclusivo concedido a uma invenção, que é um produto ou processo que fornece uma nova maneira de fazer algo, ou oferece uma nova solução técnica para um problema”. A patente tem como objetivo proteger uma invenção por um período de tempo, algo muito importante para a comercialização deste produto, principalmente na área da saúde (MEHTA *et al.*, 2017).

Realizamos uma busca de patentes registradas sobre Hepatite D em quatro plataformas digitais, sendo elas o INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), o Latipat, o Espacenet e o Patentscope. Foram encontrados 51 registros (não contabilizando os pedidos de uma mesma patente realizados em diversos países) utilizando os termos ‘hepatite D’, ‘HDV’ e ‘HDAg’.

Para melhor análise dos resultados obtidos, essas patentes foram separadas em três categorias (Figura 14): (i) diagnóstico da hepatite D, (ii) prevenção e tratamento da doença, e (iii) outros, que incluem modelos e metodologias de estudo.

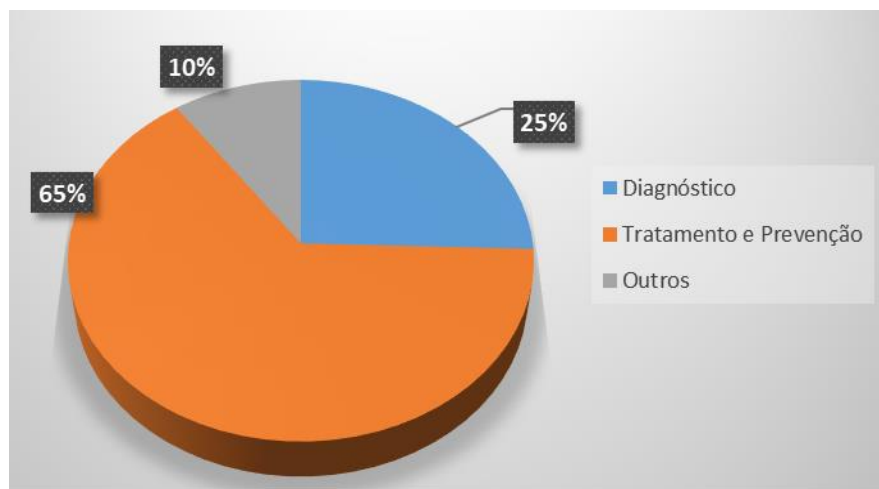


Figura 14 - Registros de patentes relacionadas a hepatite D. Fonte: Autoria Própria (2019).

Foram analisadas as patentes destinadas ao diagnóstico da hepatite D devido a este ser o propósito do trabalho em questão. Assim, entre as patentes registradas, 25% delas possuem essa finalidade, podendo ser para o diagnóstico molecular (57%) ou sorológico (43%).

Durante muito tempo, o diagnóstico molecular foi realizado seguindo protocolos caseiros, muitas vezes eficientes apenas para o genótipo I, por ser o mais prevalente e devido ao fato dos genótipos IV-VIII terem sido descobertos bem mais tarde (BRICHLER *et al.*, 2014). Por esse motivo, foi registrada uma metodologia para detecção e monitoramento

epidemiológico de infecções causadas pelo HDV IV-VIII, utilizando moléculas de ácido nucleico derivadas desses genótipos. Também foram registrados métodos de PCR do cDNA do HDV para detecção do vírus em indivíduos Han, maior grupo étnico da China e cujo diagnóstico pelas metodologias disponíveis no mercado são inadequadas, muitas vezes apresentando baixa sensibilidade e especificidade, além da única metodologia moderadamente adequada ser extremamente cara (JIANHUI, 2018). Algumas das técnicas registradas usam qPCR (PCR quantitativa em tempo real) para quantificar o cDNA do HDV e outras são capazes de detectar os cinco principais vírus causadores das hepatites virais (HAV, HBV, HCV, HDV e HEV) em amostras biológicas com mono ou coinfeção dos vírus, sendo a principal diferença entre os registros a metodologia usada.

Para o diagnóstico sorológico da hepatite D, foram registradas patentes de sequências de peptídeos similares ou antígenos do HDAg. Entre os peptídeos similares há peptídeos expressos por vetores recombinantes e peptídeos sintéticos estabilizado em composições ácidas, ambos para uso em imunodiagnóstico. Também foi registrada uma sequência de nucleotídeos que codifica os aminoácidos 20 a 74 do HDAg e um conjunto de pequenos domínios antigênicos derivados do HDAg com alta reatividade para anticorpos totais, ambos para serem usados em diagnóstico por ELISA e potencialmente como um antígeno vacinal.

1.7 Mercado

Após a descoberta do HDV, vários testes comerciais para sua detecção foram desenvolvidos, principalmente testes sorológicos. Esses testes são rotineiramente utilizados em todo o mundo e é a principal forma de diagnóstico da doença, sendo em alguns lugares a única forma de fazê-lo, apesar das dificuldades de sua obtenção (AHN; GISH, 2014).

Durante os últimos 42 anos após a descoberta do HDV, algumas empresas desenvolveram kits sorológicos para o diagnóstico de hepatite D, dentre as quais podemos citar a DiaSorin, Diagnostic BioProbes (Dia.Pro), General Biologicals, Adaltis, Abbott Laboratories e Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics. Algumas informações sobre esses kits se encontram na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Kits comerciais para o diagnóstico sorológico de hepatite D

Empresa	Kit Comercial	Metodologia	Sensibilidade/ Especificidade	Status no Mercado
	LIAISON® XL MUREX Anti- HDV	Imunoensaio por Quimioluminescência	100% 99.35%	Disponível
DiaSorin	ETI-AB- DELTAK-2	ELISA	99.42% 98.99%	Descontinuado
	ETI-DELTA- IGMK-2	ELISA	99.52% 99%	Descontinuado
	ETI-DELTAK-2	ELISA	100% 99%	Descontinuado
Dia.Pro	HDV Ag	ELISA	>98% >98%	Disponível
	HDV Ab	ELISA	>98% >98%	Disponível
	HDV IgM	ELISA	>98% >98%	Disponível
General Biologicals	GB HDV Ab	ELISA	100% 97,95% (soro) 97,12% (plasma)	Disponível
Adaltis	Anti-HDV IgM kit	ELISA	>98% >98%	Descontinuado
	Anti-HDV kit	ELISA	>98% >98%	Descontinuado
Abbott Laboratories	Abbott anti-HD	Radioimunoensaio	Não encontrado	Descontinuado
Diagnostic Automation / Cortez Diagnostics	HDV IgG ELISA Test	ELISA	100% 100%	Disponível
	HDV IgM ELISA kit	ELISA	100% 100%	Disponível

Fonte: Autoria Própria (2019).

Apesar dos elevados valores de sensibilidade e especificidade indicados pelas empresas, nem sempre eles são reproduzidos na prática. Brichler *et al.* (2014) fez uma comparação entre diversos produtos destinados ao diagnóstico, tanto sorológico quanto molecular, e observou que algumas amostras infectadas com um genótipo diferente do I ou com um título de anticorpos baixo foram erroneamente diagnosticadas.

A quantificação do RNA viral vem sendo considerada a melhor forma de confirmação da infecção presente pelo HDV. Recentemente, diversas empresas desenvolveram testes comerciais para quantificação de RNA do HDV (Tabela 3), baseados na metodologia de RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real via transcrição reversa), como é o caso da Roche, Aj-Roboscreen, VL-Diagnostics, Sacace Biotechnologies e Liferiver.

Tabela 3 - Kits comerciais para o diagnóstico molecular de hepatite D

Empresa	Kit Comercial	Metodologia	Genótipo	Sensibilidade (LoD)/ Especificidade	Status no Mercado
Roche	LightMix® Kit HDV	PCR	1	10 cópias Não informado	Disponível
Aj-Roboscreen	RoboGene HDV RNA <i>Quantification</i> Kit 2.0	RT-qPCR	Todos	6 UI/mL 100%	Disponível
VL-Diagnostics	LIPSGENE □ HDV Kit	RT-qPCR	1, 2, 5-8	< 100 UI/mL 100%	Disponível
Sacace Biotechnologies	HDV Real- TM Quant	RT-qPCR	Não informado	30 cópias/mL 100%	Disponível
Liferiver	HDV Real Time RT-PCR Kit	RT-qPCR	Não informado	1×10 ³ cópias/mL Não informado	Descontinuado

Fonte: Autoria Própria (2019).

Brichler *et al.* (2013) avaliou a performance de alguns produtos comerciais capazes de quantificar, em sua maioria, todos os genótipos e observou que eles não são muito eficazes em quantificar a carga viral do HDV como prometido, principalmente para os genótipos diferentes do I.

Dessa forma, pode-se concluir que apesar do mercado apresentar produtos comerciais para detecção sorológica e molecular da hepatite D com altos valores de sensibilidade e especificidade, eles não são bons em detectar os genótipos II-VIII (COLLER *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Um estudo de meta-análise realizado por Chen *et al.* (2018) sugere que aproximadamente 10% dos pacientes HBsAg positivos também estão infectados com o HDV, o que aumenta o número de casos de hepatite D para 62-72 milhões, um valor bem acima do considerado. Assim, é de grande importância que todos os pacientes com infecção crônica por HBV façam o diagnóstico para HDV. Isso ajudaria na determinação do número de casos de infecção por HDV e levaria a intervenções terapêuticas nos estágios mais iniciais da doença, podendo evitar as complicações hepáticas características da hepatite D que são mais comuns nos casos de superinfecção (COLLER *et al.*, 2018; MENTHA *et al.*, 2019).

Apesar de já existir alguns testes comerciais sorológicos e moleculares para o diagnóstico da hepatite D, eles são de difícil obtenção nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, que normalmente são as regiões com maior prevalência de casos (BINH *et al.*, 2018). Portanto, são necessárias mais pesquisas visando o desenvolvimento de kits de diagnóstico para a hepatite D que possuam alta sensibilidade e especificidade para todos os oito genótipos do vírus e que sejam financeiramente viáveis para obtenção em países subdesenvolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir duas proteínas recombinantes imunogênicas do vírus da hepatite D e a partir destas prototipar um método sorológico de diagnóstico para a doença.

3.2 Objetivos específicos

- Desenhar a sequência da proteína DTH10.1 e DTH10 a ser sintetizada;
- Analisar a sequência das proteínas através de programas de bioinformática;
- Expressar as proteínas recombinantes usando *Escherichia coli* como sistema de expressão;
- Purificar as proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade;
- Desenvolver e prototipar testes sorológicos por ELISA para o diagnóstico da hepatite D;
- Desenvolver e prototipar teste imunocromatográfico para o diagnóstico de hepatite D.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Soluções utilizadas

1. Solução tampão de ligação à coluna: Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 30 mM, ajustado para pH 8.0.
2. Solução tampão de eluição: Fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, ajustado para pH 8.0.
3. Tampão de amostra 4X: Tampão Tris-HCl 0,5M + SDS 0,4% (m/v) pH 6.8, SDS 10% (m/v), Glicerol 15% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (v/v) e beta-mercaptoetanol 8% (v/v).
4. Solução tampão de corrida eletroforética 5X: Tris 125mM, Glicina 1M e SDS 0,5% (m/v), ajustado para pH 8.3.
5. Solução corante: *Coomassie Blue G-250* 0,1% (m/v), etanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).
6. Solução descorante: Etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).
7. Solução TBS-T: Tris base 20mM, NaCl 140mM e Tween-20 0,05% (v/v).
8. Solução tampão carbonato: Carbonato de sódio 15mM e Bicarbonato de sódio 85mM, ajustado para pH 9.5.
9. Solução de bloqueio para ELISA: Sacarose 87mM, NaCl 150mM e BSA 1% (m/v), ajustado para pH 7.4.
10. Solução diluente de amostra: Na₂HPO₄ 100mM, KH₂PO₄ 17mM, NaCl 150mM, KCl 28mM, BSA 1% (v/v), Sacarose 2% (m/v), D-manitol 1% (m/v), Proclin 0,1% (v/v), Tween-80 0,05% (v/v) e ajustado para pH 7.4.
11. Solução de lavagem 10X: Na₂HPO₄ 100mM, KH₂PO₄ 18mM, NaCl 1,5M, KCl 28mM, Proclin 0,1% (v/v) e Tween-20 1% (v/v), ajustado para pH 7.4.
12. Solução de parada: H₂SO₄ 0,5M.
13. Tampão hepes: Hepes 20mM, ajustado para pH 7.4.
14. PBS 10X: NaCl 1,4M, Na₂HPO₄ 100mM, KH₂PO₄ 20mM e KCl 27mM, ajustado para pH 7.25.

15. Solução de bloqueio de conjugação 10X: Borato 20m e, BSA 10%, ajustado para pH 8.0.
16. Solução tampão de armazenamento: Borato 10mM, BSA 3% (m/v), Sacarose 3% (m/v) e Azida 0,05% (m/v), ajustado para pH 7.5.
17. Solução tampão fosfato: Fosfato 10mM, ajustado para pH 7.0.
18. Solução de bloqueio de membrana: Tris base 0,1M e BSA 2% (m/v), ajustado para pH 7.6.
19. Solução de lavagem de membrana: Na₂PO₄ 5mM e Triton X-100 0,01% (v/v), ajustado para pH 7.55.
20. Solução tampão de corrida de teste imunocromatográfico: Borato (0,05M, 0,07M ou 0,08M), Tween-20 0,5% (v/v), Azida 0,05% (m/v) e BSA 2% (m/v), ajustado para pH 8.2.

4.1.2 Meios de cultura utilizados

1. Meio líquido LB (Luria Bertani): Triptona 1% (m/V), extrato de levedura 0,5% (m/V) e NaCl 1% (m/V).
2. Meio líquido LB-kana: meio LB e kanamicina 100µg/mL (concentração final).
3. Meio sólido LB-ágar: meio LB e ágar 1,5% (m/V).

4.1.3 Características do vetor

O vetor pET-24a(+), representado na Figura 12, é utilizado para expressão *in vitro* de proteínas recombinantes através do promotor T7. Ele possui uma sequência de 5,3kb que codifica 6 resíduos de histidina (6xHis), origem de replicação, marcador de resistência a kanamicina, promotor T7, terminador de transcrição T7, sítio múltiplo de clonagem (MCS) com sítios de clivagem de várias enzimas de expressão, *operon* da lactose e seu promotor.

A presença dos 6 resíduos de histidina na extremidade amino terminal permite a purificação da proteína recombinante por coluna quelante carregada com níquel.

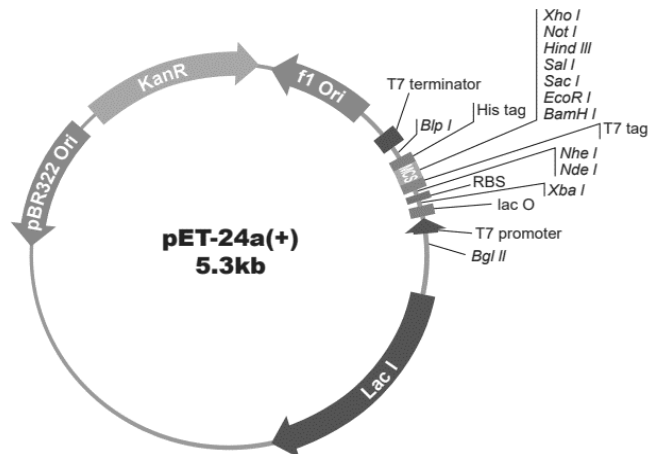


Figura 15 - Representação esquemática do vetor de clonagem pET-24a(+). Fonte: www.genscript.com, Acesso em: 13 de junho de 2019.

4.1.4 Amostras de soro

As amostras de soro de hepatite B, C e D utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Virologia Molecular, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Rondônia. Todas as amostras são identificadas por códigos e em nenhum momento foi realizado algum contato com os doadores. As amostras de doadores saudáveis e com níveis de fator reumatoide alterados são provenientes de indivíduos de Minas Gerais. A realização desse trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE 18988718.0.0000.5149).

4.2 Métodos

4.2.1 Desenho das sequências DTH10.1 e DTH10

Coller *et al.* (2018) obtiveram uma sequência de aminoácidos consenso para o HDAG, a partir de 230 sequências compreendendo principalmente as do genótipo I, e as analisaram em busca de regiões antigênicas, que foram denominadas peptídeos 1-7, como mostrado na Figura 13. A partir dessa análise, desenhamos os genes sintéticos para duas proteínas, a DTH10.1 de 534 pares de bases e a proteína DTH10 de 651 pares de bases.

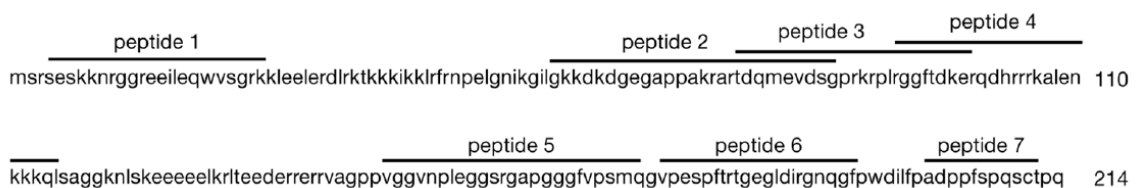


Figura 16 - Sequência consenso do HDAG com regiões antigênicas em sobrelinha. Fonte: Coller *et al.* (2018).

Assim, a sequência da proteína recombinante DTH10.1 (Figura 14A) foi baseada em uma sequência consenso do HD_{Ag} e compreende as regiões dos sete peptídeos mostrados na Figura 13, adicionados de alguns aminoácidos para gerar uma proteína estável, enquanto a proteína DTH10 (Figura 14B) compreende toda a sequência consenso obtida. As duas sequências foram sintetizadas pela empresa GenScript e clonadas no vetor pET-24a(+), com expressão otimizada para *E. coli*.

A.	<p>MSESKKNRGGREEILEQWVSGRKKGGGILGKKDKDGEGAPPAKRART DQMEVDSGTDQMEVDSGPRKRPLRGGFTDKERRGGFTDKERQDHRR RKALENKKKQISAGGGPVGGVNPIEGGSRGAPGGGFVPSMQVPESPFT RTGEGIDIRGNQGFPWDILFPADPPFSPQSCTPQLEHHHHHH</p>
B.	<p>MSRSESKKNRGGREEILEQWVSGRKKLEELERDIRKTKKKIKKLRFRNP ELGNIKGILGKKDKDGEGAPPAKRARTDQMEVDSGPRKRPLRGGFTD KERQDHRRRKALENKKKQISAGGKNISKEEEEELKRLTEEDERRRRV AGPPVGGVNPIEGGSRGAPGGGFVPSMQGVPEPFTRTGEIDIRGNQG FPWDILFPADPPFSPQSCTPQLEHHHHHH</p>

Figura 17 - Sequência das proteínas recombinantes. **A.** DTH10.1 e **B.** DTH10.

4.2.2 Análise das sequências da DTH10.1 e DTH10 por bioinformática

A partir de sequências depositadas no *GenBank*, foi feito um alinhamento do HD_{Ag} de cada um dos oito genótipos para gerar uma sequência consenso, utilizando os programas *Protein BLAST* e *Multiple Align Show*. Em seguida foi feito um alinhamento da proteína DTH10.1 e da DTH10 com o HD_{Ag} de cada genótipo para determinar a similaridade das proteínas.

Também foi realizado análise preditiva de algumas propriedades bioquímicas da DTH10.1 e DTH10, como tamanho, ponto isoelétrico e solubilidade, utilizando as ferramentas ProtParam e Protein-Sol.

4.2.3 Transformação de bactéria competente

As preparações das bactérias competentes foram realizadas de acordo com protocolo de competência com cloreto de cálcio, como previamente descrito (SAMBROOK *et al.*, 1989). Aproximadamente 10ng do vetor pET-24a-DTH10.1 ou do vetor pET-24a-DTH10 foram adicionados a 100µL de bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3). O tubo com as células foi incubado em gelo por 30 minutos, em seguida submetido a choque térmico (42 °C) por 1 minuto

com repouso de 2 minutos no gelo. Adicionou-se 900 μ L de meio LB e deixou-se incubando a 37 °C sob agitação por 1 hora. Dessa mistura, 100 μ L foi plaqueado em 25 mL de meio sólido LB contendo 25 μ L de kanamicina (100 mg/mL). A placa foi incubada por 16 horas a 37 °C.

4.2.4 Expressão da proteína recombinante em *E. coli*

A bactéria *E. Coli* BL21(DE3) é uma linhagem que possui o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lacUV5*, cuja expressão ocorrerá após a adição de IPTG (indutor) no meio.

Uma colônia da bactéria *E. Coli* BL21 resistente a kanamicina foi inoculada em 5mL de meio líquido LB-kana e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação. Foi realizada uma diluição (1%) de 2,5mL dessa cultura em 250mL de meio líquido LB-kana, seguido da incubação a 37°C sob agitação. Após atingida uma DO_{600nm} de 0,6-0,8, foi retirado 1mL da cultura para posterior análise da fração não induzida e adicionado 125 μ L de IPTG para uma concentração final de 0,5mM. Procedeu-se então uma incubação de 3 horas a 37°C sob agitação. Para análise da expressão da proteína DTH10 a cultura foi incubada também a 20°C por 18h.

4.2.5 Análise de solubilidade da proteína recombinante em *E. coli* BL21

Após o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 8000 RPM por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuscitado em 25mL de tampão de ligação à coluna e foi adicionado a essa suspensão celular 250 μ L de DTT (agente redutor), 125 μ L de benzamidina (inibidor de proteases) e 250 μ L de PMSF (inibidor de proteases), para concentração final de 5mM, 5mM e 1mM, respectivamente.

A suspensão celular foi lisada no homogeneizador Emulsiflex C3 durante um período de 5 minutos, seguido de centrifugação a 40.000g, 4°C por 30 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e o *pellet* (fração insolúvel) foi ressuscitado em água.

4.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)

Para visualizar a expressão da proteína recombinante e descobrir se esta foi expressa na fração solúvel ou insolúvel, amostras de ambas as frações e da fração não induzida foram aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme protocolos previamente descritos (LAEMMLI, 1970; SAMBROOK *et al.*, 1989).

Alíquotas das frações não induzida, solúvel e insolúvel foram acrescidas de tampão de amostra 4x para concentração final de 1x e fervidas a 96°C por 5 minutos antes de serem

aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em cuba de eletroforese aplicando 150V em gel de separação de 12,5% e empilhamento de 4% utilizando tampão de corrida diluído para 1x. Após o fim da corrida, o gel foi corado com solução corante por 1 hora a temperatura ambiente e agitação constante, e descorado com solução descorante até as bandas ficarem visíveis e nítidas. A visualização foi feita através do equipamento *ChemiDoc Touch Imaging System*.

4.2.7 Western blot das proteínas recombinantes

As frações não induzidas, extrato bruto total (amostras lisada não centrifugada), solúvel e insolúvel foram submetidas a um SDS-PAGE 12,5% e transferidas para membranas de nitrocelulose em processo de 1 hora e 15 minutos a 0,35A. Em seguida, a membrana foi submetida às seguintes etapas de incubação a temperatura ambiente sob agitação. Primeiro foi realizado o bloqueio da membrana com leite desnatado 10% em TBS-T por 1h, seguida por três lavagens com TBS-T. A membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo anti-histidina em diluição 1:10.000 em TBS-T, lavada três vezes e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo em diluição de 1:6.000. Após uma última etapa de três lavagens, foi realizado a revelação da membrana por quimioluminescência utilizando o reagente Amersham ECL Prime.

4.2.8 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

Ambas as proteínas DTH10.1 e DTH10 foram expressas na forma solúvel após o cultivo em 2 litros de meio de cultura LB-kana. Desta forma, após a lise celular, o sobrenadante foi coletado para purificação por cromatografia de afinidade a metal. Como a proteína recombinante possui uma cauda de resíduos de histidina (*His-Tag*), a purificação foi realizada em uma coluna de níquel. Foi utilizada a coluna HisTrap HP de 5mL e os procedimentos foram realizados de acordo com instruções dos fabricantes. As proteínas recombinantes purificadas foram detectadas por eletroforese SDS-PAGE 12,5%.

4.2.9 Quantificação das proteínas recombinantes

A determinação do rendimento das proteínas recombinantes após purificação foi realizada através da quantificação pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método de determinação envolve a ligação de *Coomassie Brilliant Blue G-250* à proteína analisada e provoca uma mudança na cor do corante proporcionalmente a concentração de proteína na amostra analisada.

A curva padrão foi obtida através de diluições contendo 0, 0.125, 0.250, 0.500 e 1 mg/mL de BSA (albumina do soro bovino). As amostras de BSA e das proteínas recombinantes foram preparadas da mesma forma, utilizando 10 μ L das diluições preparadas, 790 μ L de água e 200 μ L de reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e lidas em DO_{595nm}.

4.2.10 Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

A fim de avaliar o potencial para sorodiagnóstico da proteína recombinante DTH10.1 e DTH10, foram realizados testes imunoenzimáticos anti-IgG pela técnica de ELISA, com amostras de pacientes diagnosticados com hepatite D utilizando o seguinte protocolo:

1. Sensibilização da placa com 100 μ L da proteína recombinante diluída em tampão carbonato, seguida da incubação entre 2 e 8°C *overnight*;
2. Bloqueio da placa com 280 μ L da solução de bloqueio por 2 horas a temperatura ambiente. Descarte da solução e secagem da placa por 20 minutos;
3. Adição de 100 μ L de soro diluído em diluente de amostra e incubação da placa a 37°C por 45 minutos;
4. Lavagem da placa 4 vezes com 350 μ L de solução de lavagem;
5. Adição de 100 μ L de solução de conjugado e incubação a placa a 37°C por 30 minutos. Repetição do processo de lavagem;
6. Adição de 100 μ L do substrato TMB e incubar em local escuro por exatamente 15 minutos à temperatura ambiente;
7. Adição de 100 μ L de solução de parada e leitura da absorbância em 450nm.

4.2.10.1 Determinação das condições ideais de reagentes

- **Antígeno:** Para determinar a quantidade de antígeno a ser usado na sensibilização da placa foram testadas diferentes quantidades da proteína variando de 10ng/poço até 1280ng/poço. A escolha da melhor quantidade de proteína é baseada na razão obtida entre a absorbância da amostra positiva dividido pela amostra negativa.
- **Amostra de soro:** Foram testadas oito diluições de soro, de 1:25 à 1:3200, em diluente de amostra. A melhor diluição é a que gera maior razão entre a absorbância da amostra positiva dividido pela amostra negativa.

- **Conjugado:** Foram testadas quatro diluições do conjugado anti-IgG, de 1:5.000 a 1:40.000, em diluente de amostra. A melhor diluição foi escolhida através da análise das absorbâncias das amostras positivas e negativas.
- **Bloqueio:** Foram testadas três formulações da solução de bloqueio, cuja diferença é a concentração de BSA, podendo ter 1%, 2% ou 5% de BSA. O bloqueio foi selecionado através da análise das absorbâncias das amostras positivas e negativas.

4.2.10.2 Análise de Reação Cruzada

Para a análise de reação cruzada foram verificadas amostras negativas para a hepatite D e positivas para outras doenças infecciosas relacionadas, como hepatite B, hepatite C e amostras positivas para fator reumatoide.

4.2.10.3 Determinação da sensibilidade e especificidade

A determinação da sensibilidade e especificidade foi realizada por duas metodologias: dupla entrada e curva ROC. Para isso foram testadas 76 amostras positivas para hepatite D e 103 amostras negativas.

Para determinar o valor de sensibilidade e especificidade do teste por dupla entrada foi necessário determinar primeiro o *cut-off* e o índice de reatividade (IR) do teste.

Cálculo do *cut-off*: $\bar{X}_{\text{Neg}} + (3 \times DP_{\text{Neg}})$, onde \bar{X}_{Neg} é a média das amostras negativas e DP_{Neg} é o desvio padrão das amostras negativas.

O índice de reatividade de uma amostra é obtido através divisão de sua absorbância pelo *cut-off*. Se o índice for maior que 1,1 a amostra é positiva, menor que 0,9 é negativo e entre 0,9 e 1,1 a amostra é indeterminada.

Para calcular a sensibilidade e especificidade foi montado a tabela abaixo.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{76} \times 100 \quad \text{Especificidade} = \frac{D}{103} \times 100$$

Tabela 4 - Dupla entrada para cálculo de sensibilidade e especificidade

		ELISA COMERCIAL	
		POSITIVO	NEGATIVO
ELISA COM A DTH10 ou DTH10.1	POSITIVO	A (Positivo)	B (Falso Positivo)
	NEGATIVO	C (Falso Negativo)	D (Negativo)
	TOTAL	76	103

Fonte: Autoria Própria (2019).

4.2.10.4 Teste de estabilidade acelerado do protótipo do ELISA

São testes destinados a acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto através de condições forçadas de armazenamento, com o intuito de prever o prazo de validade dos produtos nas condições normais de armazenamento (ANVISA, 2016).

Para o teste de estabilidade da fase sólida, as placas sensibilizadas foram armazenadas em uma estufa a 37°C. Avaliação da performance da proteína foi realizada 7, 14, 21 e 28 dias após o armazenamento e o resultado foi comparado com os obtidos de uma placa controle (armazenada a 2-8°C). A agressão da placa a 37°C por sete dias equivale a aproximadamente 12 meses de validade em sua condição ideal de armazenamento a 2-8°C (MENEGHISSE, 2007).

4.2.10.5 Repetitividade e reprodutibilidade

A repetitividade tem o objetivo de avaliar se o produto que está sendo desenvolvido é capaz de repetir os resultados quando uma amostra é testada repetidamente sob as mesmas condições. Já a reprodutibilidade avalia a capacidade de reprodução dos mesmos resultados para uma amostra quando testados em diferentes condições (PEREIRA, 2018). Para o teste de repetitividade foi analisado três amostras em oito replicatas em uma mesma placa e para a reprodutibilidade essas três amostras em replicatas foram analisadas em três dias diferentes.

4.2.11 Desenvolvimento de teste imunocromatográfico de fluxo lateral

4.2.11.1 Preparo da solução de ouro coloidal

Foram produzidas nanopartículas de ouro coloidal de 15nm utilizando o protocolo descrito por SANTOS (2019). A solução de ouro coloidal produzida foi armazenada a 4°C protegida da luz.

4.2.11.2 Conjugação do ouro coloidal

A conjugação foi realizada seguindo o mesmo protocolo para as três proteínas (proteína recombinante DTH10.1, anticorpo anti-IgG e proteína A) a serem conjugadas.

Antes de realizar a conjugação do ouro coloidal foi realizada a titulação da proteína. Para isso foi realizada uma diluição seriada utilizando 15 μ L da proteína diluída em tampão hepes. Após a adição dos 15 μ L da proteína em seis tubos foi adicionado 15 μ L da solução de ouro coloidal. Após 10 minutos foi adicionado 15 μ L de solução PBS 10X e observou-se a mudança de cor. É selecionada a diluição anterior aquela onde houve alteração de cor (Figura 18).

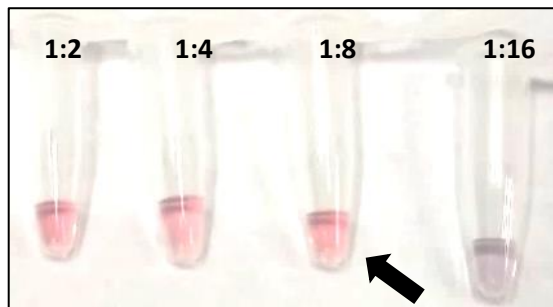


Figura 18 - Titulação da proteína a ser conjugada. Fonte: Autoria Própria (2019).

A conjugação é realizada através da adição da proteína A à solução de ouro coloidal em agitação magnética, seguido do acréscimo da solução de bloqueio para volume final de 1x após 20 minutos. Depois de 30 minutos o conjugado foi centrifugado por 40 minutos, 11.000rpm e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em tampão de armazenamento e mantido na geladeira a 4°C.

4.2.11.3 Preparo do suporte do conjugado

Foram cortadas tiras de membrana de fibra de vidro. Cada tira foi hidratada e mantida a 37°C por duas horas para secagem, seguido da impregnação com 1,5mL de conjugado para cada 30 cm² membrana. Após secagem de duas horas em estufa a 37°C, as membranas foram armazenadas em ambiente com baixa umidade.

4.2.11.4 Preparo das membranas de nitrocelulose

Como a proteína DTH10.1 apresentou o melhor desempenho no ELISA, ela foi a única avaliada no teste rápido. A DTH10.1 purificada foi dialisada com 2 litros de tampão fosfato e novamente quantificada pelo método de Bradford.

A membrana de nitrocelulose foi aderida ao cartão adesivo e realizou-se a impregnação da linha teste e linha controle, mantendo uma distância de aproximadamente 1cm entre elas, com o auxílio do dispensador automático (Autokun). A linha teste é composta pela proteína DTH10.1 e a linha controle pela proteína A, que possui alta afinidade pela porção Fc dos anticorpos, em especial do IgG.

4.2.11.5 Bloqueio da membrana de nitrocelulose

O processo de bloqueio tem o objetivo de impedir que ocorram interações inespecíficas durante o teste. As membranas foram submetidas a um processo de bloqueio composto por uma incubação em solução de bloqueio sob agitação por 15 minutos e 3 etapas de lavagem de dois minutos.

4.2.11.6 Padronização das condições do teste

Para determinar a melhor condição de realização do teste imunocromatográfico para hepatite D foram analisados alguns parâmetros (Figura 19) como a conjugação, concentração do antígeno, tratamento da membrana de nitrocelulose, tampões de corrida, concentração da proteína A utilizada na linha controle, volume de amostra e tempo de leitura.

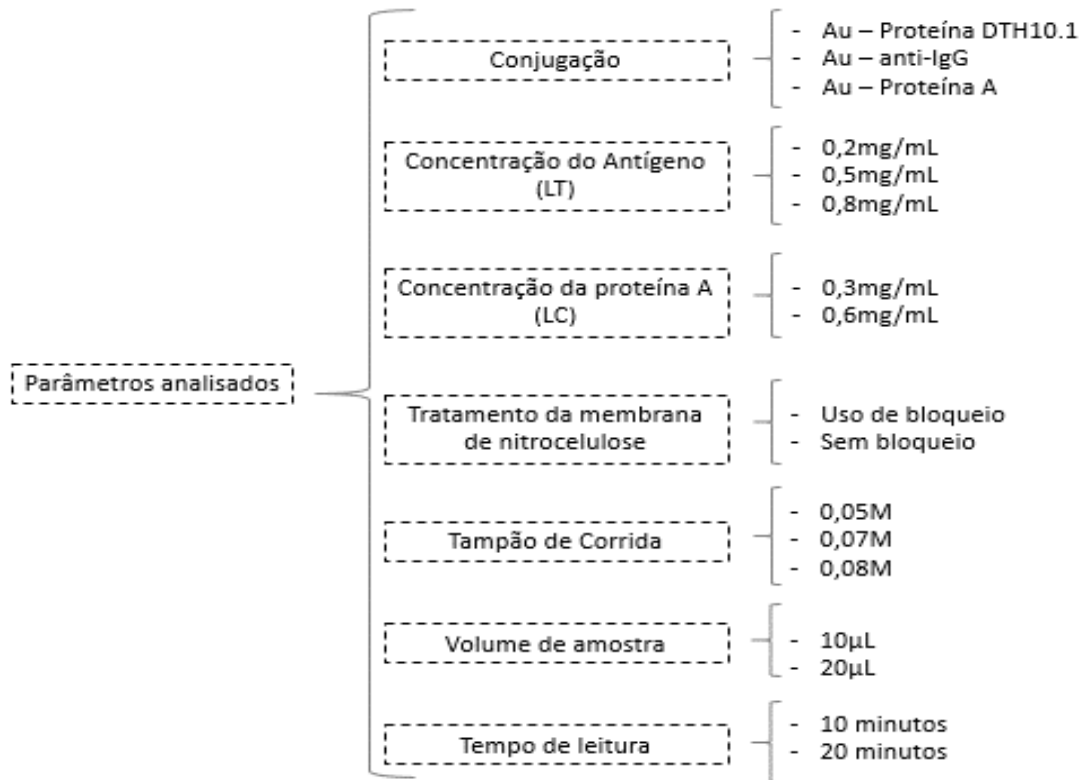


Figura 19 - Parâmetros a serem padronizados no teste imunocromatográfico. Fonte: Autoria Própria (2019).

4.2.11.7 Determinação da sensibilidade e especificidade

A determinação da sensibilidade e especificidade do teste foi calculada a partir de 49 amostras positivas de hepatite D e 20 amostras de pacientes saudáveis. O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\text{Sensibilidade: } \frac{P}{AP} \times 100 \qquad \text{Especificidade: } \frac{N}{AN} \times 100,$$

onde AP são as amostras positivas, P são as amostras positivas que apresentaram reatividade na linha teste, AN são as amostras negativas e N são as amostras negativas que não apresentaram reatividade na linha teste.

4.2.12 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos programas Excel 2016 e *GraphPad Prism 7*.

5 RESULTADOS

5.1 Análise das sequências da DTH10.1 e DTH10 por bioinformática

Através dos alinhamentos de sequências depositadas na plataforma *GenBank* foi determinada uma sequência consenso do HDAg para cada genótipo do HDV. As sequências consenso foram então alinhadas com a sequência da proteína recombinante DTH10.1 e DTH10 sem a cauda de histidina (Figura 20) para verificar o nível de similaridade entre elas.

Através deste alinhamento foi possível observar que a sequência do HDAg de cada genótipo possui maior similaridade com a proteína DTH10 em relação a DTH10.1, o que é esperado devido ao fato da segunda não ser a sequência completa do antígeno delta.

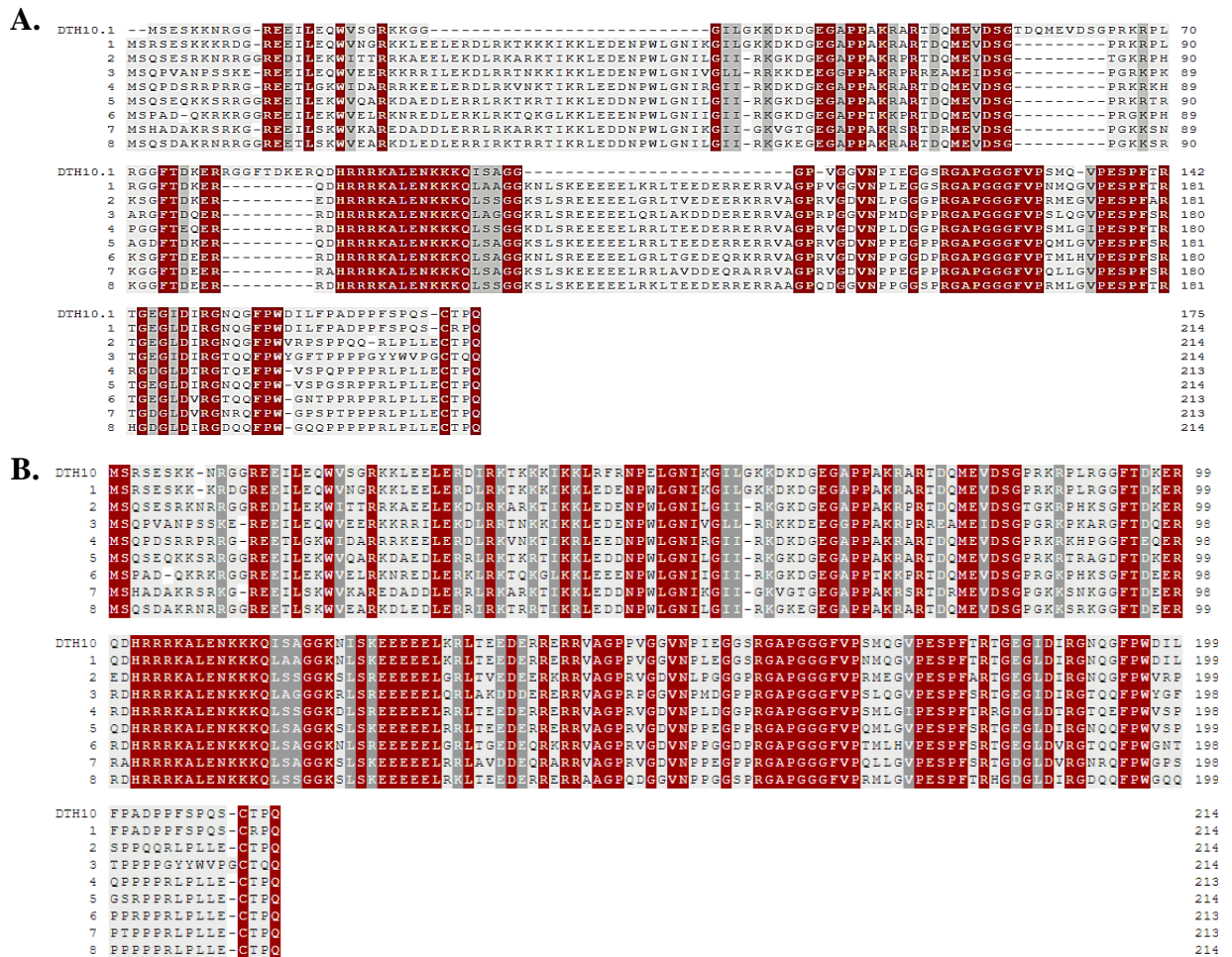


Figura 20 - Alinhamento das sequências consenso do HDAg obtidas para os oito genótipos do HDV com a proteína recombinante. **A.** Alinhamento com a DTH10.1 e **B.** Alinhamento com a DTH10. Estão destacados em vermelho os aminoácidos idênticos para todas as sequências, em cinza escuro os diferentes, porém bioquimicamente similares e em cinza claro os aminoácidos sem nenhuma similaridade.

O alinhamento individual de cada proteína recombinante com a sequência do HDAg para os oito genótipos (Tabela 5) mostrou similaridades de 44% a 63% para a DTH10.1 e 63,3% a 93% para a DTH10, sendo a maior similaridade com o genótipo I em ambos os casos.

Tabela 5 - Grau de identidade entre sequências do HDAg de cada genótipo com as proteínas recombinante DTH10.1 e DTH10

Genótipo		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Identidade (%)	DTH10.1	62,9	50,2	44,5	47,1	52,4	47,8	44,1	47,6
	DTH10	93	70,7	63,3	69,2	75,5	67,8	64,5	69,3

Através de ferramentas de bioinformática foi realizada uma análise preditiva das seguintes características da proteína recombinante. Pelo ProtParam foi previsto que a DTH10.1 possui peso molecular de aproximadamente 20kDa e ponto isoelétrico (pI) igual a 9,58, enquanto a DTH10 possui aproximadamente 25kDa e pI igual a 9,92. Pelo Protein-Sol foi previsto que ambas as proteínas seriam expressas na forma solúvel.

5.2 Análise de expressão e purificação das proteínas recombinantes

- *Proteína recombinante DTH10.1:*

A análise da expressão e solubilidade da proteína recombinante DTH10.1 em *E. coli* BL21 (DE3) a 37°C foi realizada a partir da comparação entre as frações solúvel e insolúvel obtidas após indução com IPTG do cultivo e lise das células. Foi possível observar (Figura 21A) uma banda proteica do tamanho esperado, aproximadamente 24kDa, que acreditamos se tratar da proteína de interesse devido a intensidade da banda.

A proteína DTH10.1 foi purificada a partir da fração solúvel do lisado celular, com alto nível de pureza. A purificação foi capaz de concentrar a proteína nas frações 14 a 19, como mostrado na Figura 21B. Com o processo de purificação foi possível confirmar que a proteína DTH10.1 aparece no gel SDS-PAGE com peso molecular de aproximadamente 24kDa.

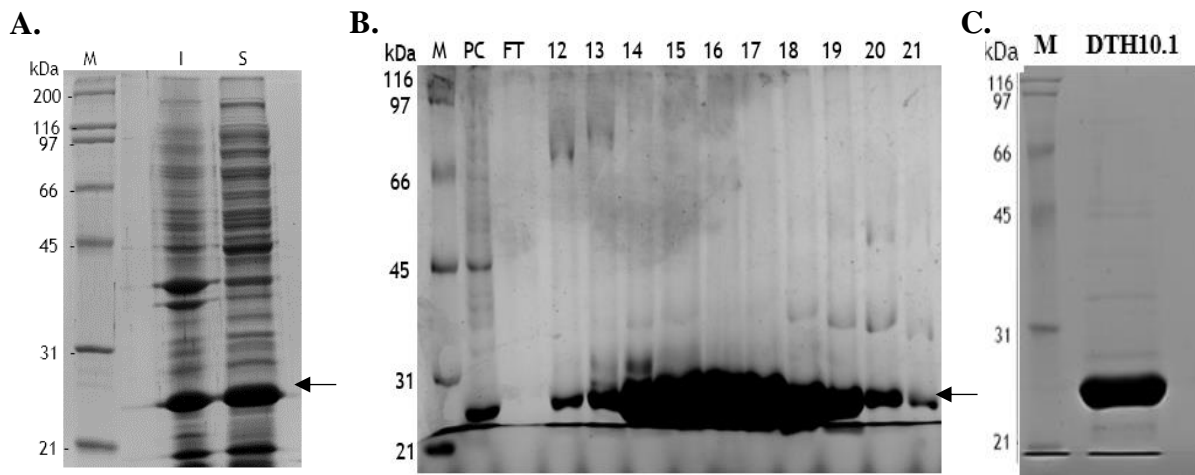


Figura 21 - Análise da proteína DTH10.1 por SDS-PAGE. **A.** Resultado do teste de solubilidade **B.** Purificação da proteína DTH10.1 expressa a 37°C. **C.** Proteína purificada. M: Padrão de massa molecular, I: fração insolúvel, S: fração solúvel, PC: pré-coluna, FT: *flow-through* da purificação, 12-21: frações eluídas com concentrações crescentes de imidazol. Seta indica a banda da DTH10.1.

- *Proteína recombinante DTH10:*

A análise da proteína recombinante DTH10 expressa em *E. coli* BL21 (DE3) a 37°C e a 20°C foi realizada a partir da comparação entre as frações não induzida, solúvel e insolúvel. Primeiro foi realizado a expressão a 37°C, onde foi observado através do gel SDS-PAGE a presença de uma banda que poderia ser a proteína de interesse, na fração não induzida, induzida e solúvel, com aproximadamente 32kDa (Figura 22A). Devido à baixa expressão e presença desta na fração não induzida, foi realizado um *western blot* para confirmar se tratar da DTH10. Através do *western blot* foi confirmado a baixa expressão da proteína de interesse com intensa degradação assim como na fração não induzida (Figura 22B). Para tentar melhorar a expressão da proteína, assim como sua solubilidade, foi realizada uma indução a 20°C *overnight* (16 horas). Após o novo cultivo e indução foi observado padrões de bandas semelhantes ao anterior, porém com um aparente aumento da expressão na fração solúvel, como observado pelo *western blot* (Figuras 22C e D).

A proteína DTH10 também foi purificada a partir da fração solúvel do lisado celular, porém com grau de pureza menor que a DTH10.1. A purificação foi capaz de concentrar a proteína nas frações 14 a 18, como mostrado na Figura 22E. Com o processo de purificação foi possível confirmar que a proteína DTH10 migra no gel SDS-PAGE com peso molecular de aproximadamente 32kDa.

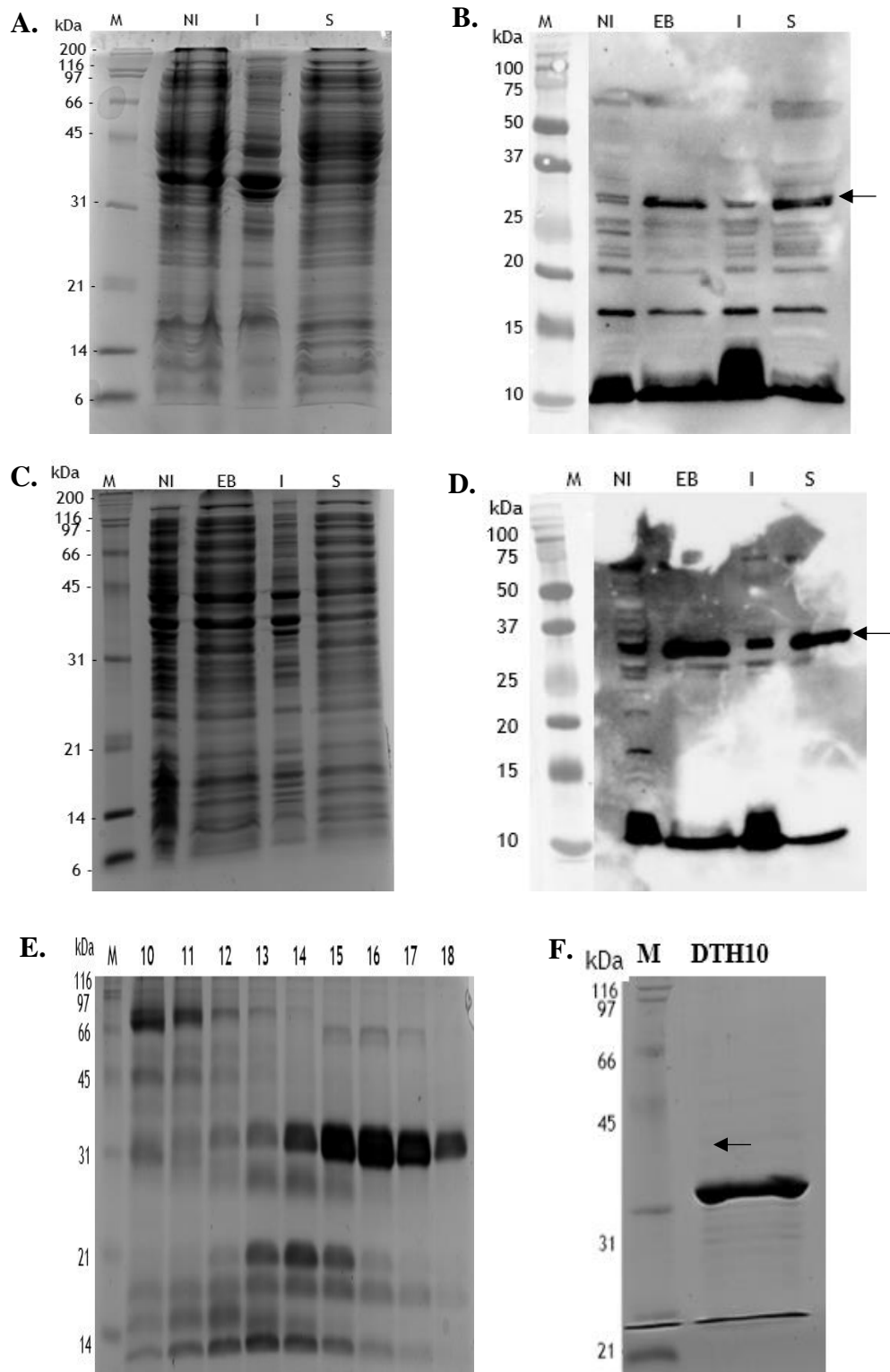


Figura 22 - Teste de solubilidade da proteína recombinante DTH10. **A.** SDS-PAGE do cultivo a 37°C e **B.** *Western blot* do cultivo a 37°C. **C.** SDS-PAGE do cultivo a 20°C e **D.** *Western blot* do cultivo a 20°C. **E.** SDS-PAGE da purificação da proteína recombinante expressa a 20°C. **F.** Proteína purificada. M: Padrão de massa molecular, NI: fração não induzida, EB: extrato bruto total, I: fração insolúvel, S: fração solúvel, PC: pré-coluna, FT: *flow-through* da purificação, 10-18: frações eluídas com concentrações crescentes de imidazol. Seta indica a banda da proteína de interesse.

5.3 Quantificação da proteína recombinante

As frações 14 a 20 da DTH10.1 purificadas foram reunidas em tubo de 15mL gerando um volume final de 10,5mL de proteína purificada. Essa proteína foi quantificada por método de Bradford onde foi possível observar uma concentração de 10mg/ml. Isso significa que a expressão da DTH10.1 em BL-21 (DE3) na forma solúvel gera um rendimento de 105mg de proteína purificada a partir de dois litros de cultura induzida. A proteína foi diluída para concentração final de 2mg/mL e as alíquotas foram armazenadas a -80°C.

As frações 15, 16 e 17 da DTH10 foram quantificadas individualmente e geraram um rendimento de 1,04mg/mL, 0,56mg/mL e 0,368mg/mL, respectivamente. As frações foram armazenadas a -80°C.

5.4 Desenvolvimento de um ELISA indireto

5.4.1 Determinação das condições ideais de reagentes

Para testar a eficiência das proteínas recombinantes DTH10.1 e DTH10 na detecção do vírus da hepatite D, por meio da metodologia ELISA, foram padronizados os reagentes e protocolos operacionais utilizando amostras de soro de pacientes com diagnóstico sorológico confirmado para hepatite D pelo kit comercial da DiaSorin® ETI-AB-DELTA-K-2 para detecção de anticorpos totais.

- *ELISA utilizando a DTH10.1:*

Os primeiros testes realizados tinham como objetivo a padronização das condições do ELISA utilizando a proteína DTH10.1. Para determinar a quantidade de antígeno a ser usado na sensibilização da placa foram testadas 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280ng de proteína por poço, com um *pool* de soro de 10 pacientes positivos e outro de 10 amostras negativas em diluição de 1:100 em diluente de amostra, bloqueio contendo 1% de BSA e anti-IgG conjugado com peroxidase em diluição de 1:5.000. Com base nos valores de absorbância do *pool* positivo e do *pool* negativo e da razão gerada (Figura 23), observou-se que o melhor resultado foi obtido com o uso de 1280ng de proteína. Assim foi determinado o uso de 1000ng de proteína DTH10.1 por poço para os testes posteriores.

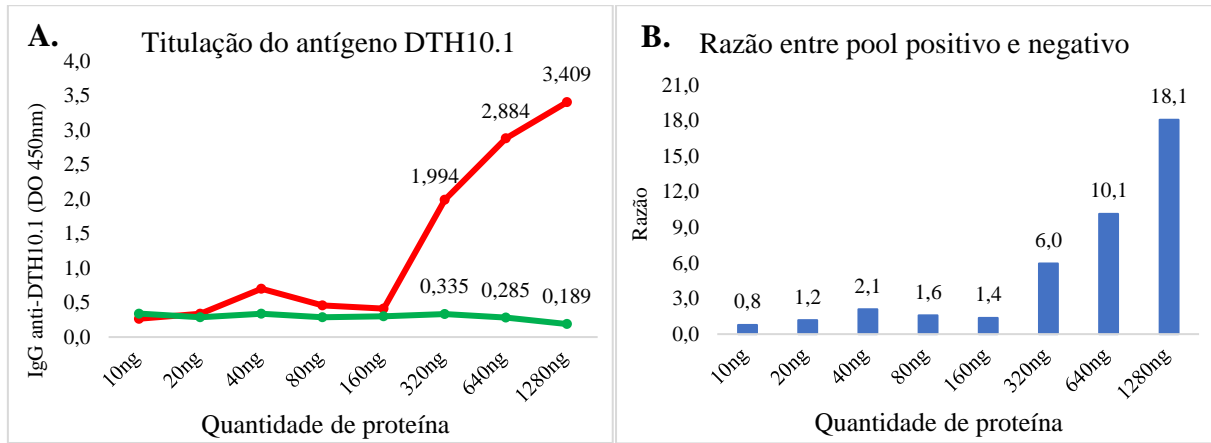


Figura 23 – Titulação do antígeno DTH10.1. **A.** Gráfico da titulação do antígeno. **B.** Gráfico da razão. Linha vermelha: *pool* positivo; linha verde: *pool* negativo.

Em seguida foi analisado a melhor diluição das amostras de soro positivo e negativo. Foram testados *pool* dos soros nas diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200, com 1000ng/poço de proteína, bloqueio com 1% de BSA e anti-IgG em diluição de 1:5.000. Com base nos valores de absorbância e razão (Figura 24), verificou-se que a melhor razão foi obtida com as diluições de 1:25 e 1:50, porém ambas as diluições geram uma absorbância alta para o *pool* negativo. Assim, para obter absorbância baixa para as amostras negativas sem diminuir muito o valor para as amostras positivas foi determinado o uso da diluição de 1:100 para as amostras de soro.

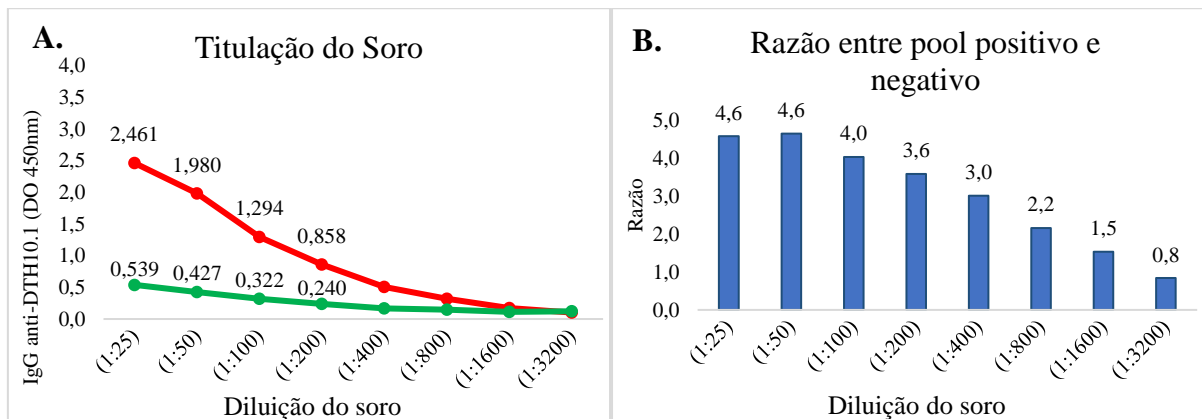


Figura 24 – Titulação das amostras de soro. **A.** Gráfico da titulação do soro. **B.** Gráfico da razão. Linha vermelha: *pool* positivo; linha verde: *pool* negativo.

A determinação da diluição do conjugado anti-IgG foi realizada através de testes com as diluições 1: 5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000, com 1000ng de proteína, *pool* de amostras com soro diluído 1:100 e bloqueio com 1% de BSA. Com base nos valores de absorbância mostrado na Figura 25, determinou-se que o melhor resultado foi com o uso da diluição de 1:5.000.

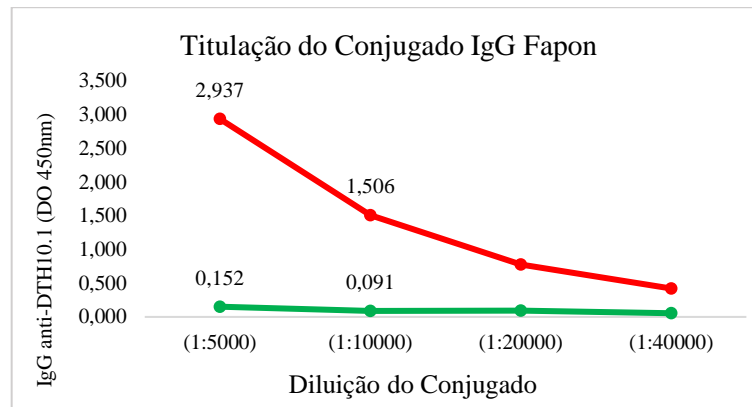


Figura 25 - Titulação do conjugado anti-IgG. Linha vermelha: *pool* positivo; linha verde: *pool* negativo.

Por último foram testadas as formulações da solução de bloqueio com concentrações de 1%, 2% e 5% de BSA, com 1000ng de proteína, *pool* de amostras diluído em 1:100 e conjugado em diluição de 1:5.000. Com base na absorbância do *pool* positivo, negativo e da razão (Figura 26), verificou-se que os valores da razão e absorbância do *pool* positivo para as três concentrações de BSA são muito parecidas, porém com 2% de BSA o *pool* negativo possui o menor valor de absorbância (DO 450nm).

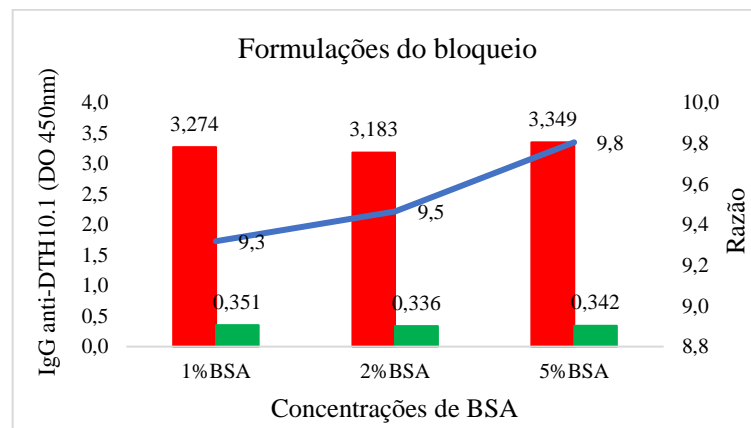


Figura 26 - Uso de diferentes concentrações de BSA na solução de bloqueio. Linha azul: Razão, barra vermelha: *pool* positivo, barra verde: *pool* negativo.

Assim, ficou determinado que as condições ideais para o ELISA utilizando a proteína DTH10.1 é a sensibilização da placa com 1000ng/poço de proteína, bloqueio com 2% de BSA, diluição das amostras de soro em 1:100 e do conjugado em 1:5.000.

- *ELISA utilizando a DTH10:*

Após a padronização do ELISA com a DTH10.1 foram iniciados os testes utilizando a proteína DTH10. Como o intuito final foi determinar a melhor proteína a ser usada, os testes

iniciais foram realizados nas mesmas condições que a DTH10.1 a título de comparação. A determinação da quantidade de antígeno a ser usado foi realizada através da titulação de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280ng de proteína por poço. Com base nos valores de absorvância e razão mostrados nas Figura 27, observou-se que o melhor resultado foi obtido com o uso de 160ng de proteína. Assim determinou-se o uso de 100ng de proteína DTH10.1 por poço.

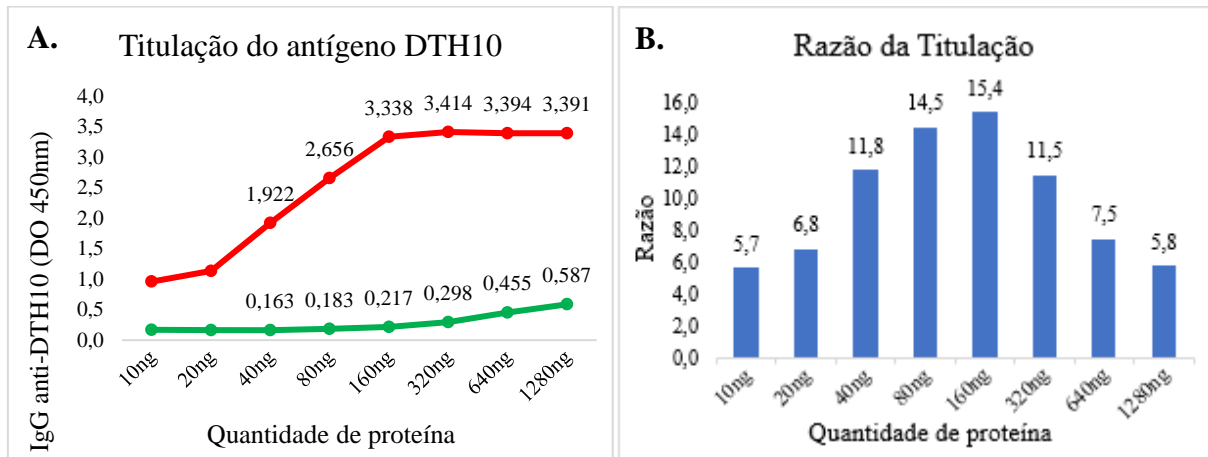


Figura 27 - Titulação do antígeno DTH10. **A.** Gráfico da titulação do antígeno. **B.** Gráfico da razão. Linha vermelha: *pool* positivo; linha verde: *pool* negativo.

Em seguida foi realizado a determinação da diluição do *pool* utilizando as diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200, com 100ng de proteína DTH10. Com base nos valores observado na Figura 28, verificou-se que a melhor razão foi obtida com a diluição de 1:25. Como nosso estoque de amostras positivas para HDV está escasso, foi decidido o uso da diluição 1:100 das amostras de soro.

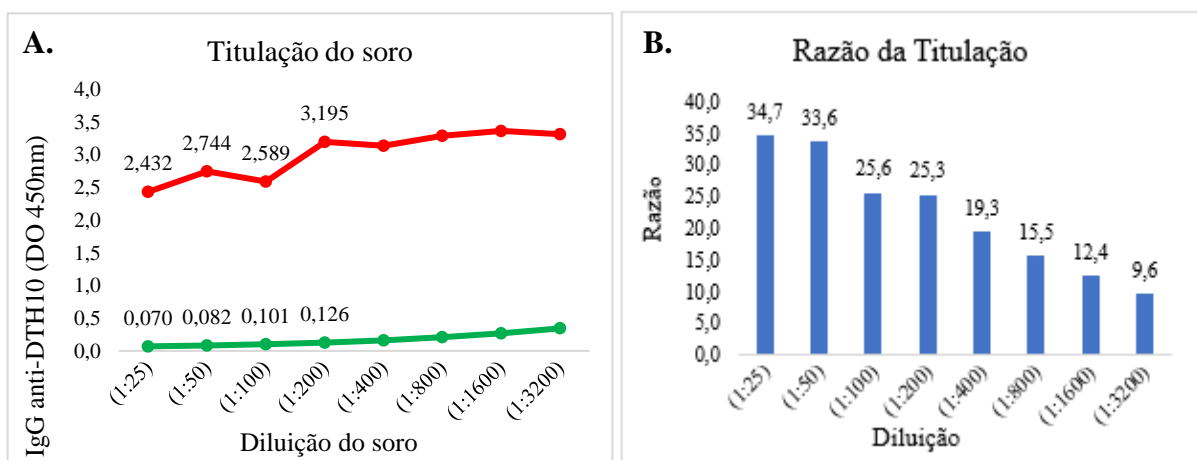


Figura 28 - Titulação das amostras de soro. **A.** Gráfico da titulação do soro. **B.** Gráfico da razão. Linha vermelha: *pool* positivo; linha verde: *pool* negativo.

Foram testadas duas formulações de bloqueio, com 1% e 2% de BSA. Para este teste foram utilizadas amostras individuais para comparar as absorvâncias das amostras com os valores obtidos com a proteína DTH10.1. Observou-se pequena diferença entre a absorvância das amostras em relação as duas concentrações de BSA, porém a razão obtida através da média das amostras positivas e negativas foi maior com o uso de 1% de BSA (Figura 29).

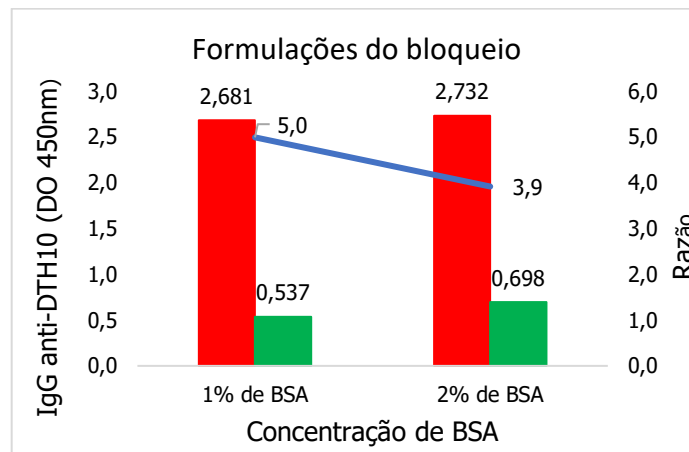


Figura 29 - Uso de diferentes concentrações de BSA na solução de bloqueio. Linha azul: Razão, barra vermelha: *pool* positivo, barra verde: *pool* negativo.

Também foi possível observar que as amostras que apresentaram baixa absorvância com a DTH10.1, sendo elas negativas ou falso-negativas, apresentaram alta absorvância no ELISA com a DTH10, enquanto as amostras positivas altas tiveram absorvâncias similares. Na tentativa de diminuir a absorvância dessas amostras, a quantidade de proteína utilizada na sensibilização foi reduzida para 40ng, que na etapa de titulação do antígeno mostrou gerar a menor absorvância para amostras negativas sem grande comprometimento do valor das amostras positivas (Dado não mostrado). Com essa mudança foi possível observar que, apesar de induzir redução na absorvância das amostras positivas, não houve alteração na classificação das amostras como positiva ou negativa para hepatite D.

5.4.2 Análise de reação cruzada

Para avaliação de reação cruzada, 187 amostras foram analisadas: (i) amostras positivas para hepatite D (n=76); (ii) hepatite B (n=33); (iii) hepatite C (n=31); (iv) fator reumatoide (n=8) e (v) amostras de indivíduos saudáveis (n=39).

Nenhuma das amostras de pessoas saudáveis, com hepatite C e com fator reumatoide apresentaram resultados positivos no ELISA tanto com a DTH10.1 quanto com a DTH10 (Figura 30). Entre as amostras de hepatite B uma apresentou resultado positivo e uma, indeterminado com a DTH10.1 e com a DTH10 uma apresentou resultado positivo.

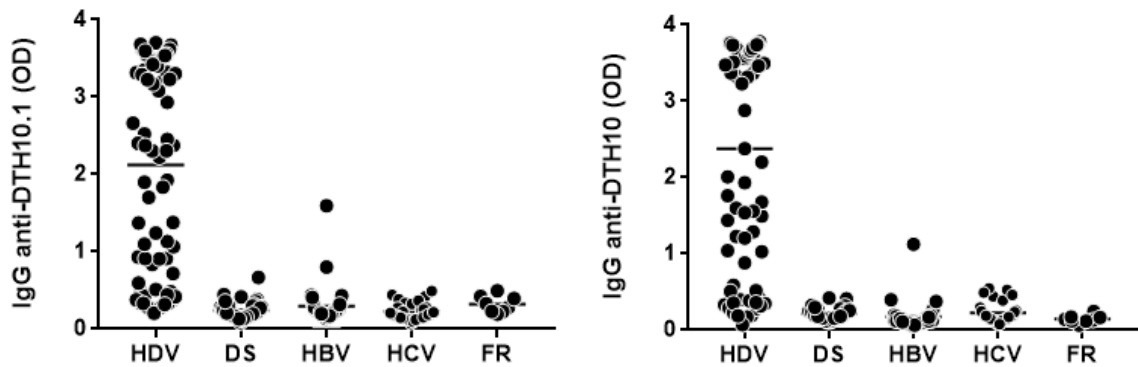


Figura 30 - Análise de reação cruzada com a proteína recombinante **A.** DTH10.1 e **B.** DTH10.

5.4.3 Determinação da sensibilidade e especificidade

A determinação da sensibilidade e especificidade do teste foi feita a partir da análise de 76 amostras positivas para hepatite D e 103 amostras negativas, sendo essas compostas por amostras de pacientes saudáveis (n=39), positivos para hepatite B (n=33) e para hepatite C (n=31). A listagem das amostras e seus resultados estão disponíveis no Apêndice.

- *ELISA utilizando a DTH10.1:*

A média das amostras negativas foi 0,257 e o desvio padrão foi 0,175. Pelo método de dupla entrada o *cut-off* obtido foi 0,781, os valores de sensibilidade e especificidade foram 75,7% e 99%, respectivamente. Já pelo método da curva ROC (Figura 31) a área da curva foi 0,9581, o *cut-off* foi 0,512, a sensibilidade foi de 82% e especificidade de 97,5%.

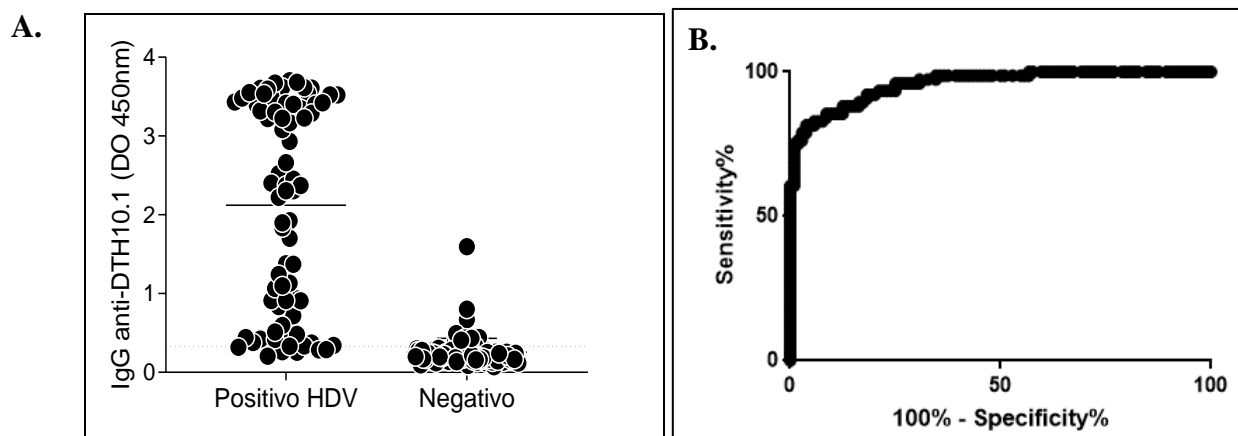


Figura 31 - Sensibilidade e Especificidade pela curva ROC para ELISA com a DTH10.1. **A.** Gráfico de distribuição das amostras. **B.** Área da curva. Linha pontilhada representa o valor de *cut-off* obtido.

- ELISA utilizando a DTH10:

A média das amostras negativas foi 0,207 e o desvio padrão foi 0,139. Pelo método de dupla entrada o *cut-off* obtido foi 0,624, os valores de sensibilidade e especificidade foram 77,3% e 99%, respectivamente. Já pelo método da curva ROC (Figura 32) a área da curva foi 0,9496, o *cut-off* foi 0,500, a sensibilidade foi de 80,3% e especificidade de 97,1%.

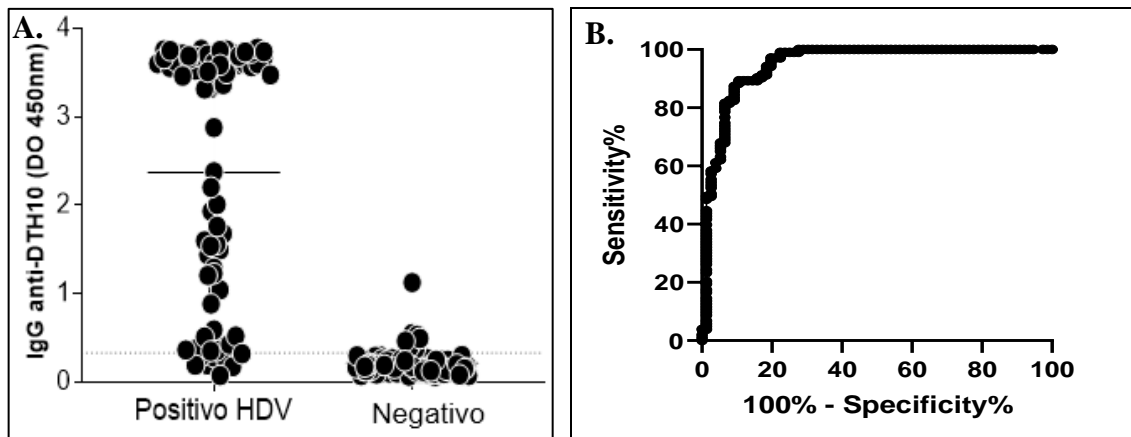


Figura 32 - Sensibilidade e Especificidade pela curva ROC para ELISA com a DTH10. **A.** Gráfico de distribuição das amostras. **B.** Área da curva. Linha pontilhada representa o valor de *cut-off* obtido.

5.4.4 Teste de estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada da fase sólida foi realizada com placa sensibilizada apenas com a DTH10.1. Para esse teste foram sensibilizadas 9 *strips*, sendo uma utilizada para o ponto 0, dia em que o produto foi preparado, quatro foram armazenadas em geladeira a 2-8°C (placa controle) e quatro foram armazenadas em estufa a 37°C. Comparando os resultados obtidos (Figura 33) é possível afirmar que o produto permaneceu estável durante o período de teste, mantendo a similaridade no valor das absorbâncias sob as duas condições de armazenamento da placa. Isso significa que, refrigerada, a placa sensibilizada manteria a estabilidade por pelo menos 2 anos, que é prazo de validade da maioria dos kits de ELISA.

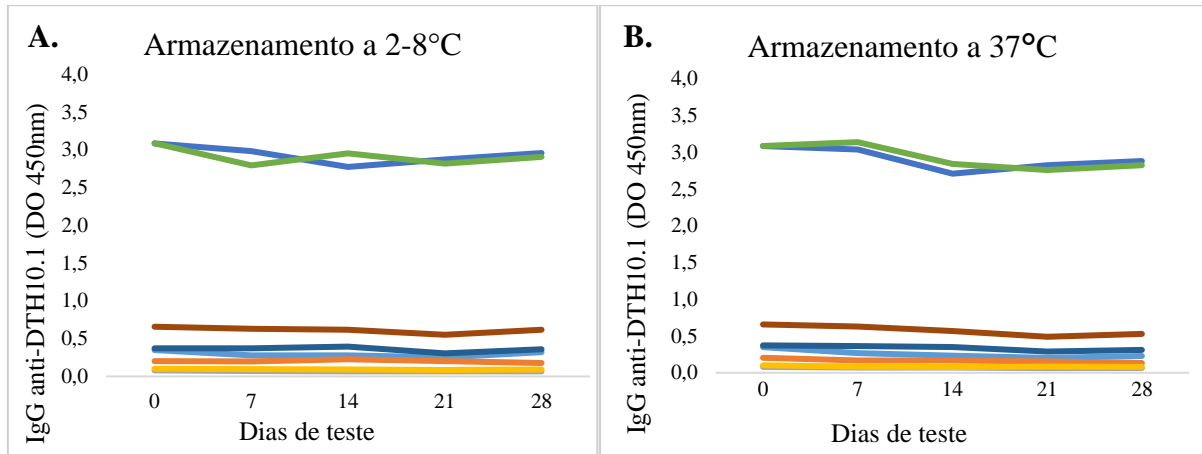


Figura 33 - Teste de estabilidade acelerada. **A.** Placa armazenada a 2-8°C. **B.** Placa armazenada a 37°C. — 121 — 131 — 125 — 119 — 6800 — 4877 — 1970 — 3166 Os números indicam o código de cada amostra testada.

5.4.5 Repetitividade e Reprodutibilidade

Para análise de repetitividade, analisamos três amostras, durante três dias consecutivos, fazendo oito replicatas/dia. Apenas a amostra 01 apresentou boa repetitividade, gerando um baixo valor de CV.

Na reprodutibilidade comparamos as mesmas amostras durante os três dias. As três amostras reproduziram o resultado.

Tabela 6 - Coeficiente de variação (CV) para testes de repetitividade e reprodutibilidade.

		Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
Dia 01	Abs. Média	3,742	0,625	0,110
	Desvio Padrão	0,023	0,049	0,012
	CV	0,6	7,9	10,7
Dia 02	Abs. Média	3,670	0,557	0,090
	Desvio Padrão	0,051	0,036	0,011
	CV	1,4	6,5	12,8
Dia 03	Abs. Média	3,545	0,606	0,098
	Desvio Padrão	0,114	0,021	0,010
	CV	3,2	3,5	10,4

Abs. Média: Absorbância média

5.5 Desenvolvimento de teste imunocromatográfico de fluxo lateral

5.5.1 Conjugação do ouro coloidal

A primeira estratégia testada foi a conjugação do ouro coloidal com a proteína DTH10.1, porém o processo de conjugação não se mostrou estável em nenhuma diluição e o uso da proteína no conjugado foi descartado.

A conjugação com anticorpo anti-IgG obteve sucesso na diluição de 1:8, a partir de uma diluição inicial de 45 μ L de anticorpo anti-IgG em 500 μ L de tampão hepes, enquanto a conjugação com a proteína A foi realizada na diluição 1:32 a partir de uma diluição inicial de 2 μ L de anticorpo anti-IgG em 500 μ L de tampão hepes.

5.5.2 Padronização das condições do teste

Durante o processo de padronização do teste para hepatite D foram testadas a conjugação com anticorpo anti-IgG e com a proteína A. Em nenhum dos testes realizados foi observado qualquer alteração de resultados decorrente do uso de diferentes conjugados, assim o processo de padronização foi definido com o uso de ouro coloidal conjugado a proteína A por ser financeiramente mais rentável, uma vez que ela foi eficiente em uma diluição muito maior que o anti-IgG e também é mais econômica.

Com o intuito de definir a melhor concentração de proteína DTH10.1 a ser usada na linha teste foram testadas impregnações de 0,2; 0,5 e 0,8mg/mL de proteína mantendo todos os outros parâmetros idênticos e sem realizar a impregnação da linha controle. É possível observar na Figura 34A que a intensidade obtida com o uso de 0,2mg/mL foi muito fraca enquanto com 0,5 e 0,8mg/mL de proteína o sinal foi mais intenso e similar para as duas concentrações. Logo foi escolhido usar 0,5mg/mL e trabalhar nos outros parâmetros para aumentar a intensidade do sinal.

A determinação da concentração de proteína A a ser utilizada na linha controle foi feita a partir da comparação entre 0,3 e 0,6mg/mL de proteína, mantendo todos os outros parâmetros idênticos. Como pode ser observado na Figura 34B, o uso de 0,6mg/mL de proteína A gera uma linha controle de maior intensidade, o que ao torna a melhor opção para o teste.

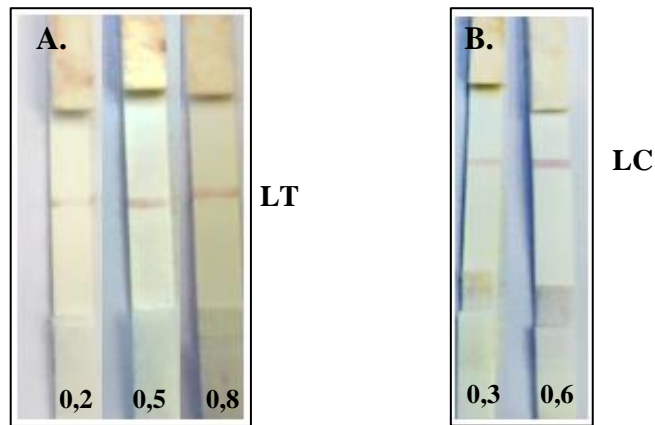


Figura 34 - Determinação da concentração de proteína a ser impregnada. **A.** Concentração de proteína DTH10.1 a ser usada na linha teste. Testes sem uso da linha controle, com 0,2mg/mL, 0,5mg/mL ou 0,8mg/mL de proteína **B.** Concentração de proteína A na linha controle. Testes com 0,3mg/mL ou 0,6mg/mL da proteína A. Amostra aplicada foi *pool* negativo. LT: linha teste. LC: linha controle.

Algumas das amostras negativas previamente analisadas geravam uma pequena reatividade na linha teste, que é considerado como sendo resultado positivo. Uma forma de evitar reações inespecíficas que possam gerar resultados falsos-positivos é o uso do bloqueio da membrana de nitrocelulose. Assim, foi analisado duas condições de tratamento dessa membrana, sendo ela bloqueada com 2% de BSA e sem bloqueio. Foi possível observar que o uso do bloqueio impedia as reações inespecíficas não gerando falsos-positivos, enquanto sem o bloqueio foi possível observar sombras em algumas amostras. A Figura 35A representa o teste de duas amostras negativas testadas com tampão de corrida 0,05M, sendo que o teste realizado sem bloqueio apresentou uma sombra na linha teste.

Como o bloqueio da membrana de nitrocelulose é uma etapa que encarece significativamente o processo de produção de um kit, foi testado tampões de corrida mais concentrados em membranas não bloqueadas com o intuito de evitar o surgimento dos resultados falso-positivos. Para isso foram testados os tampões na concentração 0,07M e 0,08M, que foram comparados ao resultado obtido com tampão 0,05M em membrana bloqueada (Figura 35B). O uso do tampão de corrida 0,08M gerou uma sombra facilmente perceptível na linha teste enquanto o tampão 0,07M produziu uma sombra quase imperceptível.

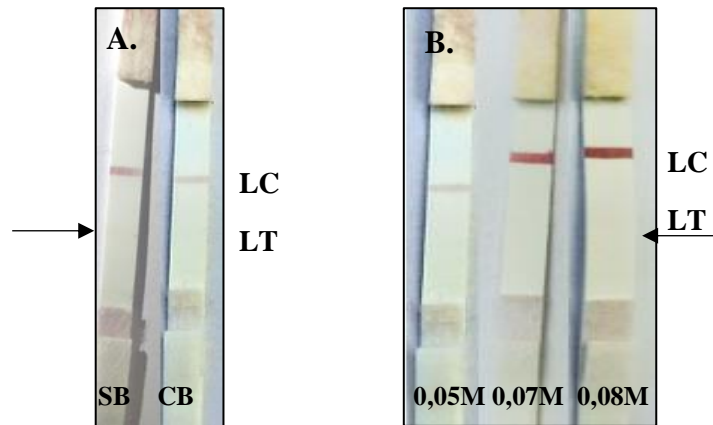


Figura 35 - Determinação do tratamento da nitrocelulose e tampão de corrida. **A.** Comparação da membrana de nitrocelulose sem bloqueio e com bloqueio. Teste com *pool* negativo. **B.** Determinação da concentração do tampão de corrida. Tampão 0,05M em membrana bloqueada e tampão 0,07M e 0,08M em membranas não bloqueadas. SB: Sem bloqueio. CB: Com bloqueio. LC: linha controle. LT: linha teste. Seta indica pequena reatividade na linha teste.

Na tentativa de melhorar as condições do teste com a membrana não bloqueada e melhorar a especificidade dos resultados foram testados dois volumes de amostra, com a aplicação de 10 μ L e 20 μ L da amostra analisada, tendo os testes anteriores realizados com o volume de 10 μ L. O aumento do volume para 20 μ L e o tampão de corrida contendo BSA 1% foi capaz de impedir a presença de falsos positivos, fazendo com que as amostras negativas não apresentem reatividade na linha teste (Figura 36A).

O teste rápido é característico em ter um tempo de leitura menor que 30 minutos, por isso durante todo o processo de padronização das condições do teste imunocromatográfico foi utilizado o tempo de 10 minutos. Assim, o último parâmetro analisado foi o melhor tempo de leitura, tendo sido observado os tempos 10 e 20 minutos. Foi observado (Figura 36B) que com 20 minutos a membrana de nitrocelulose ficou mais limpa, isto é, todo o volume aplicado foi absorvido e não ficou marcas residuais do conjugado.

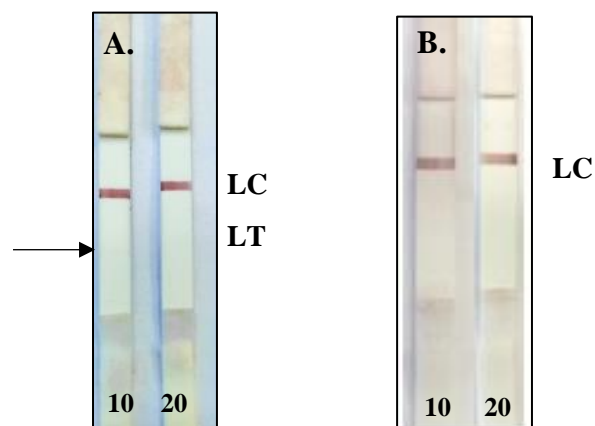


Figura 36 - Determinação volume de amostra e tempo de leitura. **A.** Avaliação do uso de 10 μ L e 20 μ L da amostra. **B.** Determinação da leitura do teste após 10 ou 20 minutos. LC: linha controle. LT: linha teste. Seta indica sombra na linha teste.

Após a análise de todos os parâmetros, ficou determinada as melhores condições para a realização do teste imunoenzimático para hepatite D, como mostra a Figura 37.

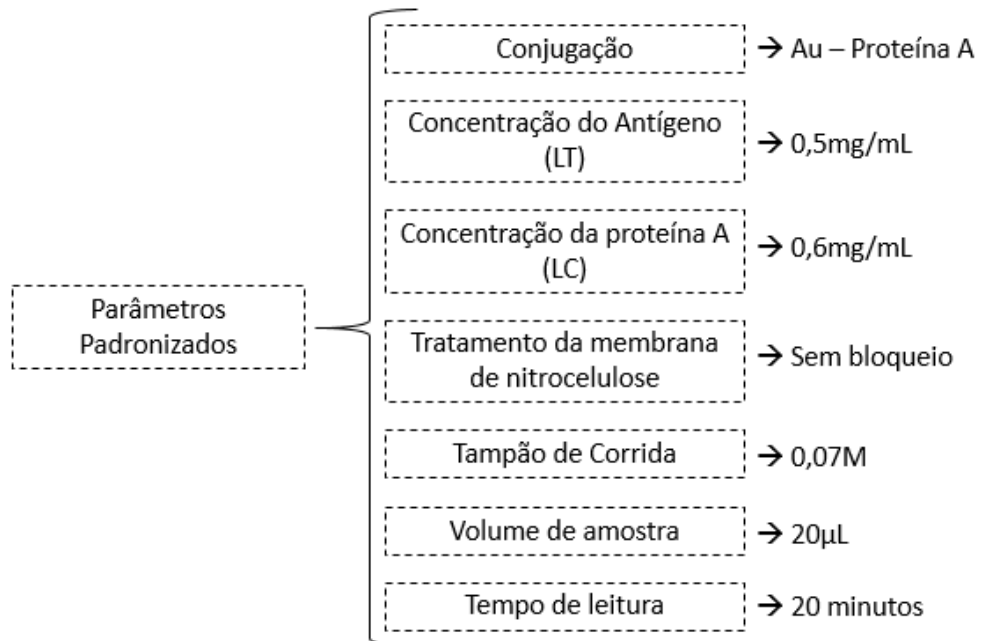


Figura 37 - Parâmetros determinados para o teste imunocromatográfico para diagnóstico para hepatite D.

5.5.3 Determinação da sensibilidade e especificidade

A determinação da sensibilidade e especificidade do teste foi calculada a partir de 49 amostras positivas de hepatite D e 20 amostras de pacientes saudáveis. São consideradas amostras positivas aquelas que apresentarem qualquer grau de reatividade na linha teste (Figura 38). O valor de sensibilidade obtido foi 77,5% e especificidade foi 100%.

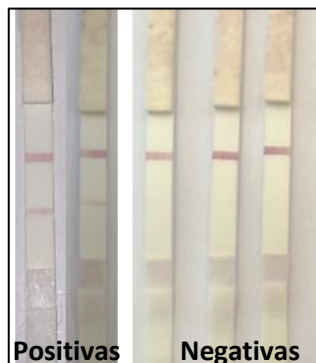


Figura 38 - Determinação da sensibilidade e especificidade do teste.

6 DISCUSSÃO

Apesar de não ser muito comum, a hepatite D é responsável pela forma mais grave de hepatite viral e possui distribuição mundial. No Brasil já foram notificados 3.833 casos confirmados entre 1999 a 2017 com 75% dos casos decorrentes da região norte do país (Bacia Amazônica), sendo 159 destes casos notificados apenas em 2017 (BRASIL, 2018b).

Por ser capaz de progredir rapidamente para um estágio crônico e causar graves problemas hepáticos ou até mesmo a morte do paciente, o diagnóstico precoce da hepatite D é de grande importância (YURDAYDIN, 2017b). Atualmente o diagnóstico laboratorial da hepatite D é realizado através de testes sorológicos, porém ainda existem poucas opções de testes comerciais, uma vez que muitos deles não apresentam bons resultados (COLLER *et al.*, 2018). Portanto, o desenvolvimento e prototipagem de dois métodos sorológicos para a detecção da hepatite D representa novas opções de testes eficientes, desenvolvidos com tecnologia nacional, potencialmente mais baratos e de maior praticidade para uso, como é o caso do teste imunocromatográfico.

As metodologias de diagnóstico desenvolvidas e prototipadas neste trabalho utilizam como antígeno as proteínas recombinantes DTH10.1 e DTH10, que tiveram sua similaridade comparada com sequências consenso do antígeno delta dos oito genótipos do HDV. Como a DTH10.1 possui apenas parte da sequência do HDAg, já era esperado que ela obtivesse uma menor similaridade, enquanto a DTH10 obteria uma maior similaridade por ser a sequência completa do antígeno. Através dessa análise, foi possível observar o nível de divergência entre as sequências dos oito genótipos, principalmente entre os genótipos III e VII, que apresentaram menor similaridade, e o genótipo I, com maior similaridade às proteínas recombinantes produzidas. Esse resultado é corroborado por análises de sequências do HDV que comprovam a existência de 15% de divergência nas sequências do vírus dentro de um genótipo, além de 15% a 40% de divergência entre a sequência de diferentes genótipos, onde o HDV-3 o apresenta a maior divergência dentre os oito genótipos conhecidos (AHN; GISH, 2014; CHAO *et al.*, 2015; BRASIL, 2018a; DÉNY, 2006).

As proteínas DTH10.1 e DTH10 foram produzidas através do sistema de expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e analisadas através de gel SDS-PAGE. A DTH10.1, que foi produzida primeiro em cultivo a 37°C, foi uma proteína de fácil expressão e purificação, gerando um alto rendimento. Resultados similares foram observados por DING *et al.* (2014) e LU *et al.* (2016), que expressaram a proteína recombinante S-HDAg completa com alto rendimento.

Já a DTH10 apresentou problemas durante a tentativa de expressão a 37°C, demonstrando uma taxa de crescimento bem abaixo do esperado, chegando a precisar do dobro de tempo para atingir a DO_{600nm} mínima para indução. Acredita-se que isso ocorreu devido a uma expressão basal da proteína previamente a indução com IPTG podendo ocasionar uma certa toxicidade para a célula. Para tentar contornar esse problema, foi realizado uma tentativa de indução a 20°C, onde foi possível observar que, apesar de ainda ter ocorrido os mesmos problemas descritos anteriormente, nesta nova condição a proteína apresentou maior expressão, principalmente na fração solúvel. Uma forma de evitar todas essas dificuldades de expressão da DTH10 seria o uso da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, que possui o plasmídeo pLysS que contém o gene que codifica a lisozima de T7. Essa enzima é capaz de diminuir o nível da expressão basal do gene inserido na célula sem interferir na expressão proteica após a etapa de indução com o IPTG (STUDIER, 1991). Como foi obtido resultados adequados com o uso da expressão a 20°C, essa estratégia não foi utilizada.

Testes comerciais para a detecção sorológica do HDV já estão disponíveis a alguns anos e são utilizados em todo o mundo (BRICHLER *et al.*, 2014). Isso ocorre devido aos testes sorológicos serem ferramentas importantes para o diagnóstico de diversas doenças uma vez que são de fácil uso, normalmente não dependem de grande estrutura laboratorial e podem ser usados para analisar uma grande quantidade de amostras em pouco tempo (URDEA, 2006). Assim, as proteínas recombinantes DTH10.1 e DTH10 foram utilizadas como antígeno para detectar anticorpos IgG anti-HDV presentes no soro de pacientes infectados com o vírus, através das metodologias de ELISA e teste imunocromatográfico.

Primeiro foi analisado a capacidade das proteínas DTH10.1 e DTH10 em detectar os anticorpos IgG através do método de ELISA. Para isso foram realizados testes para determinar a quantidade de cada um dos reagentes a ser usado com o intuito de padronizar a metodologia do ensaio. Nessa etapa foi analisado amostras vindas de Porto Velho – RO, uma região onde se predomina casos de hepatite D causados por infecção pelo genótipo III, que como mencionado anteriormente, possui a sequência mais divergente entre os oito genótipos do vírus (DÉNY, 2006). Nesta análise foram selecionadas as condições que gerassem melhor resultado, mantendo a caracterização das amostras, isto é, mostrando um resultado positivo para as amostras infectadas e resultado negativo para as amostras não infectadas.

Como o objetivo final é comercializar o produto para o diagnóstico da hepatite D, foram realizados alguns testes que são exigidos pela RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015. Entre eles estão a análise de reação cruzada, determinação da sensibilidade e especificidade, análise de repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade. Na análise de reação cruzada, foram testadas

amostras positivas para hepatite B, hepatite C, hepatite D, para fator reumatoide e amostras negativas provenientes de pessoas saudáveis. Através deste teste foi possível observar que ambas as proteínas DTH10.1 e DTH10 reagiram apenas com uma amostra de hepatite B, tendo todas as outras amostras analisadas apresentado resultados negativos. Isso indica que a possibilidade de ocorrer reação cruzadas com alguma dessas enfermidades será baixa.

A determinação da sensibilidade e especificidade do teste foi realizada por duas metodologias: dupla entrada e curva ROC. Por dupla entrada, os valores de sensibilidade e especificidade da DTH10.1 foram 75,7% e 99% e da DTH10 foram 77,3% e 99%, respectivamente. Já pela curva ROC os valores de sensibilidade e especificidade da DTH10.1 foram 82% e 97,5% e da DTH10 foram 80,3% e 97,1%. Esses valores obtidos para sensibilidade são baixos comparados aos valores informados para os kits que se encontram no mercado (98% de sensibilidade), como exibidos na Tabela 2.

Essa diferença de sensibilidade pode ser atribuída às amostras utilizadas na determinação desses valores, que são em sua maioria provenientes de infecção pelo HDV-3, que é o mais divergente de todos e o que possui menor grau de identidade com a proteína recombinante. Isso nos leva a crer que amostras de outros genótipos provavelmente gerariam um valor de sensibilidade ainda maior que o obtido. As empresas responsáveis pelos kits comerciais estão localizadas em regiões onde predomina-se o genótipo I, o que faz com que elas detectem de forma correta as amostras com esse genótipo, mas que apresentem erros nas detecções de amostras de outros genótipos, como mostrado por Brichler *et al.* (2014).

Apesar de serem poucos os artigos na literatura descrevendo o desenvolvimento de testes para o diagnóstico sorológico da hepatite D, SHEN *et al.* (2012) descreveu um ELISA utilizando o HDAg isolado de paciente na China e obteve uma sensibilidade e especificidade de 100,0% na avaliação de 30 amostras. Além dele, LU *et al.* (2016) também descreveu um ELISA, com HDAg produzido por fermentação, e também obteve 100% de sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos IgG anti-HDV.

Devido a pequena diferença obtida nos valores de sensibilidade e especificidade utilizando a DTH10.1 e a DTH10, ficou decidido inicialmente prosseguir com os testes utilizando a proteína DTH10.1, que se mostrou ser mais fácil de expressar, purificar, que gerou maior rendimento proteico e por ser uma sequência ainda não patenteada, como é o caso da DTH10.

No teste de estabilidade da fase sólida, etapa em que a placa já sensibilizada foi submetida a agressão acelerada a 37°C, foi possível observar através de comparação com uma

placa controle que a placa permaneceu estável durante o período analisado. Este teste é importante para a determinação do prazo de validade da placa por meio da aceleração do processo de degradação dos componentes aderidos a ela. Observou-se, ao final do experimento, que as amostras avaliadas apresentaram os mesmos resultados na placa sob agressão em comparação a placa mantida em condições ideais de armazenamento, o que permite afirmar que não há perda significativa de desempenho no período avaliado. Assim, assume-se que a placa poderia apresentar um tempo de validade de aproximadamente dois anos, valor similar a maioria dos kits comerciais (MATEJTSCHUK; PHILLIPS, 2007). Para a determinação da validade do produto completo todos os componentes deste, incluindo os reagentes utilizados no processo, devem passar pelo processo de estabilidade acelerada.

Foi possível observar uma boa reprodutibilidade dos resultados, tendo as amostras apresentado valores de Coeficiente de Variação similares durante os dias analisados. A análise da repetitividade não apresentou bons resultados, tendo valor de CV maior que o ideal. Isso pode ser devido a diversos fatores que vão desde a precipitação da proteína utilizada na sensibilização da placa, má homogeneidade das amostras aplicadas, até problemas na pipetagem.

Os testes imunocromatográficos são ferramentas muito requisitadas para o diagnóstico de uma variedade de doenças devido ser um método que não depende de estrutura laboratorial elaborada e ser de rápida execução, com obtenção do resultado em minutos (JAPOLLA, 2015). Até o momento não existe nenhum teste imunocromatográfico para o diagnóstico da hepatite D, o que torna o desenvolvimento deste teste ainda mais importante e interessante, uma vez que ele poderá auxiliar no diagnóstico de pessoas que vivem em áreas remotas e de difícil acesso a centros de saúde ou laboratórios.

Uma das etapas mais importantes no processo de padronização das condições do teste imunocromatográfico é a conjugação do ouro coloidal. Das três tentativas realizadas, com a proteína DTH10.1, proteína A e anticorpo anti-IgG, apenas a primeira não obteve sucesso. De acordo com Oliver (1994), a solução de ouro coloidal a ser utilizada no processo de conjugação deve possuir um pH de pelo menos 0,5 unidades acima do pI da proteína a ser conjugada. Como o pI da proteína DTH10.1 é de 9.58, o pH da solução deveria ser acima de 10, o que pode ter causado a perda da estabilidade da solução de ouro coloidal, impedindo a conjugação com a proteína DTH10.1. Como a proteína A e o anticorpo anti-IgG possuíam pI abaixo de 8.5 o processo de conjugação foi realizado com sucesso.

Após a padronização das condições do teste ser finalizada, com a determinação das melhores condições para que haja a manutenção dos resultados, isto é, que os resultados obtidos sejam equivalentes a caracterização das amostras realizada em Porto Velho, foi determinado o valor de sensibilidade e especificidade do teste. O teste imunocromatográfico mostrou ter sensibilidade de 77,5% e especificidade de 100%, apresentando reprodução dos resultados obtidos no ELISA com a mesma proteína.

Em suma, as proteínas recombinantes DTH10.1 e DTH10 mostraram ser capaz de diferenciar as amostras de pacientes negativos dos positivos em grande parte dos casos e que apesar de apresentar valores de sensibilidade um pouco abaixo do ideal nas duas metodologias, ainda se trata de métodos promissores passível de melhoras.

7 CONCLUSÃO

Através do uso da *E. coli* BL21 (DE3) como sistema de expressão foram produzidas as proteínas recombinantes DTH10.1 e DTH10 com bom nível de pureza e rendimento. Ambas as proteínas se mostraram capazes de detectar anticorpos IgG anti-HDV no soro de pacientes infectados com o vírus através da técnica de ELISA, enquanto a DTH10.1 se mostrou capaz de reproduzir os resultados com imunocromatografia.

O ELISA com a DTH10.1 apresentou resultados adequados para sensibilidade, especificidade, interferentes e estabilidade acelerada, ao mesmo tempo que apresentou boa sensibilidade e especificidade no teste imunocromatográfico, o que torna ambas as técnicas promissoras para o diagnóstico de hepatite D.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z.; AFZAL, R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. **World journal of hepatology**, v.5, n. 12, p. 666–675, 2013.
- AGHASADEGHI, M. R. *et al.* Frequency and Genotype of Hepatitis D Virus Infection in Patients Infected with HIV and Those Undergoing Hemodialysis. **Hepatitis monthly**, v. 13, n. 5, 2013.
- AHN, J.; GISH, R. G. Hepatitis D Virus: A Call to Screening. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 10, p. 647-686, 2014.
- ALDABE, R. *et al.* Animal models of chronic hepatitis delta virus infection host-virus immunologic interactions. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 46–65, 2015.
- ALVES, C.; BRANCO, C.; CUNHA, C. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. **Advances in virology**, v.2013, 2013.
- ANVISA. **Manual para Regularização de Produtos para Diagnóstico *in vitro* na Anvisa**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33912/264673/Manual+para+Regulariza%C3%A7%C3%A3o+de+Produtos+para+Diagn%C3%B3stico+de+uso+in+vitro/8e4c2b5d-d145-4216-a680-c442a5bd746b>. Acesso em: 28 jul. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de aconselhamento em hepatites virais**. Brasília, 2005. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hepatites_aconselhamento.pdf. Acesso em: 28 jul. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais**, v. 49, n. 31, 2018b. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/05/Boletim-Hepatites-2018.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**, Brasília, 2018a. Disponível em: <http://dive.sc.gov.br/hepatites/publicacoes/ManualTécnicoDiagnósticoHepatitesVirais.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Material instrucional para capacitação em vigilância epidemiológica das hepatites virais**. Brasília, 2008. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/material_instrucional_hepatites_virais.pdf. Acesso em: 28 jul. 2019.
- BINH, M. T. *et al.* HDV infection rates in northern Vietnam. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8047, 2018.
- BOTELHO-SOUZA, L. F. *et al.* Hepatitis delta: virological and clinical aspects. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 177, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRICHLER, S. *et al.* Commercial Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays Can Underestimate or Fail to Quantify Hepatitis Delta Virus Viremia. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 6, p. 734 – 740, 2013.

BRICHLER, S. *et al.* Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. **Journal of clinical microbiology**, v.52, n.5, p. 1694–1697, 2014.

CÂMARA, B. **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**. 2013. Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/05/elisa.html>. Acesso em: 28 jul. 2019.

CHAO, M. *et al.* Whole-genome analysis of genetic recombination of hepatitis delta virus: molecular domain in delta antigen determining trans-activating efficiency. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 3460-3469, 2015.

CHEN, H. *et al.* Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. **Gut**. v. 68, p. 512-521, 2018.

CIANCIO, A.; RIZZETTO, M. Chronic hepatitis D at a standstill: where do we go from here?. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 68–71, 2014.

COLAVITTI, F.; GARCIA, R. Qual a diferença entre hepatite A, B, C, D e E? **Revista Galileu**, n. 187, 2007. Disponível em: <http://revistagalileu.globo.com/Galileu/0,6993,ECT656760-1716-7,00.html>. Acesso em: 14 jul. 2019.

COLLER, K. E. *et al.* Development and performance of prototype serologic and molecular tests for hepatitis delta infection. **Scientific reports**, v. 8, p. 209, 2018.

CUNHA, C.; TAVANEZ, J. P.; GUDIMA, S. Hepatitis delta virus: A fascinating and neglected pathogen. **World journal of virology**, v. 4, n. 4, p. 313-322, 2015.

DAW, M. A. The Epidemiology of Hepatitis D Virus in North Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Scientific World Journal**, v. 2018, 11p, 2018.

DÉNY, P. Hepatitis Delta Virus Genetic Variability: From Genotypes I, II, III to Eight Major Clades?. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 307, p. 151-171, 2006.

DI BISCEGLIE, A. M.; NEGRO, F. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. **Hepatology**, v. 10, p. 1014-1016, 1989.

DING, J. *et al.* High expression of small hepatitis D antigen in Escherichia coli and ELISA for diagnosis of hepatitis D virus. **Journal of Virological Methods**, v. 197, p. 34–38, 2014.

FARCI, P. Delta hepatitis: an update. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 212-219, 2003.

FARCI, P.; NIRO, G.A. Current and Future Management of Chronic Hepatitis D. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n.6, p. 342–351, 2018.

FONSECA, J. C. F. da. Hepatite D. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.2, p.181-190, 2002.

- HUANG, C. R.; LO, S. J. Evolution and diversity of the human hepatitis d virus genome. **Advances in bioinformatics**, v. 2010, 2010.
- HUANG, C. R.; LO, S. J. Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14589-14597, 2014.
- HUNT, R. **Chapter Nineteen – Hepatitis**, 2016. Disponível em: <https://www.microbiologybook.org/virol/hepatitis-disease2.html>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- INDAVIDAS. A importância dos testes rápidos. 2018. Disponível em: <https://indavidas.com.br/a-importancia-dos-testes-rapidos/>. Acesso em: 17 jul. 2019.
- JAPOLLA, G. *et al.* Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. **Enciclopédia Biosfera**, p. 2635-2649, 2015.
- JIANHUI, P. **Kit for detecting Han people HDV (hepatitis delta virus)**. Depositante: Chengdu Baitai Saiwei Biological Technology Co., LTD. CN107641661. Depósito: 28 de dezembro de 2016.
- KONSTANTINOU, G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *In*: LIN J.; ALCOCER, M. (eds) **Food Allergens**. New York: Humana Press, 2017. p. 79-94.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LE GAL, F. *et al.* Eighth Major Clade for Hepatitis Delta Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1447-1450, 2006.
- LE GAL, F. *et al.* Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. **Hepatology**, v. 66, n. 6, p. 1826-1841, 2017.
- LEMPP, F. A.; URBAN, S. Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 172, 2017.
- LIN A.V. Indirect ELISA. *In*: HNASKO R. (eds) **ELISA: Methods and Protocols**, New York: Humana Press, 2015. p. 51-59.
- LU, X. X. *et al.* Expression and Purification of Recombinant Hepatitis Delta Virus (HDV) Antigen for Use in a Diagnostic ELISA for HDV Infection Using the High-Density Fermentation Strategy in *Escherichia coli*. **Biomedical and Environmental Sciences**. v. 29, n. 6, p. 417-423, 2016.
- MATEJTSCHUK, P.; PHILLIPS, P. Product Stability and Accelerated Degradation Studie. *Medicines from Animal Cell Culture*, 2007.
- MEHTA, H.; TIDWELL, L.; LIOTTA L. A. Inventions and Patents: A Practical Tutorial. **Methods in Molecular Biology**, v. 1606, p. 379-397, 2017.
- MENEGHISSE, C. S. **Boas práticas de fabricação e o processo de validação no desenvolvimento e produção de um kit imunodiagnóstico**. 2007.175 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MENTHA, N. *et al.* A review on hepatitis D: From virology to new therapies. **Journal of advanced research**, v. 17, p. 3-15, 2019.

MILLIPORE. **Rapid Lateral Flow Test Strips, Considerations for product development.** Darmstadt, 36p, 2013.

NEGRO, F. Structure and Molecular Virology. *In*: THOMAS, H. C. *et al.* (eds) **Viral Hepatitis.** John Wiley & Sons, 2013. p. 393-402.

NGUYEN, H. M. *et al.* Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam. **PloS one**, v. 12, n. 4, 2017.

NOUREDDIN, M.; GISH, R. Hepatitis delta: epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. **Current gastroenterology reports**, v. 16, n. 1, p. 365, 2014.

NUNES, H. M.; MONTEIRO, M. R. C. C.; SOARES, M. C. P. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D na área indígena Apyterewa, do grupo Parakanã, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2767-2779. 2007.

OBGYN KEY, **Hepatitis.** 2017. Disponível em: <https://obgynkey.com/hepatitis/>. Acesso em: 14 jul. 2019.

O'FARRELL, B. Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems. *In*; WONG, R. C.; TSE, H. Y. (eds). **Lateral Flow Immunoassay**, New York: Humana Press. 2009, p.1-33.

OMPI. **Patents:** What is a Patent? Disponível em: <https://www.wipo.int/patents/en/#>. Acesso em: 28 jul. 2019.

OLIVER, C. Conjugation of Colloidal Gold to Proteins. *In*: JAVOIS L. C. (eds) **Immunocytochemical Methods and Protocols.** New York: Humana Press, 1994. p 303-307.

PASCARELLA S.; NEGRO F. Hepatitis D virus: an update. **Liver International**, v. 31, p. 7-21, 2011.

PEREIRA, L. B. **Validação de kit imunocromatográfico rápido para diagnóstico da doença de Chagas.** 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Biotecnologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

PRASIDTHRATHSINT, K.; STAPLETON, J. T. Laboratory Diagnosis and Monitoring of Viral Hepatitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 48, p. 259-279, 2019.

RADJEF, N. *et al.* Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. **Journal of virology**, v. 78, n.5, p. 2537–2544, 2004.

RIZZETTO, M.; ALAVIAN, S. M. Hepatitis delta: The rediscovery. **Clinics in Liver Disease**, v. 17, p. 475–487, 2013.

RIZZETTO, M. *et al.* Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut**, v. 18, n. 12, p. 997-1003, 1977.

RIZZETTO, M. Hepatitis D (Delta). **Seminars in Liver Disease**, v. 32, n. 03, p. 193–194, 2012.

RIZZETTO, M.; PONZETTO, A.; FORZANI, I. Epidemiology of hepatitis delta virus: Overview. **Prog Clin Biol Res**, v. 364, p. 1–20, 1991.

- RIZZETTO, M. Targeting Hepatitis D. **Seminars in Liver Disease**, v. 38, n. 01, p.066–072, 2018.
- RIZZETTO, M. The Delta Agent. **Hepatology**, v. 3, p. 729-737, 1983.
- SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: A Laboratory manual**. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- SANTOS, A. R. R. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos empregando proteínas recombinantes como alternativas para o diagnóstico da leishmaniose visceral**. 2019. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- SHEN, L. *et al.* Development of a hepatitis delta virus antibody assay for study of the prevalence of HDV among individuals infected with hepatitis B virus in China. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 3, p. 445-449, 2012.
- STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, p. 37–44, 1991.
- TAYLOR J. M. Hepatitis D Virus Replication. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n.11, 2015.
- TELELAB. **Diagnóstico de Hepatites Virais**. 2014. Disponível em: https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22180/mod_resource/content/2/Hepatites%20-%20Manual%20Aula%201_SEM.pdf. Acesso em: 28 jul. 2019.
- URDEA, M. *et al.* Requirements for high impact diagnostics in the developing world. **Nature**, v. 444, p. 73-79, 2006.
- VILLIERS, M. B. *et al.* Protein-peptide arrays for detection of specific anti-hepatitis D virus (HDV) genotype 1, 6, and 8 antibodies among HDV-infected patients by surface plasmon resonance imaging. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1164-1171, 2015.
- WANG, Y. *et al.* A new dual-targeting real-time RT-PCR assay for hepatitis D virus RNA detection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 112-117, 2018.
- WEDEMEYER, H.; HARDTKE, S.; MANNNS, M. P. Treatment of hepatitis Delta. **Clinical liver disease**, v. 2, n. 6, p. 237–239, 2013.
- WEDEMEYER, H.; MANNNS, M. P. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 31-40, 2010.
- WHO. World Health Organization. **Hepatitis D**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>. Acesso em: 28 jul. 2019.
- WORLD HEPATITIS ALLIANCE. **World Hepatitis Day 2018: Find the Missing Millions, Campaign Toolkit**. Disponível em: http://www.worldhepatitisalliance.org/sites/default/files/whd-resources/find_the_missing_millions_campaign_toolkit.pdf. Acesso em: 14 jul. 2019.
- XIRIDOU, M. How hepatitis D virus can hinder the control of hepatitis B virus. **PloS one**, v. 4, n. 4, 2009.

YURDAYDIN, C. A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, n. 11, p. 812-816, 2007.

YURDAYDIN, C. *et al.* Diagnosis, management and treatment of hepatitis delta virus infection: Turkey 2017 Clinical Practice Guidelines. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v.28, p. 84-89, 2017a.

YURDAYDIN, C. Recent advances in managing hepatitis D. **F1000Research**, v. 6, p. 1596, 2017b.

ANEXO - Certificado de aprovação no CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Produção de proteínas recombinantes do vírus da dengue e da hepatite D utilizando *Pichia pastoris* e baculovírus/células de inseto como sistema de expressão e avaliação do seu potencial para sorodiagnóstico

Pesquisador: Ricardo Tostes Gazzinelli

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18988718.0.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS
FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.662.564

APÊNDICE - Listagem das amostras utilizadas durante o estudo

Tabela 7 - Listagem das amostras utilizadas para análise de sensibilidade e especificidade e os resultados obtidos utilizando as metodologias de ELISA com a DTH10.1, ELISA com a DTH10 e teste imunocromatográfico com a DTH10.1

Amostra	Caracterização	ELISA-DTH10.1	ELISA-DTH10	Teste Imunocromatográfico
1	HDV+	R	R	R
2	HDV+	R	R	R
3	HDV+	R	R	R
4	HDV+	R	R	R
5	HDV+	R	R	R
7	HDV+	R	R	R
8	HDV+	R	NR	R
9	HDV+	NR	NR	NR
10	HDV+	NR	NR	NR
11	HDV+	R	R	R
12	HDV+	R	R	R
13	HDV+	NR	NR	NR
14	HDV+	R	R	R
15	HDV+	R	R	R
16	HDV+	R	R	R
17	HDV+	R	R	R
18	HDV+	R	R	R
19	HDV+	R	R	R
20	HDV+	R	R	R
21	HDV+	R	R	R
22	HDV+	NR	NR	R
23	HDV+	R	R	R
24	HDV+	R	R	R
25	HDV+	R	R	NR
26	HDV+	R	R	R
27	HDV+	R	R	R
28	HDV+	R	R	R
29	HDV+	R	R	R
30	HDV+	NR	NR	NR
31	HDV+	R	R	R
32	HDV+	R	R	R
33	HDV+	R	R	R
34	HDV+	R	R	R
35	HDV+	R	R	R
36	HDV+	R	IN	NR
37	HDV+	NR	NR	NR
38	HDV+	R	R	R
39	HDV+	NR	NR	NR

continua

Continuação

40	HDV+	R	R	R
41	HDV+	R	R	R
42	HDV+	R	R	R
43	HDV+	R	R	R
44	HDV+	NR	NR	NR
45	HDV+	NR	NR	NR
46	HDV+	R	R	R
47	HDV+	R	R	R
48	HDV+	NR	NR	NR
49	HDV+	NR	NR	R
50	HDV+	R	R	R
6800	HDV+	R	R	-
4877	HDV+	R	R	-
3683	HDV+	NR	R	-
5960	HDV+	R	R	-
7174	HDV+	R	R	-
1970	HDV+	IN	NR	-
2368	HDV+	R	R	-
6800	HDV+	R	R	-
6223	HDV+	R	R	-
4045	HDV+	NR	NR	-
4962	HDV+	NR	R	-
6976	HDV+	NR	NR	-
6837	HDV+	R	R	-
3166	HDV+	R	NR	-
6638	HDV+	R	R	-
5623	HDV+	R	R	-
7098	HDV+	R	R	-
4710	HDV+	NR	NR	-
1076	HDV+	R	R	-
6850	HDV+	R	R	-
6797	HDV+	R	R	-
6955	HDV+	R	R	-
2421	HDV+	R	R	-
1284	HDV+	R	R	-
3332	HDV+	R	R	-
4505	HDV+	R	R	-
2134	HDV+	R	R	-
6348	HBV+	NR	NR	-
7186	HBV+	NR	NR	-
7182	HBV+	NR	NR	-
3200	HBV+	NR	NR	-
5068	HBV+	NR	NR	-
5514	HBV+	NR	NR	-
6866	HBV+	NR	NR	-
7127	HBV+	NR	NR	-

Continua

Continuação

7170	HBV+	NR	NR	-
5355	HBV+	NR	NR	-
4288	HBV+	NR	NR	-
4450	HBV+	NR	NR	-
7076	HBV+	NR	NR	-
3208	HBV+	NR	NR	-
6353	HBV+	NR	NR	-
7192	HBV+	NR	NR	-
7153	HBV+	NR	NR	-
2312	HBV+	NR	NR	-
3277	HBV+	NR	NR	-
1135	HBV+	IN	NR	-
7171	HBV+	NR	NR	-
6877	HBV+	NR	NR	-
7211	HBV+	NR	NR	-
7205	HBV+	NR	NR	-
7178	HBV+	NR	NR	-
7214	HBV+	NR	NR	-
7228	HBV+	NR	NR	-
7169	HBV+	NR	NR	-
5344	HBV+	NR	NR	-
7206	HBV+	NR	NR	-
6328	HBV+	NR	NR	-
6219	HBV+	R	R	-
3305	HBV+	NR	NR	-
56	HCV+	NR	NR	-
57	HCV+	NR	NR	-
58	HCV+	NR	NR	-
59	HCV+	NR	NR	-
60	HCV+	NR	NR	-
61	HCV+	NR	NR	-
62	HCV+	NR	NR	-
63	HCV+	NR	NR	-
64	HCV+	NR	NR	-
65	HCV+	NR	NR	-
66	HCV+	NR	NR	-
67	HCV+	NR	NR	-
68	HCV+	NR	NR	-
69	HCV+	NR	NR	-
70	HCV+	NR	NR	-
71	HCV+	NR	NR	-
72	HCV+	NR	NR	-
73	HCV+	NR	NR	-
74	HCV+	NR	NR	-
75	HCV+	NR	NR	-
76	HCV+	NR	NR	-

Continua

Continuação

77	HCV+	NR	NR	-
78	HCV+	NR	NR	-
79	HCV+	NR	NR	-
80	HCV+	NR	NR	-
81	HCV+	NR	NR	-
82	HCV+	NR	NR	-
83	HCV+	NR	NR	-
84	HCV+	NR	NR	-
85	HCV+	NR	NR	-
86	HCV+	NR	NR	-
101	DS	NR	NR	-
102	DS	NR	NR	-
103	DS	NR	NR	-
104	DS	NR	NR	-
105	DS	NR	NR	NR
106	DS	NR	NR	NR
107	DS	NR	NR	-
108	DS	NR	NR	-
109	DS	NR	NR	-
110	DS	NR	NR	-
111	DS	NR	NR	NR
112	DS	NR	NR	-
113	DS	NR	NR	-
114	DS	NR	NR	-
115	DS	NR	NR	-
116	DS	NR	NR	-
117	DS	NR	NR	-
118	DS	NR	NR	-
119	DS	NR	NR	NR
120	DS	NR	NR	-
121	DS	NR	NR	NR
122	DS	NR	NR	-
123	DS	NR	NR	NR
124	DS	NR	NR	NR
125	DS	NR	NR	NR
126	DS	NR	NR	NR
127	DS	NR	NR	NR
128	DS	NR	NR	NR
129	DS	NR	NR	-
130	DS	NR	NR	NR
131	DS	NR	NR	NR
132	DS	NR	NR	NR
133	DS	NR	NR	NR
134	DS	NR	NR	NR
135	DS	NR	NR	NR
136	DS	NR	NR	-

Continua

Conclusão

137	DS	NR	NR	NR
138	DS	NR	NR	NR
139	DS	NR	NR	NR
140	FR+	NR	NR	-
141	FR+	NR	NR	-
142	FR+	NR	NR	-
143	FR+	NR	NR	-
143	FR+	NR	NR	-
143	FR+	NR	NR	-
143	FR+	NR	NR	-
143	FR+	NR	NR	-

DS: Doador Saudável, FR+: Fator reumatoide positivo, R: Reagente, NR: Não reagente, IN: Indeterminado.