

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Laís Dias Ribeiro

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS SOROLÓGICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C**

Belo Horizonte

2024

Laís Dias Ribeiro

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS SOROLÓGICOS PARA O
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte

2024

R484p Ribeiro, Laís Dias.
Padronização e validação de ensaios sorológicos para o diagnóstico da Hepatite C [recurso eletrônico] / Laís Dias Ribeiro. – 2024.

1 recurso eletrônico (87 f. : il.) : pdf

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Diagnóstico – Teses. 2. Hepatite C – Teses. 3. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática – Teses. 4. Testes de diagnóstico rápido – Teses. 5. Validação de método – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.075



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C"

LAÍS DIAS RIBEIRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia treze de junho de dois mil e vinte e quatro, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Prof. Luiz Guilherme Dias Heneine
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Prof. Bruno Eduardo Fernandes Mota
UFMG

Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo
UFMG

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Orientador
UFMG

Belo Horizonte, 13 de junho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Membro de comissão**, em 14/06/2024, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo, Chefe de departamento**, em 14/06/2024, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Guilherme Dias Heneine, Usuário Externo**, em 17/06/2024, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Eduardo Fernandes Mota, Membro**, em 03/07/2024, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3303567 e o código CRC A993E56D.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida e por me guiar e fortalecer, me permitindo finalizar esse ciclo.

Aos meu pais, Edeilda e Boaventura, e à minha irmã, Rafaela, por serem minha base, meu exemplo e minha motivação.

Ao Prof. Jenner, por ter aceitado a orientação do mestrado.

A todos da empresa Quibasa-Bioclin, pela oportunidade de me desenvolver pessoal e profissionalmente e pelo fornecimento do material que possibilitou a realização deste trabalho.

Em especial, à equipe de Pesquisa e Desenvolvimento, por todo apoio, auxílio, companheirismo, risadas e cafés compartilhados todos os dias.

RESUMO

A Hepatite C é causada por um vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, denominado HCV. Na maioria dos casos, a infecção não possui sintomatologia na fase aguda, mas se torna crônica em 75 a 85% dos acometidos. Estima-se que 71 milhões de pessoas convivem com hepatite C crônica em todo o mundo, levando a quadros de fibrose hepática, cirrose, hepatocarcinoma e diversos outros quadros extra-hepáticos associados. O diagnóstico inicial da infecção pelo HCV é feito geralmente pela detecção anticorpos em amostras de soro e plasma. Entretanto, a utilização de amostras de sangue impregnado em papel de filtro (DBS) e metodologias *point-of-care* são alternativas para a triagem de indivíduos com alto risco de infecção em locais com baixa infraestrutura laboratorial. Este trabalho teve como objetivos a padronização e a validação de um imunoenensaio enzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de soro, plasma e DBS e a padronização de um teste imunocromatográfico para a detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de soro, plasma e sangue. Um total de 237 amostras de soro e plasma e 185 amostras de DBS foram utilizadas no estudo do ELISA. O ensaio desenvolvido demonstrou uma sensibilidade e especificidade >99,99%. Na sensibilidade analítica comparada, as amostras de DBS obtiveram um índice *kappa* de 0,41, com concordância regular. As análises de repetibilidade, reprodutibilidade e interensaio apresentaram resultados com coeficiente de variação <20%. Para o ensaio imunocromatográfico, um total de 90 amostras de soro foram utilizadas, demonstrando uma sensibilidade e especificidade >99,99%. Na sensibilidade analítica comparada, o teste rápido com amostras de soro obteve um *kappa* de 1,0, com concordância perfeita, enquanto a utilização de amostras de sangue obteve um *kappa* de 0,61, representando uma boa concordância. Esses resultados respaldam o bom funcionamento dos ensaios desenvolvidos para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HCV tanto em amostras de soro/plasma quanto em amostras de DBS e sangue, nas metodologias de ELISA e teste rápido.

Palavras-chave: diagnóstico; hepatite C; ELISA; DBS; teste rápido; validação.

ABSTRACT

Hepatitis C is caused by a virus from the *Flaviviridae* family, genus *Hepacivirus*, called Hepatitis C Virus (HCV). In most cases, the infection has no symptoms in the acute phase but becomes chronic in 75 to 85% of the affected ones. It is estimated that 71 million people live with chronic hepatitis C worldwide, leading to liver fibrosis, cirrhosis, hepatocarcinoma, and various other associated extra-hepatic conditions. The initial diagnosis of HCV infection is usually made by detecting antibodies in serum and plasma samples. However, the use of dried blood samples impregnated in filter paper (DBS) and point-of-care methodologies are alternatives for screening individuals at high risk of infection in places with poor laboratory infrastructure. This study aimed to standardize and validate an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-HCV antibodies in serum, plasma, and DBS samples and to standardize an immunochromatographic test for the detection of anti-HCV antibodies in serum, plasma, and blood samples. For ELISA, 237 serum and plasma samples and 185 DBS samples were used. The assay developed demonstrated a sensitivity and specificity of >99.99%. In the comparative analytical sensitivity, the DBS samples obtained a kappa index of 0.41, with regular agreement. The repeatability, reproducibility, and inter-assay analyses showed results with a coefficient of variation of <20%. For the immunochromatographic test, 90 serum samples were used, showing a sensitivity and specificity of >99.99%. In comparative analytical sensitivity, the rapid test with serum samples obtained a kappa of 1.0, with perfect agreement, while the use of blood samples obtained a kappa of 0.61, representing good agreement. These results support the good functioning of the assays developed for the serological diagnosis of HCV infection both in serum/plasma samples and in DBS and blood samples, in the ELISA and rapid test methodologies.

Keywords: diagnosis; hepatitis C; ELISA; DBS; rapid test; validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore filogenética dos genótipos e subtipos do HCV.....	18
Figura 2 – Distribuição e prevalência relativa dos genótipos de HCV no mundo.....	20
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do HCV.....	21
Figura 4 – Modelos da estrutura lipoviral do HCV.....	22
Figura 5 – Variabilidade nucleotídica do HCV.....	23
Figura 6 – Proteínas virais.....	24
Figura 7 – Entrada do HCV nas células hepáticas.....	27
Figura 8 – Esquema da formação e liberação de novas partículas de HCV.....	29
Figura 9 – Resposta imune frente a infecção do HCV em casos resolvidos e casos crônicos.....	31
Quadro 1 – Vantagens e desvantagens entre os ensaios imunológicos laboratoriais convencionais e testes rápidos.....	38
Figura 10 – Fluxograma para o diagnóstico da hepatite C crônica.....	39
Figura 11 – Cascata do cuidado da Hepatite C.....	43
Figura 12 – Exemplo de amostra de DBS.....	47
Figura 13 – Funcionamento do ELISA sanduíche anti-HCV.....	49
Figura 14 – Exemplo de microplaca de ELISA em tiras.....	50
Quadro 3 – Protocolos testados com amostras de DBS.....	52
Figura 15 – Funcionamento do teste rápido.....	53
Figura 16 – Verificação de pH e concentração de anticorpo no pH 6,0.....	62
Figura 17 – Verificação de pH e concentração de anticorpo no pH 7,0.....	63
Figura 18 – Verificação de pH e concentração de anticorpo no pH 6,0.....	63
Quadro 4 – Condições padronizadas para o teste rápido.....	64
Figura 19 – Esquema de montagem do teste rápido.....	65
Figura 20 – Resultado da curva ROC para amostras de soro e plasma.....	66
Figura 21 – Resultado da curva ROC para amostras de DBS.....	66
Gráfico 1 – Dispersão das amostras e análise do cut-off.....	67
Gráfico 2 – Ensaio de reatividade cruzada com amostras de soro e plasma.....	73
Gráfico 3 – Ensaio de reatividade cruzada com amostras de DBS.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras utilizadas para reatividade cruzada.....	58
Tabela 2 – Titulação dos reagentes – teste inicial.....	60
Tabela 3 – Titulação dos reagentes – teste final.....	61
Tabela 4 – Protocolos com amostras de DBS.....	61
Tabela 5 – Resultado das amostras testadas em densidade óptica.....	65
Tabela 6 – Amostras de soro e plasma – ELISA.....	68
Tabela 7 – Amostras de DBS – ELISA.....	68
Tabela 8 – Comparação do índice entre as amostras de plasma e DBS.....	69
Tabela 9 – Ensaio de repetibilidade.....	70
Tabela 10 – Ensaio de reprodutibilidade.....	71
Tabela 11 – Ensaio de interensaio.....	72
Tabela 12 – Amostras de soro e plasma – teste rápido.....	74
Tabela 13 – Sensibilidade analítica comparada entre as metodologias.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do Vírus da Hepatite C
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo-A-I	Apolipoproteína A-I
Apo-B-48	Apolipoproteína B-48
Apo-B-100	Apolipoproteína B-100
Apo-C-I	Apolipoproteína C-I
Apo-C-II	Apolipoproteína C-II
Apo-E	Apolipoproteína E
AST	Aspartato Aminotransferase
C	Proteína Core do Nucleocapsídeo
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD81	<i>Cluster of Differentiation 81</i>
CEP	Conselho de Ética em Pesquisa
CI	Intervalo de Confiança
CLDN1	Claudina Tipo 1
CLIA	Quimioluminescência
CMV	Citomegalovírus
CV	Coeficiente de Variação
CXCL10	Ligante 10 de Quimiocina de Motivo CXC
DAA	Antivirais de Ação Direta
DBS	Sangue Impregnado em Papel de Filtro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
E1	Proteína do Envelope 1
E2	Proteína do Envelope 2
EUA	Estados Unidos da América
ELFA	Imunoensaio Enzimático Fluorescente
ELISA	Ensaio Imunoabsorção Enzimática
EBV	Vírus Epstein-Barr
GBV-B	Vírus GB tipo B

HAV	Vírus da Hepatite A
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCC	Hepatocarcinoma
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	Enzima Peroxidase
HTLV	Vírus T Linfotrópico Humano
IDL	Lipoproteína de Média Densidade
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRES	Sítio de Entrada Interna do Ribossomo
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LFA	Teste de Fluxo Lateral
MS	Ministério da Saúde
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NS1	Proteína Não-Estrutural 1
NS2	Proteína Não-Estrutural 2
NS3	Proteína Não-Estrutural 3
NS4A	Proteína Não-Estrutural 4A
NS4B	Proteína Não-Estrutural 4B
NS5A	Proteína Não-Estrutural 5A
NS5B	Proteína Não-Estrutural 5B
OCLN	Ocludina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operator Characteristics</i>
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

SRB1	Receptor do Tipo Scavenger B1
SUS	Sistema Único de Saúde
TMA	Amplificação Mediada Por Transcrição
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
gr	Gramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Histórico da hepatite C	16
2.2	O vírus da hepatite C	17
2.2.1	<i>Classificação e variabilidade genética</i>	17
2.2.2	<i>Estrutura do HCV e sua proteínas</i>	20
2.2.3	<i>Ciclo biológico</i>	25
2.2.4	<i>Resposta imune</i>	29
2.3	História natural da hepatite C	31
2.4	Diagnóstico	33
2.4.1	<i>Utilização de amostras de sangue impregnado em papel de filtro</i>	40
2.5	Tratamento e prevenção	41
3	JUSTIFICATIVA	43
4	OBJETIVOS	45
4.1	Objetivos gerais	45
4.2	Objetivos específicos	45
5	MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1	Local de realização dos testes	46
5.2	Amostras utilizadas	46
5.3	Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA)	48
5.4	Padronização do ensaio imunocromatográfico (teste rápido)	52
5.5	Validação do ensaio imunoenzimático	56
5.5.1	<i>Cut-off, sensibilidade e especificidade</i>	56
5.5.2	<i>Repetibilidade</i>	57
5.5.3	<i>Reprodutibilidade</i>	57
5.5.4	<i>Interensaio</i>	57
5.5.5	<i>Reatividade cruzada</i>	58
5.6	Validação do ensaio imunocromatográfico	58
5.6.1	<i>Sensibilidade e especificidade</i>	58
5.7	Comparativo de sensibilidade analítica entre os métodos	58
6	RESULTADOS	60

6.1	Padronização do ensaio imunoenzimático	60
6.2	Padronização do ensaio imunocromatográfico	62
6.3	Validação do ensaio imunoenzimático	65
6.3.1	<i>Cut-off, sensibilidade e especificidade</i>	65
6.3.2	<i>Repetibilidade</i>	69
6.3.3	<i>Reprodutibilidade</i>	70
6.3.4	<i>Interensaio</i>	71
6.3.5	<i>Reatividade cruzada</i>	72
6.4	Validação do ensaio imunocromatográfico	74
6.4.1	<i>Sensibilidade e especificidade</i>	74
6.5	Comparativo de sensibilidade analítica entre os métodos	74
7	DISCUSSÃO	76
8	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Identificado em 1989 por Houghton e colaboradores, o Vírus da Hepatite C (HCV) é um vírus hepatotrópico que infecta os seres humanos, classificado no gênero *Hepacivirus* e pertencente à família *Flaviviridae* (Simmonds *et al.*, 2017). Estruturalmente, a partícula viral do HCV possui de 45 a 65 nm de diâmetro, constituída por um envelope de membrana bilipídica onde se encontram ancoradas as proteínas estruturais E1 e E2, e um nucleocapsídeo de formato não-icosaédrico formado exclusivamente por uma proteína denominada core (C), que engloba o material genético. O genoma do HCV é formado por uma única molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva que codifica, além das três proteínas estruturais presentes no nucleocapsídeo e no envelope, sete proteínas não-estruturais (NS1 ou p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) importantes para o ciclo replicativo do vírus no hospedeiro (Manns *et al.*, 2017; Morozov e Lagaye, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 71 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo HCV, das quais apenas 19% estão cientes de sua condição e desses, apenas cerca de 15% receberam tratamento curativo (Stasi, Silvestri e Voller, 2020). No Brasil, de acordo com o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, até 2019 foram diagnosticados 384.284 casos de hepatite C no país, sendo 82,8% nas regiões Sudeste e Sul do país. Essa concentração de casos pode ser explicada pelo fato que 55% de toda a população brasileira está presente nessas regiões, além da facilidade de acesso e busca pelo diagnóstico nesses locais (Brasil, 2020).

A transmissão do HCV ocorre principalmente pelo contato direto com o sangue do indivíduo infectado, mas também é possível de acontecer a transmissão sexual e vertical (transplacentária e durante o parto). Por conta disso, atualmente as pessoas com maior risco de contrair o vírus são os usuários de drogas injetáveis, a população carcerária e indivíduos com múltiplos parceiros sexuais (Alter, 2011). Embora mais comumente assintomática na fase aguda, 75 a 85% dos casos progridem para hepatite crônica, que pode avançar para casos de cirrose, falência hepática e hepatocarcinoma (HCC) (Manns *et al.* 2017). O diagnóstico dos indivíduos infectados

é realizado inicialmente por meio de testes sorológicos através da detecção de anticorpos e antígenos específicos do vírus, seguido de confirmação feita por técnicas de biologia molecular para a detecção de RNA viral (ANSALDI et al. 2014).

A hepatite C é uma doença de significado clínico importante, que pode levar a consequências severas à saúde e qualidade de vida do indivíduo contaminado. Por isso, a principal ferramenta que deve ser fortalecida é a do diagnóstico preciso e precoce. Entretanto, a doença possui duas peculiaridades que dificultam uma triagem efetiva: a grande maioria dos portadores crônicos não são cientes de sua condição e o maior risco de infecção está presente nas pessoas em situação de vulnerabilidade, como os usuários de drogas, encarcerados, imigrantes e indivíduos que trabalham com prostituição, os quais, em geral, possuem pouco ou nenhum acesso aos serviços de saúde ou não são propensos a divulgar sua condição (WHO, 2017b; Chevaliez, 2019). Além disso, as metodologias convencionais para a testagem do HCV, apesar de serem padrão-ouro para o diagnóstico e possuírem programas de qualidade bem estabelecidos, possuem a necessidade de punção venosa, infraestrutura laboratorial especializada para a realização dos testes e armazenamento das amostras em refrigeração ou congelamento. Ainda, a necessidade de várias visitas aos centros de saúde para que o diagnóstico seja feito é uma das causas de perdas dos indivíduos durante o atendimento (Grebely *et al.*, 2017; Terrault, 2019).

Assim, estratégias facilitadoras devem ser criadas e colocadas em prática, a fim de viabilizar a triagem em larga escala de indivíduos em risco e vulnerabilidade social, além de situações de baixa infraestrutura laboratorial. Através da identificação precoce dos portadores de HCV, o tratamento pode ser implementado de forma eficaz para promover a cura e evitar o desenvolvimento das graves complicações associadas ao vírus (Grebely *et al.*, 2017; WHO, 2017b; Chevaliez, 2019; Terrault, 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da hepatite C

No início da década de 1970, novos casos de hepatite em pacientes que receberam transfusão sanguínea começaram a serem descritos, mesmo com o advento da testagem das bolsas de sangue para hepatite B. Foi observado que aproximadamente 10% dos receptores de sangue adquiriram essa nova doença e que ela também ocorria de forma esporádica na comunidade. (Houghton, 2009; Hu *et al.*, 2020). Ainda que alguns dos quadros de infecção fossem devido à baixa sensibilidade dos ensaios para triagem de hepatite B da época (identificados posteriormente à transfusão), a maioria dos casos se diferenciava pela ausência de marcadores tanto do Vírus da Hepatite A (HAV) quanto do Vírus da Hepatite B (HBV), além de excluídas as infecções por outros agentes como o Citomegalovírus (CMV) e o Vírus Epstein-Barr (EBV) (Alter *et al.*, 1975).

Entre 1975 e 1978, Alter e colaboradores descreveram a nova doença como “Hepatite não-A não-B”, caracterizada pela ausência de marcadores sorológicos anti-HAV e anti-HBV. Além disso, os pesquisadores conseguiram infectar com sucesso cinco chimpanzés com o plasma de indivíduos infectados, sugerindo a sua característica de doença transmissível mantida por longos períodos (Alter *et al.*, 1975, 1978). Posteriormente a hepatite C foi identificada na verdade como uma doença silenciosa, fato que contribui muito para sua transmissibilidade e epidemiologia. Apenas 11 anos mais tarde, em 1989, Houghton e colaboradores finalmente identificaram o agente causador da nova doença, através de uma sequência de RNA presente nos indivíduos infectados; essa mesma sequência codificava um antígeno pelo qual diversos chimpanzés infectados geravam anticorpos. Com isso, denominaram o novo vírus como Vírus da Hepatite C, ou HCV, e desenvolveram um imunoensaio para a identificação de anticorpos contra o antígeno recombinante, chamado de C100-3 (Houghton, 2009). Mais tarde, Rice *et al.* (1997) construíram um clone de HCV capaz de se replicar, gerar lesão hepática e desenvolver resposta imune em chimpanzés infectados, provando que o novo vírus por si só era o causador dos quadros de hepatite pós-transfusionais anteriormente descritos. Apesar dos avanços feitos, os

clones de HCV desenvolvidos até o momento eram incapazes de serem replicados *in vitro*. Em 1999, Bartenschlager e colaboradores desenvolveram com sucesso um modelo de cultivo de HCV, o que permitiu o avanço das pesquisas para o melhor entendimento do vírus e da doença associada a ele (Pol e Lagaye, 2019; Hu *et al.*, 2020).

Os esforços acima descritos foram de extrema importância para a identificação do HCV, elucidação da fisiopatologia da hepatite C, desenvolvimento de métodos de diagnóstico e a criação de novos tratamentos em pouco mais de 45 anos de pesquisa. Em decorrência disso, no ano de 2020, os pesquisadores Harvey J. Alter (Instituto Nacional de Saúde - NIH / Estados Unidos da América - EUA), Michael Houghton (Universidade de Alberta / Canadá) e Charles M. Rice (Universidade Rockefeller / EUA) foram laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pelas suas respectivas colaborações na descoberta do HCV (Hu *et al.*, 2020).

2.2 O vírus da hepatite C

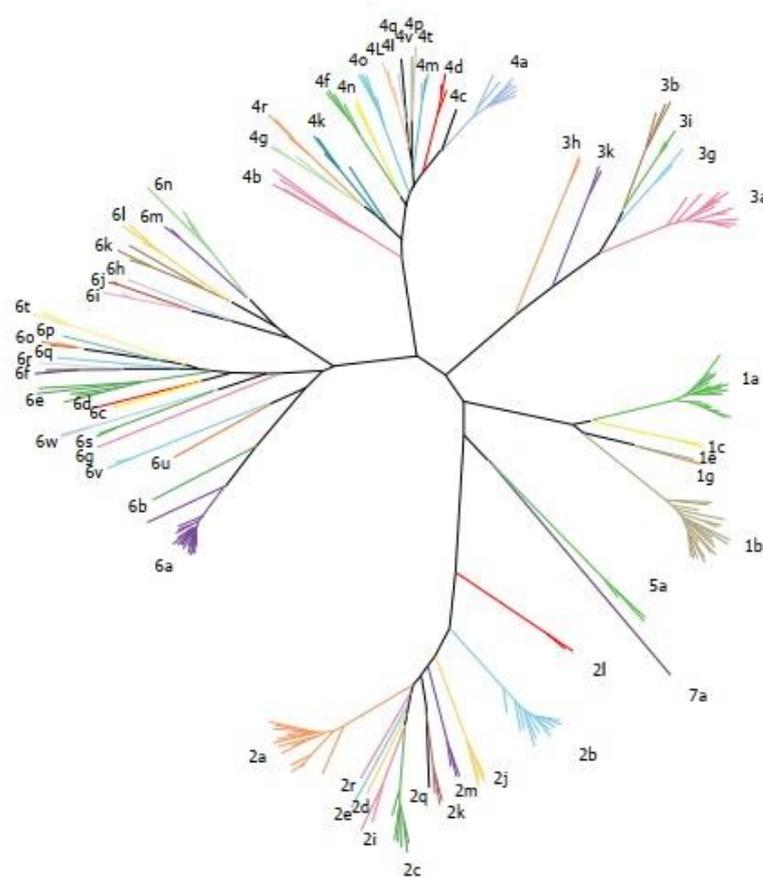
2.2.1 Classificação e variabilidade genética

Identificado pela primeira vez em 1989, o Vírus da Hepatite C é um vírus hepatotrópico humano classificado no gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*. Nesta família, também estão inclusos os vírus da Dengue, Zika, Febre Amarela e Febre do Nilo Ocidental (gênero *Flavivirus*), os vírus da Diarreia Viral Bovina e da Peste Suína Clássica (gênero *Pestivirus*) e outros vírus do gênero *Pegivirus* (Simmonds *et al.*, 2017). Até recentemente, o HCV era o único representante conhecido do gênero. Smith *et al.* (2016) propuseram a inserção de 13 novos integrantes do gênero, incluindo o vírus GBV-B, causador de doença hepática em macacos de Nova York.

O HCV é um vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva que possui uma grande heterogeneidade genética. Por conta disso, é classificado atualmente em 7 genótipos, nomeados de 1 a 7, diferentes entre si em uma taxa de 30-33%. Dentro deles ainda se encontram os subtipos, classificados por letras minúsculas e com variação de 15-25% entre os subtipos do mesmo genótipo (Preciado *et al.*, 2014; Shin-I, Sugiyama e

Mizokami, 2016). A Figura 1 representa os genótipos e os subtipos até agora descritos do HCV. Apesar da grande diversidade genética entre os genótipos e subtipos, todos possuem estrutura gênica idêntica, genes com aproximadamente o mesmo tamanho e pouca variação antigênica. Entretanto, cada um dos genótipos e subtipos do HCV têm suas características clínico-biológicas associadas (Simmonds, 2013; Shin-I, Sugiyama e Mizokami, 2016).

Figura 1 – Árvore filogenética dos genótipos e subtipos do HCV.



Representação gráfica da árvore filogenética do HCV. Cada ramo da árvore corresponde a uma linhagem representativa de cada subtipo dos sete genótipos do vírus da hepatite C.

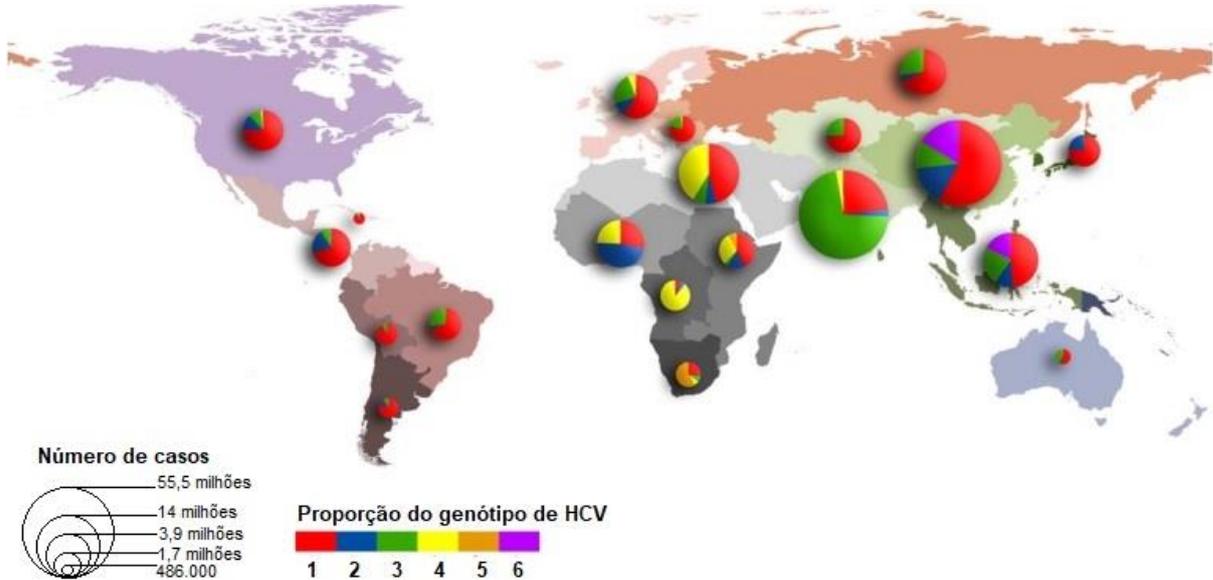
Fonte: Preciado *et al.*, 2014

A grande variabilidade genética do HCV é devida principalmente a falta de revisão da polimerase do vírus, provocando mutações pontuais a cada novo ciclo de replicação viral e pelo rearranjo genético que pode ocorrer durante esse processo. Essas modificações são selecionadas por diversos mecanismos como a resposta imune do hospedeiro e tratamento antiviral (Jackowiak *et al.*, 2014; Preciado *et al.*, 2014). A taxa

de variabilidade genética observada pode prever a origem e o histórico evolutivo do HCV dentro de uma população. Por exemplo, sabe-se que regiões geográficas que exibem alta variabilidade genética estão ligadas à evolução a longo prazo do HCV, enquanto regiões com pouca variabilidade relaciona-se com introdução recente do patógeno e conseqüentemente, evolução à curto prazo (Preciado *et al.*, 2014).

Cada genótipo e subtipo possui sua própria distribuição geográfica, conforme ilustrado pela Figura 2. O genótipo 1, segundo Messina *et al.* (2015), é o que mais possui casos de infecção em todo o mundo, com cerca de 46,2% do total de casos, sendo também o tipo mais prevalente no Brasil e o considerado atualmente o mais resistente ao tratamento. O subtipo 1a é amplamente distribuído nos EUA e no Norte Europeu, enquanto o subtipo 1b está presente por todo mundo; os outros subtipos possuem distribuição geográfica incerta. O genótipo 2, subtipos 2a e 2b, também possuem distribuição global, mas com apenas 9,1% dos casos de infecção; os demais subtipos do genótipo 2 são encontrados principalmente na Europa. O genótipo 3 é o segundo mais comum, com o equivalente a 30,1% do número global de casos. O subtipo 3a é frequente no Sul da Ásia e na Oceania, o subtipo 3b é encontrado principalmente no Leste Asiático e os outros subtipos são encontrados majoritariamente no Canadá. O genótipo 4 representa 8,3% dos casos de infecção pelo HCV, estando presente no Oriente Médio, nas regiões Norte e Central da África e na Europa. O genótipo 5, composto apenas pelo subtipo 5a, possui os menores casos de infecção associados, com menos de 1% do total e localizados principalmente no Sul da África. O genótipo 6 é distribuído principalmente pelo Leste e Sudeste Asiático e corresponde a 5,4% dos casos mundiais. O genótipo 7, composto unicamente pelo subtipo 7a, possui apenas um relato de caso de infecção no Canadá, presente em um imigrante da República do Congo. O padrão de prevalência dos genótipos em todo mundo é um retrato do padrão de migração histórica e atual entre os países (Messina *et al.*, 2015; Shin-I, Sugiyama e Mizokami, 2016).

Figura 2 – Distribuição e prevalência relativa dos genótipos de HCV no mundo.



Os genótipos e subtipos do HCV são distribuídos de maneira mundial. O tamanho do gráfico de “pizza” equivale ao número aproximado de casos de infecção na região, enquanto a distribuição de cores em cada gráfico é proporcional ao número de casos de acordo com o genótipo do vírus.

Fonte: Traduzido e modificado de Messina *et al.*, 2015

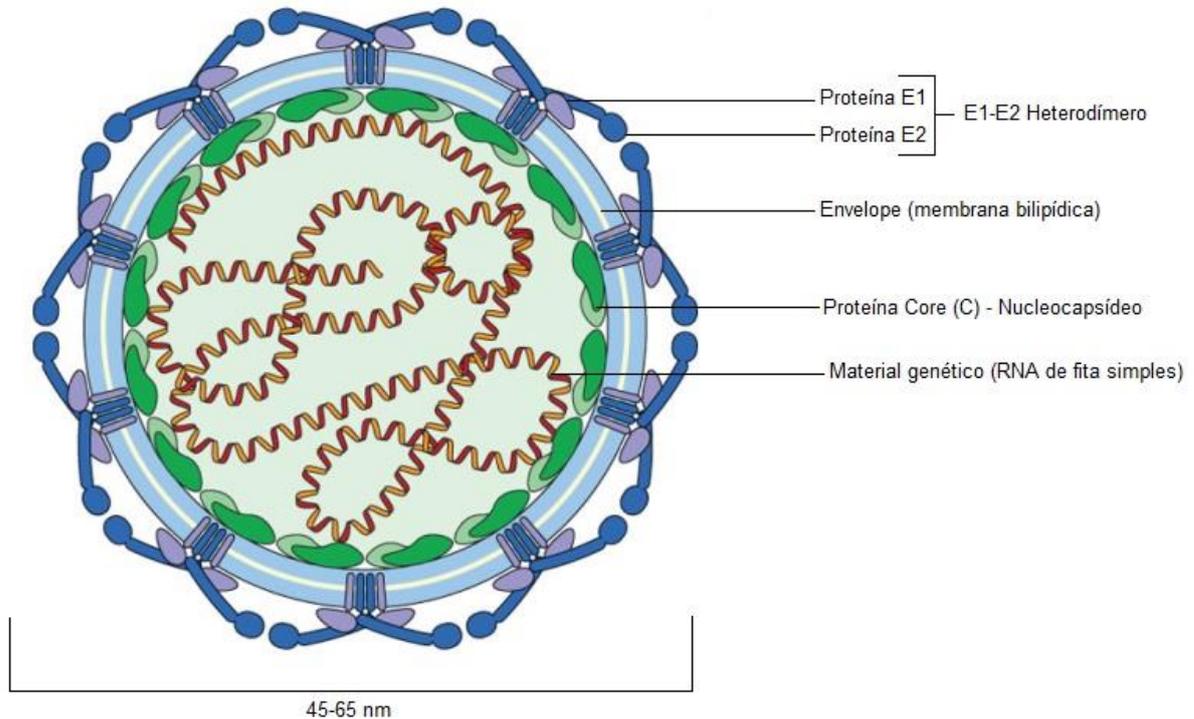
Outro fenômeno observado no HCV é a presença de “quasiespécies”, ou seja, populações dinâmicas de variantes genéticas do genótipo e subtipo infectante em um mesmo indivíduo. As quasiespécies estão intimamente relacionadas à rápida adaptação do HCV, alterando a resposta imune do hospedeiro, a resposta ao tratamento antiviral, a progressão e a cronificação da doença (Jackowiak *et al.*, 2014; Preciado *et al.*, 2014).

2.2.2 Estrutura do HCV e suas proteínas

Com aproximadamente 45 a 65 nm de diâmetro, o HCV é um vírus envelopado com membrana bilipídica, onde se encontram ancoradas as proteínas estruturais E1 e E2. Essas proteínas formam um heterodímero com importante papel no processo de ligação do vírus aos receptores e fusão na membrana das células hepáticas (Marcotrigiano e Catanese, 2016; Manns *et al.*, 2017; Morozov e Lagaye, 2018). O envelope viral engloba o nucleocapsídeo de formato não-icosaedro, formado exclusivamente por uma proteína denominada Core (C). Dentro dele, encontra-se uma única molécula de RNA de fita única e polaridade positiva, constituindo o genoma do

vírus (Kim e Chang, 2013; Manns *et al.*, 2017). A Figura 3 representa a estrutura do HCV.

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do HCV.



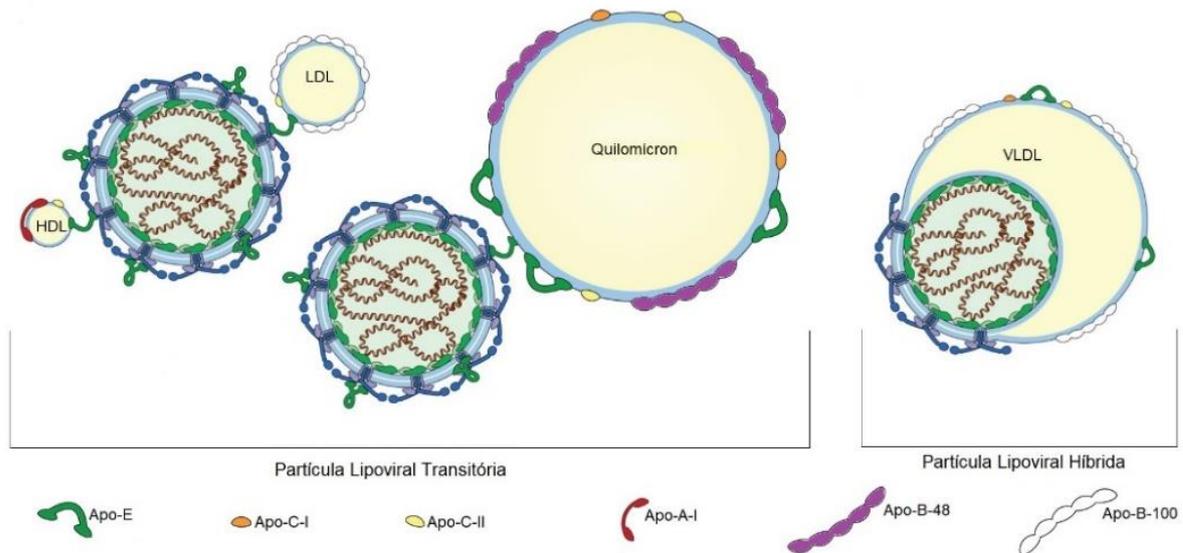
A figura acima representa a estrutura do vírus do HCV. O vírus é formado por um envelope de membrana bilipídica, onde estão ancoradas as proteínas E1 e E2. O nucleocapsídeo é formado por uma única proteína (core), que engloba todo o material genético do vírus, formado com uma molécula de RNA.

Fonte: Modificado de Lindenbach e Rice, 2013.

Entretanto, a maioria dos vírions não se apresenta da maneira descrita acima. Eles se associam às lipoproteínas presentes no sangue do hospedeiro, formando o que se chama de partícula lipoviral. As lipoproteínas possuem diversas funções no metabolismo lipídico do ser humano, como a solubilização e transporte dos lipídeos, cofatores enzimáticos e ligantes de receptores celulares. Elas são classificadas de acordo com a sua densidade, de forma decrescente: lipoproteína de alta densidade (HDL), de média densidade (IDL), de baixa densidade (LDL), de muito baixa densidade (VLDL) e quilomícron. (Lindenbach e Rice, 2013; Marcotrigiano e Catanese, 2016). A interação entre o HCV e as lipoproteínas é uma característica marcante e importante do vírus, que influencia diretamente na entrada do vírus nas células susceptíveis e no desenvolvimento da doença no hospedeiro. Sabe-se que as

partículas lipovirais do HCV mais infectantes possuem uma densidade baixa ($<1,10$ g/mL), ligadas na maioria das vezes ao LDL ou VLDL, formadas por quantidades variáveis de triglicerídeos, ésteres de colesterol e das apolipoproteínas associadas Apo-B-100, Apo-C-I, Apo-C-II e Apo-E, além da Apo-A-I quando ligado ao HDL e Apo-B-48 quando ligado ao quilomícron (Manns *et al.*, 2017; Wrensch *et al.*, 2018). Existem dois modelos de partícula lipoviral: um onde o HCV está ligado à lipoproteína de maneira transitória através de suas apolipoproteínas, e outro onde há a formação de uma partícula híbrida, com compartilhamento de membrana fosfolipídica entre o envelope do HCV e a lipoproteína associada (Lindenbach e Rice, 2013). A Figura 4 ilustra os dois tipos de modelo de partícula lipoviral existentes.

Figura 4 – Modelos da estrutura lipoviral do HCV.



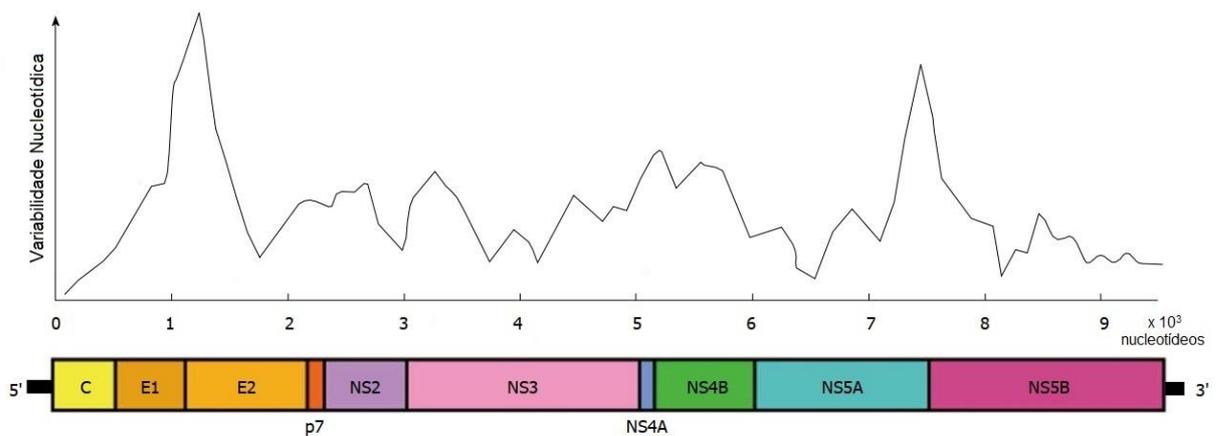
As partículas lipovirais do HCV podem ser descritas através de dois modelos. À esquerda estão ilustradas as partículas lipovirais transitórias, em que o HCV está ligado às lipoproteínas (HDL, LDL e quilomícron, nos exemplos) através de suas apolipoproteínas associadas, como a Apo-E (em verde). À direita está ilustrada a partícula lipoviral híbrida, com o compartilhamento de membrana entre o vírus e a lipoproteína.

Fonte: Modificado de Lindenbach e Rice, 2013.

O genoma do HCV, com aproximadamente 9600 nucleotídeos de comprimento, possui um sítio interno de entrada de ribossomo (IRES) na sua extremidade 5'. No retículo endoplasmático rugoso (RE), o ribossomo do hospedeiro se conecta ao IRES e começa a tradução *cap*-independente do RNA viral (Kim e Chang, 2013). Após a tradução, é gerada uma única poliproteína que é processada por proteases de origem

tanto viral quanto do hospedeiro, para a produção de 10 proteínas virais, sendo três estruturais (C, E1 e E2) e sete não-estruturais (NS1 ou p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). Em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, cerca de 10^{12} partículas virais são geradas diariamente. Durante a sua replicação, há uma taxa considerável de erro da RNA polimerase viral, levando a alta variedade nucleotídica das regiões codificantes das proteínas virais, ilustrado pela Figura 5 (Kim e Chang, 2013; Preciado *et al.*, 2014).

Figura 5 – Variabilidade nucleotídica do HCV.

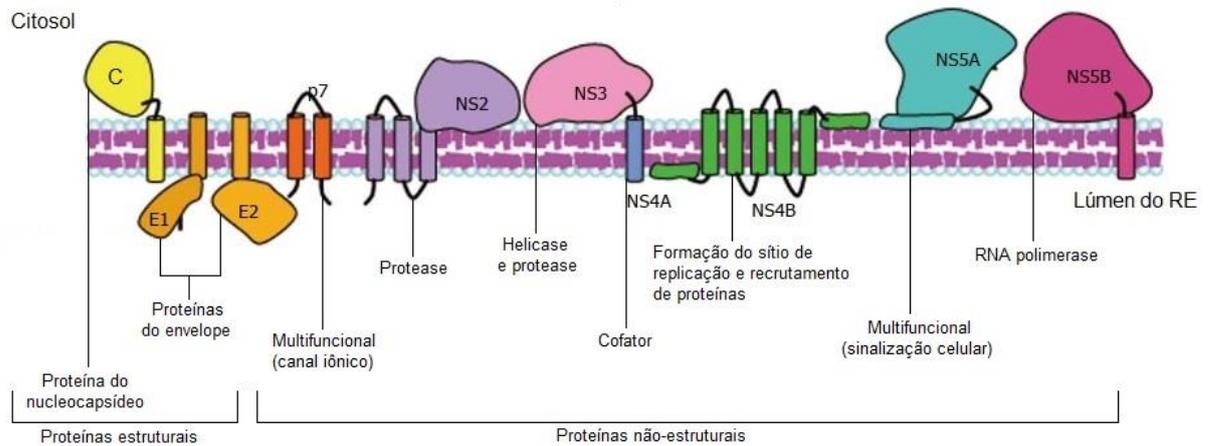


Representação esquemática da localização de cada região codificadora das proteínas virais, com o grau de variabilidade nucleotídica ao longo do genoma viral.

Fonte: Traduzido de Preciado *et al.*, 2014

Durante e após a tradução, as proteínas virais se associam à membrana do RE, a fim de se formar o complexo de replicação viral contendo as proteínas estruturais e não-estruturais, conforme a Figura 6. Cada uma das proteínas possui suas respectivas funções na entrada, multiplicação e liberação do vírus das células do hospedeiro (Dubuisson, Penin e Moradpour, 2002).

Figura 6 – Proteínas virais.



Representação esquemática das proteínas virais do HCV, de acordo com a ordem em que são traduzidas a partir do RNA viral. São 10 proteínas virais diferentes, sendo 3 estruturais (C, E1 e E2) e 7 não-estruturais (NS1 ou p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). Cada uma das proteínas do HCV possui suas funções no ciclo de multiplicação viral, como descrito na imagem.

Fonte: Traduzido e modificado de Preciado *et al.*, 2014

A primeira proteína codificada pelo genoma do HCV é a Core (C), uma proteína estrutural muito conservada entre os genótipos e subtipos virais. Formadora do nucleocapsídeo, ela se liga ao RNA viral através de um de seus domínios (Ashfaq *et al.*, 2011). Além do RE, a proteína C também pode ser encontrada no núcleo, nas mitocôndrias, no citoplasma e na superfície de gotículas de lipídeo das células do hospedeiro, esse último de importância para a morfogênese de novas partículas virais e a associação entre infecção por HCV e o quadro de esteatose hepática desenvolvido pelos indivíduos acometidos. Além disso, a proteína C também afeta o processo de apoptose, o metabolismo lipídico e o desenvolvimento de hepatocarcinoma (Ashfaq *et al.*, 2011; Morozov e Lagaye, 2018).

As proteínas do envelope E1 e E2 possuem importante papel na entrada do vírus na célula do hospedeiro. São altamente glicosiladas, característica importante para a ligação aos receptores do hospedeiro e na variação antigênica (Ashfaq *et al.*, 2011). A proteína E2 possui duas regiões de hipervariabilidade gênica, de importante papel na evasão do HCV à pressão do sistema imune do hospedeiro. Essas regiões são alvos frequentes da ação dos anticorpos neutralizantes gerados durante a infecção, mas escapam através de alterações nos seus epítomos (Morozov e Lagaye, 2018).

As proteínas não-estruturais contribuem para o ciclo biológico do HCV, através de múltiplas funções exercidas em conjunto. A proteína NS1, ou p7, é classificada como não-estrutural, mas possui papel importante na construção e liberação da partícula viral por sua ação como canal iônico. A NS2 é uma protease viral, que realiza a autoclivagem entre ela e a NS3 (Kim e Chang, 2013). A NS3 é uma proteína com atividade multifuncional. Possui uma atividade de protease, auxiliada pela proteína NS4A como cofator, útil na clivagem de todas as outras proteínas virais, e uma atividade de NTPase/helicase, indispensável durante a replicação do RNA viral pela capacidade de inibir intermediários de RNA de dupla fita, estruturas secundárias de RNA e a associação com proteínas ligantes de ácidos nucleicos (Ashfaq *et al.*, 2011). A NS3 também tem papel na modulação da resposta imune do hospedeiro, através do bloqueio de mecanismos de ativação de interferon tipo I (IFN-I) (Kim e Chang, 2013). A proteína NS4B possui como função a alteração da membrana do RE para a formação do sítio de replicação viral e o recrutamento das proteínas virais para esse local. A NS5A, fosforilada pela NS4A, é uma proteína multifuncional capaz de alterar a resposta de IFN do hospedeiro, a sinalização celular, os mecanismos pró e anti-apoptóticos e levar a formação de hepatocarcinoma. Por fim, a NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação do genoma do HCV durante seu ciclo biológico. A polimerase não possui a capacidade de revisão da replicação, sendo responsável por todo o mecanismo de hipervariabilidade entre genótipos, subtipos e quasiespécies do HCV (Ashfaq *et al.*, 2011; Morozov e Lagaye, 2018).

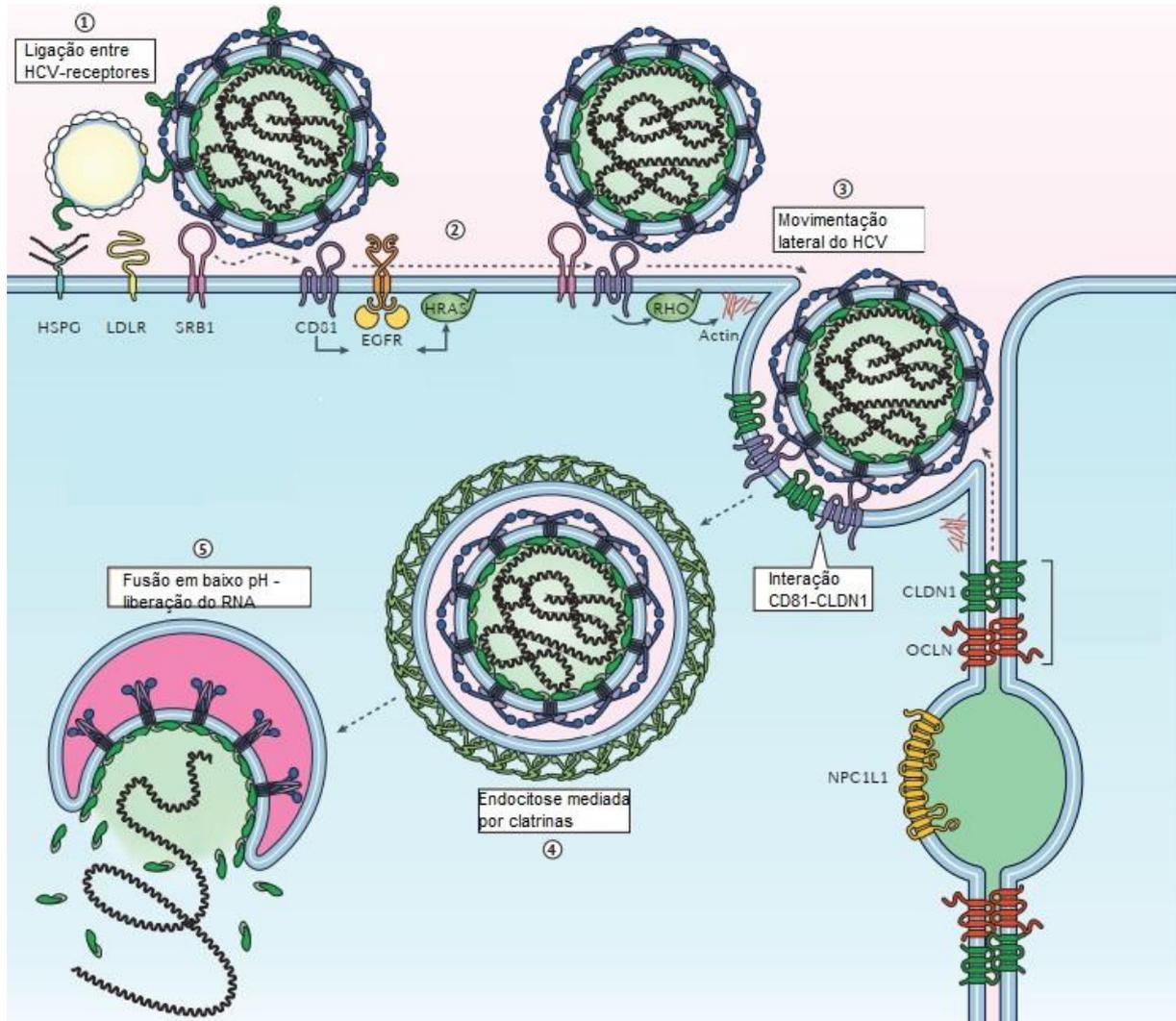
2.2.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico do HCV se inicia com a entrada do vírus nos hepatócitos, que envolve além das proteínas do envelope, as lipoproteínas associadas ao vírus. As lipopartículas virais presentes na corrente sanguínea se encontram com os hepatócitos do hospedeiro no espaço de Disse. No primeiro momento, as lipoproteínas associadas à partícula viral, em especial a Apo-E, se conectam a receptores celulares como glicosaminoglicanos, receptor do tipo Scavenger B1 (SRB1) e o receptor de LDL (Dubuisson e Cosset, 2014). Essa associação expõe as proteínas do envelope viral E1/E2 pela dissociação entre o HCV e as lipoproteínas e

facilita a ligação dele com outros receptores celulares (Wrensch *et al.*, 2018). A proteína E2 é a principal responsável pela ligação nos receptores do hospedeiro. Através da sua região 1 de hipervariabilidade, ela se liga ao SRB1 e em seguida, se conecta de maneira firme ao CD81, que associado à claudina tipo I (CLDN1), acionam diversos eventos celulares para a entrada do vírus na célula, auxiliados pelas ocludinas (OCLN). É sabido que a associação CD81-CLDN1 é o que dita o tropismo do HCV para as células humanas. Como a CLDN1 e a OCLN são proteínas de junções ocludentes presentes nas membranas laterais da célula, acredita-se que há uma movimentação pela membrana lateral das células pelo HCV. Além da infecção direta das células pelo HCV, também pode ocorrer a infecção entre as células hepáticas, mas ainda com mecanismo pouco explicado (Lindenbach e Rice, 2013; Dubuisson e Cosset, 2014).

Depois da interação com os receptores celulares, o HCV é endocitado pelos hepatócitos em um processo induzido e mediado pelas clatrininas. Depois de internalizado, a interação E2-CD81 induz a fusão do endossomo por um mecanismo dependente de baixo pH, liberando o RNA viral no citoplasma da célula hepática (Grassi *et al.*, 2016). A Figura 7 ilustra o mecanismo de entrada do vírus na célula do hospedeiro.

Figura 7 – Entrada do HCV nas células hepáticas.



Representação esquemática da penetração do HCV nas células hepáticas. 1- O processo se inicia com a interação da Apo-E (apolipoproteína associada ao vírus) com receptores celulares, o que expõe as proteínas de envelope E1-E2, que interagem por sua vez com outros receptores, principalmente CD81 e SRB1. 2- A interação entre as proteínas de envelope e os receptores acionam mecanismos celulares que iniciam a penetração do vírus. 3- Os mecanismos iniciados levam a uma movimentação lateral do HCV, e então a CD81, interagindo com a CLDN1, inicia o processo de internalização do vírus. 4- O HCV é endocitado por um processo mediado por clatrina. 5- O baixo pH do compartimento endossomal leva à fusão do HCV e liberação de seu RNA no citosol da célula do hospedeiro.

Fonte: Traduzido e modificado de Lindenbach e Rice, 2013.

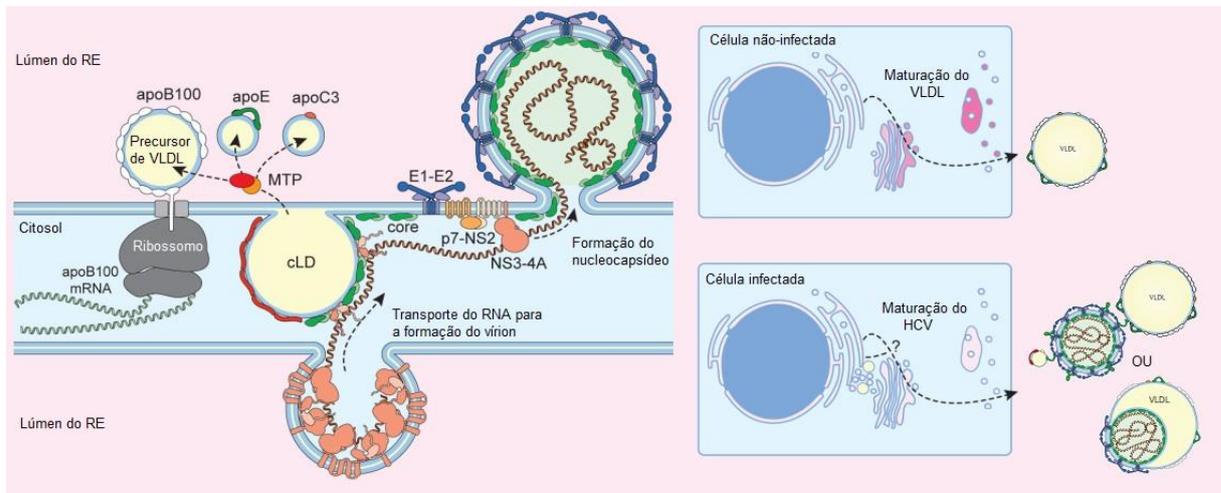
Após a liberação do RNA viral do citoplasma, a tradução é iniciada com a maquinaria da célula do hospedeiro. As dez proteínas virais formadas se associam à membrana do retículo endoplasmático rugoso no sítio de replicação viral, induzido pela proteína NS4B. A RNA polimerase (proteína NS5B), auxiliada por outras proteínas virais não-estruturais e por diversos fatores do hospedeiro, faz a replicação do genoma viral, inicialmente com a formação de uma fita de RNA de polaridade negativa. Essa fita

então é utilizada como molde para a fabricação de novas fitas de RNA com polaridade positiva, que serão utilizadas para a tradução de novas proteínas ou como genoma para a produção de novas partículas virais (Ashfaq *et al.*, 2011; Dubuisson e Cosset, 2014).

A última etapa do ciclo biológico do HCV é a morfogênese de novas partículas virais e a liberação na corrente sanguínea, cujo mecanismo exato ainda não está esclarecido. Apesar disso, sabe-se que as partículas do HCV têm sua origem intimamente ligada à via de formação do VLDL, formando as partículas lipovirais. Entretanto, entre todas as apolipoproteínas presentes, sabe-se que a Apo-E é essencial para a formação e infectividade do HCV (Wrensch *et al.*, 2018). Durante o processo de morfogênese, as proteínas do Core formadas são retidas em gotículas de gordura presentes no citoplasma da célula hepática e essa união recruta fatores celulares e virais necessários para a migração das proteínas E1 e E2 e do genoma viral para o local de formação da nova partícula, coordenada pelas proteínas NS2 e NS1 (Grassi *et al.*, 2016). Após a formação do novo vírion, o mesmo segue para a via de secreção celular pelo Complexo de Golgi, onde adquire sua característica de baixa densidade pela associação ao HDL ou VLDL, o último principalmente, e suas proteínas E1 e E2 são modificadas pela adição de glicanos (Lindenbach e Rice, 2013; Dubuisson e Cosset, 2014).

A Figura 8 ilustra o processo de formação e liberação das partículas lipovirais do HCV e sua associação com a via do VLDL.

Figura 8 – Esquema da formação e liberação de novas partículas de HCV.



Esquema da montagem de novas partículas do HCV. A proteína core é retida em gotículas de gordura presente no citosol das células infectadas. As proteínas E1, E2 e o RNA viral são transportados para o local onde o nucleocapsídeo será formado e a nova partícula viral será gerada. A via de secreção do VLDL é a mesma via utilizada pelo HCV para ser liberado da célula, onde ele se associará à lipoproteína.

Fonte: Traduzido e modificado de Lindenbach e Rice, 2013.

2.2.4 Resposta imune

Frente à entrada e replicação do HCV dentro das células, o organismo do hospedeiro responde através dos sistemas imunes inato e adaptativo. A replicação viral por si só é capaz de iniciar a produção de IFN-I (principalmente IFN- β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e citocina CXCL10 nas células infectadas, mas o HCV é capaz de escapar das respostas de IFN através do bloqueio de suas vias de sinalização. Entretanto, as células adjacentes não infectadas, células dendríticas e as células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) continuam a produção dessas moléculas (Park e Rehmann, 2014). As células *natural killer*, ou NK, são importantes para o controle das infecções virais pela sua capacidade de provocar a lise das células infectadas através da liberação de grânulos citoplasmáticos contendo granzimas e perforinas, além de produzir IFN- γ e TNF- α (Ashfaq *et al.*, 2011).

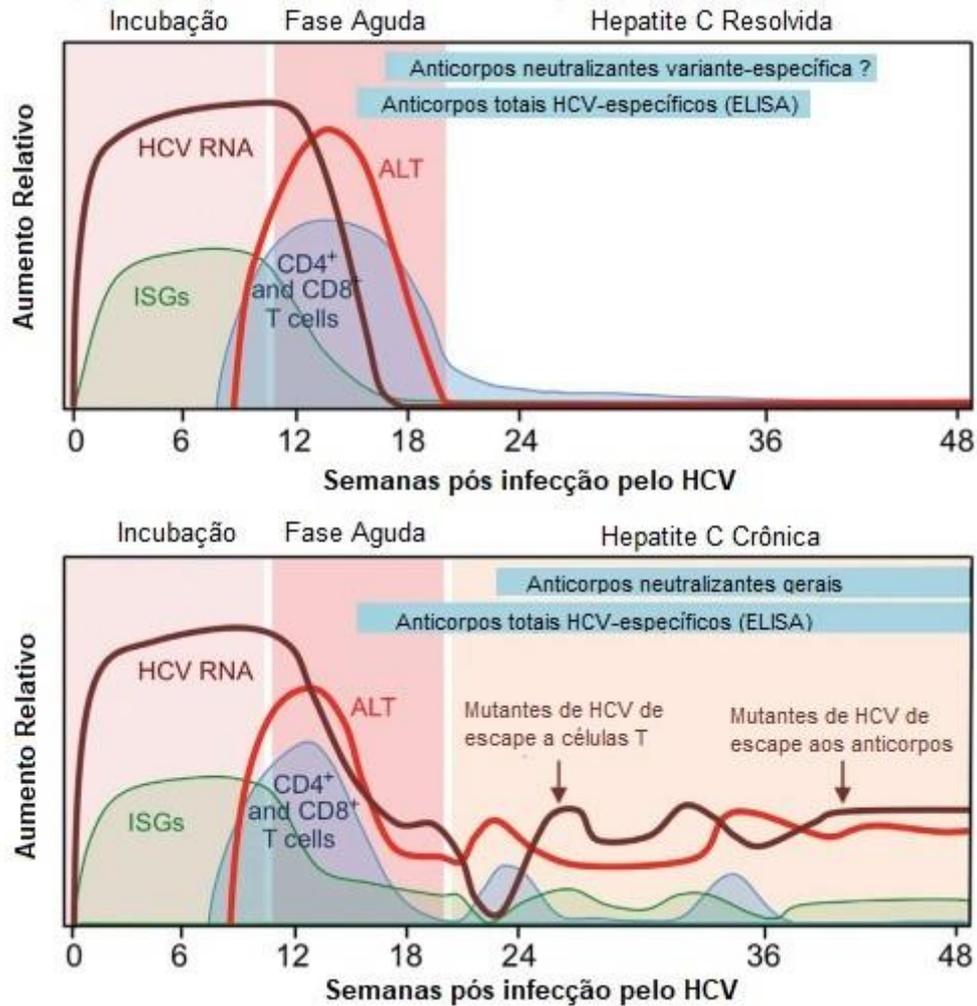
A infecção pelo HCV possui como característica um aparecimento tardio das respostas adaptativas, mesmo em casos de infecção limitadas que não progredem para a cronicidade. As respostas celulares por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não são detectáveis até 5-9 semanas. Uma resposta intensa de linfócitos TCD4⁺ durante a

fase inicial de infecção, com produção de interleucina IL-2 e IFN- γ está presente em pacientes que se recuperam e evoluem para o *clearance* viral; por outro lado, a ausência, perda ou resposta fraca de TCD4⁺ estão associados ao desenvolvimento de doença crônica. Os anticorpos contra o HCV são detectáveis nos indivíduos infectados entre oito e vinte semanas. Enquanto a resposta celular por linfócitos T é crítica para o *clearance* viral, a presença de anticorpos neutralizantes nos pacientes com doença crônica reforça a pressão para a variação antigênica do HCV, gerando variantes quasiespécies (Rehermann, 2009; Park e Rehermann, 2014).

O HCV possui a capacidade de evadir o sistema imune através de diversos mecanismos. O bloqueio da via de sinalização de IFN-1, a inibição da função da célula NK e a geração de mutantes nos epítomos dos anticorpos e células T são alguns mecanismos utilizadas pelo HCV para driblar a resposta imune do hospedeiro. Além disso, sabe-se que as apolipoproteínas associada a ele, em especial a Apo-E, influenciam diretamente no processo de evasão. Elas são capazes de impedir a ligação dos anticorpos neutralizantes às proteínas do envelope, atuando como uma barreira protetora e aumentando significativamente a infectividade das partículas virais por facilitar a entrada do vírus nas células. Ainda, a resposta imune celular e humoral desenvolvida contra HCV, mesmo após o tratamento, não é protetiva e é responsiva apenas ao genótipo infectante, não protegendo contra infecções pelos demais genótipos (Ashfaq *et al.*, 2011; Wrensch *et al.*, 2018; Stuart, Salinas e Grakoui, 2021).

A Figura 9 representa a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro frente a infecções pelo HCV, tanto em casos agudos que são resolvidos quanto no desenvolvimento dos casos crônicos.

Figura 9 – Resposta imune frente a infecção do HCV em casos resolvidos e casos crônicos.



A figura de cima representa a resposta imune em casos de hepatite C aguda seguida de recuperação clínica. A fase de incubação com alto título de viremia e expressão de interferon (ilustrado como ISGs) ocorre durante as primeiras 8 semanas de infecção. Após esse período, há a alta dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e o início de respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas, que permanece mesmo algumas semanas após o clearance viral, seguido de retorno a níveis normais de ALT. Os anticorpos específicos do HCV são detectáveis por imunoenensaio enzimático (ELISA) por volta de 18 semanas depois. A figura de baixo representa a hepatite C aguda seguida de infecção crônica. Nesse caso, a resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ decai antes mesmo da resolução da viremia, levando a manutenção do vírus no hospedeiro. Além disso, há a seleção de mutantes do HCV às células T nas fases aguda e crônica inicial e aos anticorpos neutralizantes na fase crônica.

Fonte: Traduzido e modificado de Park e Rehermann 2014.

2.3 História natural da hepatite C

A transmissão do HCV é dada principalmente pela via parenteral. Indivíduos transplantados ou que receberam transfusão de sangue antes do advento da

testagem para HCV e usuários de drogas injetáveis são a população com a maior prevalência de casos de hepatite C. A infecção através da relação sexual é controversa e menos comum, com risco aumentado nos casos de múltiplos parceiros. A infecção vertical de mãe para filho também é rara, mas seu risco aumenta significativamente no caso de mães coinfetadas com HIV. Outras rotas de contágio são a exposição ocupacional, utilização de droga intranasal, procedimentos cosméticos com utilização de agulhas como tatuagem e piercing e compartilhamento de itens pessoais como barbeadores e alicates (Alter, 2011; Morozov e Lagaye, 2018). Ainda, os indivíduos que são submetidos à hemodiálise possuem um risco aumentado para contrair o vírus HCV em comparação com o restante da população, devido à exposição frequente ao sangue e à contaminação nosocomial (Constâncio *et al.*, 2019; Niquini *et al.* 2022).

Embora mais comumente seja assintomática, cerca de 10 a 20% dos indivíduos infectados desenvolvem hepatite aguda. Os sintomas mais comuns nesses casos são astenia, febre e dores musculares, com casos menos comuns de icterícia. De 75 a 85% dos casos progridem para hepatite crônica, com fatores de risco associados como idade, sexo masculino, consumo de álcool, sobrepeso e coinfecção com HIV, HBV ou *Schistosoma mansoni* (Manns *et al.*, 2017; Morozov e Lagaye, 2018).

A principal complicação da hepatite crônica é a fibrose hepática. O HCV causa danos às células hepáticas infectadas, levando à inflamação crônica do órgão, resultado do estresse oxidativo. Essa inflamação aumenta o depósito de proteínas de matriz extracelular e a fibrogênese. Com isso, 20 a 30% dos portadores crônicos progridem para a cirrose e falência hepática, apresentando sintomas como fadiga, perda de peso, dores musculares e nas articulações, desconforto e dor abdominal. Dos indivíduos com cirrose, 1 a 5% possuem risco de desenvolver hepatocarcinoma, sendo mais raro o desenvolvimento de câncer nos pacientes com HCV sem desenvolvimento de cirrose. Outro dano hepático associado é a esteatose, devido às alterações no metabolismo lipídico pelo HCV com o acúmulo de gotículas de lipídeo no citoplasma das células. (Manns *et al.*, 2017; Morozov e Lagaye, 2018).

A infecção pelo HCV também pode levar a danos sistêmicos extra-hepáticos. Cerca de 50% dos indivíduos infectados desenvolvem casos de crioglobulinemia, geralmente do tipo II, com deposição dos complexos nos vasos de pequeno e médio calibre. Essa condição leva a quadros de púrpura, vasculite, poliartrite, glomerulonefrite, neuropatias periféricas e um risco aumentando para o desenvolvimento de linfomas não-Hodgkin. Além disso, a inflamação crônica ocasionada pelo HCV por si só pode desencadear quadros de distúrbios neuro-cognitivos, acidente vascular encefálico, doenças cardiovasculares, cânceres extra-hepáticos, resistência à insulina com risco de diabetes e doença renal crônica (Pol e Lagaye, 2019).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico dos indivíduos infectados com o vírus da hepatite C é realizado por meio de testes sorológicos, através da detecção de anticorpos específicos anti-HCV, detecção de antígeno C, ou através dos testes moleculares, com a detecção e quantificação do material genético do vírus (Ansaldi *et al.*, 2014).

Os ensaios sorológicos para o diagnóstico de HCV são divididos atualmente em 4 gerações distintas. A primeira geração de ensaios, criada em 1989, utilizava apenas um epítipo do antígeno NS4 do HCV. Apesar da sua importância para a testagem das bolsas de sangue naquele período, essa geração de ensaio tinham uma janela imunológica muito longa, de 12 a 26 semanas, além de um índice de 60% de falsos-positivos. Em 1992, a segunda geração de ensaios foi desenvolvida, contendo as proteínas C, NS3 e NS4 e diminuindo a janela para 10 a 24 semanas. A partir de 1996 os ensaios de terceira geração foram lançados, contendo a proteína NS5 além das já existentes na 2ª geração. Apesar da evolução, os testes de 3ª geração ainda possuem uma janela de detecção relativamente longa, de cerca de 7 a 8 semanas. Assim, para diminuir o tempo pós-infecção para identificar os indivíduos infectados, os ensaios de quarta geração foram desenvolvidos. Esses ensaios, além de identificarem sorologia positiva para HCV, são capazes de detectar o antígeno Core do vírus, diminuindo a janela para cerca de 26 a 49 dias. As metodologias mais comumente empregadas nos ensaios sorológicos e de detecção de antígeno viral são o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a quimioluminescência (CLIA), o *imunoblot* e a

imunocromatografia, comumente chamada de teste rápido (Marwaha e Sachdev, 2014; Warkad *et al.*, 2019).

Os ensaios imunoenzimáticos são aqueles que utilizam marcadores ligados a enzimas, chamados de conjugados, para a identificação do analito. Nesses testes, antígenos específicos do vírus são imobilizados em uma fase sólida, geralmente uma placa de poliestireno, onde os anticorpos anti-HCV se ligarão após uma incubação. O conjugado é então adicionado, se ligando ao imunocomplexo antígeno-anticorpo formado. Esse conjugado pode ser formado por um anticorpo secundário, quando ensaios indiretos, ou pelos mesmos antígenos presentes na fase sólida, quando ensaios do tipo “sanduíche”, ligados a enzimas como a peroxidase (HRP) e a fosfatase alcalina. Após a reação da enzima com o seu substrato, há a formação de produto colorido, no caso do ELISA, ou fluorescente, no caso do ELFA, indicando a presença de anticorpos anti-HCV na amostra. Esses ensaios também podem ser utilizados na pesquisa de antígenos do HCV, com a utilização de anticorpos específicos imobilizados e na forma de conjugado (Brasil, 2018a).

De modo semelhante, a quimioluminescência é capaz de identificar a infecção pelo HCV pela imobilização de antígenos específicos em *beads* magnéticas, onde os anticorpos se ligam e são identificados por um conjugado de isoluminol. Essa molécula é utilizada como substrato da enzima peroxidase, formando um produto que emite fótons, que são quantificados e indicam a presença dos anticorpos anti-HCV (Warkad *et al.*, 2019). Já no caso da eletroquimioluminescência, a emissão de fótons é induzida por uma corrente elétrica ao invés de uma reação química, feita pelo conjugado a elementos como o rutênio, ósmio e rênio. Esses dois ensaios, assim como o ELISA e o ELFA, também podem ser utilizados para a pesquisa de antígenos (Mathew, Biju e Thapalia, 2005).

Todos os ensaios citados (ELISA, ELFA, CLIA e ECLIA) possuem como vantagem a alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos métodos. Além disso, podem ser completamente automatizados e podem ser utilizados para a testagem de dezenas de amostras em um único ensaio. Entretanto, todos necessitam

de mão de obra especializada e infraestrutura laboratorial para serem realizados (Brasil, 2018a; Chevaliez, 2019).

Um outro tipo de ensaio considerado como teste suplementar para o diagnóstico de HCV é o *imunoblot*. Ao contrário dos outros testes, o *imunoblot* detecta a positividade dos anticorpos contra os antígenos de HCV de forma individual. Assim, antígenos C, NS3, NS4 e NS5 são isoladamente impregnados em uma membrana. Amostras negativas não apresentam reatividade em nenhuma das proteínas, enquanto amostras positivas são reativas a duas ou mais proteínas. Quando há reatividade em apenas uma proteína, a amostra é considerada indeterminada. O ensaio de *imunoblot* é essencialmente útil para a confirmação de casos falso-positivos nas outras metodologias, por serem altamente específicos, apesar de serem menos sensíveis que os outros testes de triagem de anti-HCV (Pondé, 2013).

Os testes rápidos são ensaios imunocromatográficos, também chamados de testes de fluxo lateral (LFA, do inglês *lateral flow assay*). O teste se baseia na captura dos anticorpos anti-HCV por antígenos específicos de HCV imobilizados em uma membrana, de forma rápida e simples. O tipo de membrana mais comumente utilizada para os ensaios de LFA é o de nitrocelulose, que se liga aos reagentes de captura (antígenos ou anticorpos) por meio de uma ligação eletrostática (Merck Millipore, 2013). As vantagens das membranas de nitrocelulose são o baixo custo, a capacidade de se ligar fortemente a proteínas e possibilidade de ajustes no tempo do fluxo capilar pelo tamanho dos poros presentes na nitrocelulose (Parolo, *et al.* 2016). Poros maiores correlacionam a tempo de fluxo mais rápidos, enquanto poros menores levam a tempos mais lentos. Quanto mais lento o fluxo imunocromatográfico é, maior é o tempo de incubação entre os reagentes de captura e detecção e, conseqüentemente, mais sensível o teste se torna. Entretanto, amostras biológicas que possuem alta viscosidade associada podem exigir a utilização de membranas com poros maiores e com menor tempo de fluxo (Stratech, 2016). Outro componente de extrema importância para o LFA é o conjugado, que pode ser feito de nanopartículas de ouro coloidal, *beads* de látex, materiais fluorescentes e luminescentes, nanopartículas de carbono, entre outras. O material mais comumente utilizado são as nanopartículas de ouro coloidal, por possuir como característica serem inertes, possuírem alta afinidade

por biomoléculas e serem facilmente funcionalizadas (Sajid, Kawde e Daud, 2015). A conjugação do reagente de detecção ao ouro coloidal, seja antígeno ou anticorpo, é uma etapa limitante para o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico. As condições ideais de pH, concentração e bloqueio de ligações inespecíficas são fundamentais para que se garanta a total ligação desses reagentes ao ouro e, conseqüentemente, assegurar a sensibilidade do teste. Esse conjugado é seco em uma membrana chamada de *conjugate pad*, a qual possui as funções de preservar o conjugado de ouro coloidal de forma estável e liberá-lo de forma uniforme durante o teste, além de ser o primeiro local de interação entre o conjugado e o analito a ser detectado na amostra (Parolo, *et al.* 2016; Sukumaran *et al.*, 2021). Outros componentes presentes no LFA são a *sample pad* e a *absorbent pad*. A *sample pad*, feita de fibra de vidro ou celulose, é onde ocorre o primeiro contato da amostra com o teste e onde se inicia o fluxo imunocromatográfico. Por isso, podem ser tratadas a fim de adequar o pH e a viscosidade da amostra, realizar a retenção das hemácias quando utilizado o sangue, além de remover potenciais interferentes e geradores de reações inespecíficas. Já a *absorbent pad* possui o papel de concluir o fluxo imunocromatográfico pela tira, absorvendo todo o conteúdo líquido excedente da corrida (Sajid, Kawde e Daud, 2015, Stratech, 2016). Em geral, as tiras imunocromatográficas são cortadas em larguras de 3 a 4 mm e colocadas em cassetes plásticos, com a indicação do local de adição de amostra e posicionamento das linhas teste e controle. Além disso, os cassetes são essenciais para garantir o controle do tempo e da direção do fluxo imunocromatográfico, através de pontos de pressão que o cassete exerce sobre a tira imunocromatográfica (Merck Millipore, 2013; Stratech, 2016).

O formato mais utilizado para a detecção de anticorpos anti-HCV por imunocromatografia é o sanduíche, onde os mesmos antígenos de HCV se encontram tanto imobilizados na membrana de nitrocelulose na linha teste, quanto no formato de conjugados ao ouro coloidal. Na linha controle, geralmente são adicionados anticorpos específicos contra o conjugado, a fim de funcionar como um controle da corrida imunocromatográfica. Ao adicionar a amostra na *sample pad*, ela migra por capilaridade por toda a tira teste, carregando consigo o conjugado de antígenos de HCV com ouro coloidal, até alcançar as linhas teste e controle na nitrocelulose. Os

anticorpos anti-HCV presentes na amostra se ligam tanto aos antígenos conjugados quanto aos antígenos imobilizados, levando a formação de uma linha rósea a roxa devido à precipitação dos complexos com ouro coloidal na zona teste. O excesso de conjugado continua a migrar pela tira até chegar na linha controle, onde é capturada e há a formação de uma segunda linha que valida o ensaio (Sajid, Kawde e Daud, 2015; Warkad *et al.*, 2019).

As principais vantagens da utilização dos testes rápidos são a facilidade de uso, a rapidez e a possibilidade de realização do teste ambiente fora do laboratorial. Nesse aspecto, foi publicada pelo Ministério da Saúde (MS), no dia 5 de maio de 2023, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 786, que regulamenta farmácias e consultórios isolados como locais onde exames de análises clínicas, com a finalidade de triagem, conforme descrito:

“Art. 8º Somente são classificados como Serviço Tipo I:

I - farmácias; e

II - consultórios isolados.

Parágrafo único. O consultório isolado não é autorizado a comercializar os produtos para diagnóstico *in vitro*, assim como a realizar EAC para outros Serviços.

Art. 9º O Serviço Tipo I deve cumprir os seguintes requisitos para realização de EAC:

I - utilizar produto para diagnóstico *in vitro* que requeira leitura exclusivamente visual;

II - utilizar produto para diagnóstico *in vitro* que requeira exclusivamente material biológico primário;

III - utilizar produto para diagnóstico *in vitro* que não necessite de instrumento para leitura, interpretação ou visualização do resultado; e

IV - realizar todas as etapas de todas as fases dos processos operacionais relacionados ao EAC no próprio serviço (*in loco*).”

Dessa forma, o teste rápido é a principal metodologia que pode ser empregada nos locais de serviço tipo I para a triagem de doenças (Ministério da Saúde, 2023). Entretanto, a sensibilidade diminuída em comparação aos outros imunoenaios e a interpretação visual subjetiva do operador são alguns dificultadores de sua utilização (Chevaliez, 2019).

O Quadro 1 enumera algumas vantagens e desvantagem entre os imunoenaios laboratoriais, como o ELISA e o CLIA, e os testes rápidos na triagem e diagnóstico da hepatite C.

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens entre os ensaios imunológicos laboratoriais convencionais e testes rápidos.

Vantagens	Desvantagens
Testes laboratoriais convencionais (ELISA, ELFA, CLIA, ECLIA e <i>imunoblot</i>)	
Alta sensibilidade	Punção venosa é majoritariamente necessária
Alta especificidade	Armazenamento refrigerado
Automação disponível	Tempo de ensaio longo
Bom custo-benefício para testagem de muitas amostras	Ambiente laboratorial necessário
Testes rápidos (imunocromatografia)	
Rápido e fácil de usar	Menor sensibilidade e limite de detecção comparada aos testes laboratoriais
Possibilidade de punção digital (sangue capilar)	Leitura pode ser subjetiva em amostras fracamente positivas
Não necessita de equipamento na maioria das vezes	Estabilidade do dispositivo afetada pelo calor e umidade
Maior estabilidade de armazenamento a temperatura ambiente	Pode se tornar oneroso na triagem de um grande número de indivíduos/pacientes

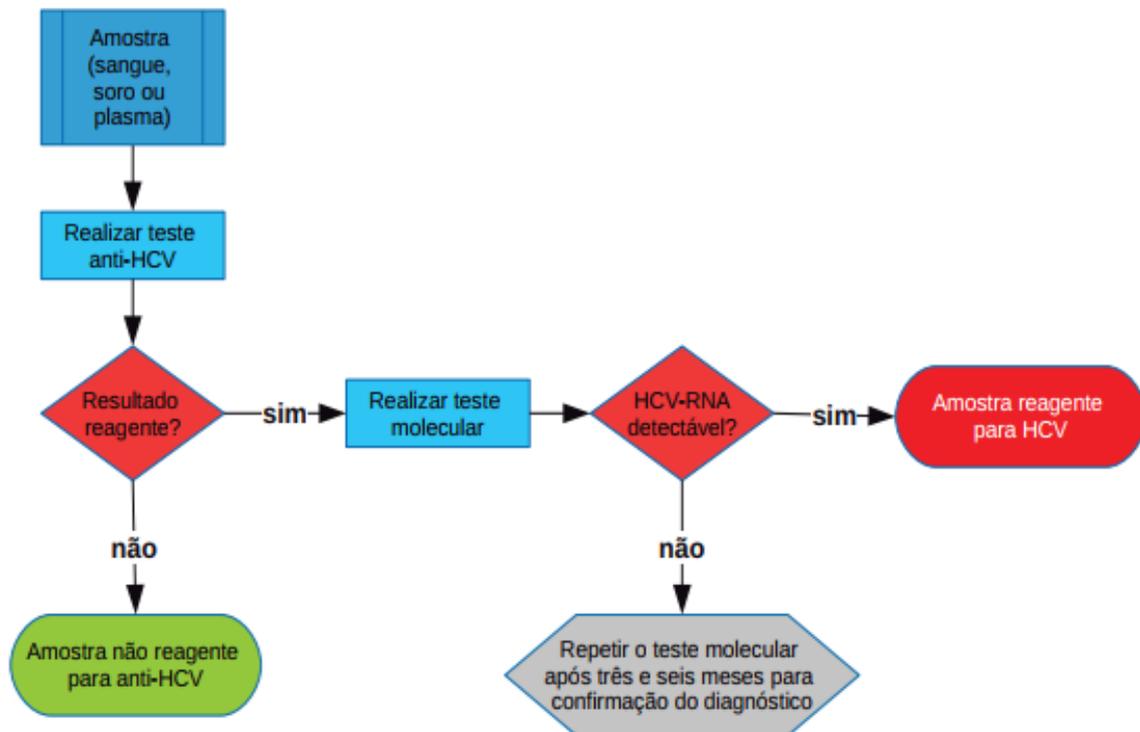
Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes moleculares são caracterizados pela detecção quali ou quantitativa do RNA do vírus, considerados o padrão-ouro no diagnóstico do HCV, através das técnicas de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e amplificação mediada por transcrição (TMA). Após a infecção, é possível a detecção do RNA viral em 1 a 3 semanas. Além disso, através dos testes moleculares também é realizada a determinação do genótipo do HCV. O padrão ouro para isso é o sequenciamento das regiões NS5B e E1 do genoma viral, seguido de alinhamento e análise filogenética. Entretanto, também pode ser realizado através da PCR genótipo-específica, sequenciamento semiautomático e hibridização reversa automática da região não-codificante 5', cujos ensaios são disponíveis comercialmente (Chevaliez e Pawlotsky, 2006; Ansaldi *et al.*, 2014).

A OMS possui um guia para a testagem das hepatites B e C. Para a triagem de HCV, a OMS recomenda que seja feita em populações de risco (indivíduos com sintomas e

sinais de hepatite crônica, usuários de drogas injetáveis, indivíduos encarcerados, indivíduos que possuam múltiplos parceiros sexuais, infectados pelo HIV, filhos de mães com HCV) ou na população em geral quando há uma prevalência maior que 2-5% (WHO, 2017b). No âmbito nacional, o MS possui diretrizes para o diagnóstico da hepatite C crônica, com a triagem realizada através da detecção de anticorpos específicos contra o HCV e a confirmação realizada com teste molecular para a detecção do RNA viral (Figura 10). Nos casos de hepatite C aguda, o diagnóstico é feito diretamente com o exame molecular, devido a janela imunológica longa da doença, de aproximadamente 8 semanas. (Brasil, 2018a; Brasil, 2019).

Figura 10 – Fluxograma para o diagnóstico da hepatite C crônica.



Fluxograma recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da hepatite C crônica. Como primeiro passo, há a testagem para a presença de anticorpos anti-HCV em amostras de sangue, soro ou plasma. Se negativo, a amostra é considerada não reagente para anti-HCV. Se positivo, é feita a confirmação com o teste molecular. Se o RNA do HCV não é detectável, o teste molecular é repetido após três e seis meses do diagnóstico, a fim de se confirmar uma exposição passada e resolvida ao vírus. Se o RNA viral é detectável, a amostra é considerada reagente para HCV e o indivíduo é encaminhado ao tratamento.

Fonte: Brasil, 2018a.

Para o acompanhamento e tratamento dos indivíduos diagnosticados com a hepatite C crônica, outros testes laboratoriais e exames complementares são realizados. A

biópsia do fígado e a elastografia hepática são utilizadas para a detecção de fibrose, esteatose e cirrose. Através dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e da contagem de plaquetas, pode-se calcular os índices FIB4 e APRI de probabilidade dessas complicações, mas ambos com baixa sensibilidade. Outros exames como hemograma, coagulograma, dosagem de bilirrubinas, albumina séria, glicemia de jejum, marcadores de função renal e hepática e exames de imagens são úteis para se verificar o comprometimento hepático e extra-hepático dos acometidos (Brasil, 2019).

2.4.1 Utilização de amostras de sangue impregnado em papel de filtro

As amostras de sangue impregnado em papel de filtro, ou DBS (*Dried Blood Spots*) são uma alternativa para a testagem convencional em soro ou plasma. Essas amostras podem ser utilizadas tanto nos imunoenaios sorológicos quanto nos testes moleculares para detecção de HCV (Chevaliez, 2019). No Brasil, esse tipo de amostra já é amplamente utilizado para o diagnóstico de doenças metabólicas congênitas através da triagem neonatal, ou teste do pezinho (Brasil, 2010).

As amostras de DBS possuem como vantagem a facilidade de coleta, podendo ser realizada através de punção digital, e a viabilidade de transporte, podendo ser armazenadas à temperatura ambiente por até 14 dias. Entretanto, a maioria dos fabricantes não possuem a validação de seu protocolo para esse tipo de amostra, o que leva a adaptações *in house* dos laboratórios com eventuais ajustes nos valores de corte e à incerteza na performance do ensaio, além da sensibilidade reduzida em comparação com os ensaios convencionais devido a variáveis como a qualidade do papel utilizado e extração efetiva da amostra (WHO, 2017b; Chevaliez, 2019).

Vázquez-Morón e colaboradores (2019) realizaram uma revisão sistemática e metanálise sobre estudos que utilizavam DBS como amostra para triagem da hepatite C. Nesse estudo, a sensibilidade e especificidade agrupadas dos testes com DBS foi >96% e >99%, respectivamente. Entretanto, enfatiza-se nesse estudo a necessidade pela validação do tratamento pré-analítico e do protocolo de ensaio pelos fabricantes de kits para diagnósticos, a fim de se trazer confiabilidade nos métodos em que se utilizam as amostras de DBS como material biológico. Já de acordo com a OMS, a

sensibilidade e a especificidade desses testes são de cerca de 98% e 99%, respectivamente (WHO 2017). Ainda, Flores *et al.* (2021) avaliaram a eficácia das amostras de DBS para o diagnóstico de HCV por ECLIA em populações especiais (portadores de HIV, coagulopatias e doença renal crônica) e encontram uma sensibilidade entre 83,3-100% e uma especificidade entre 96,3-100%.

2.5 Tratamento e prevenção

O tratamento para a hepatite C geralmente envolve antivirais de ação direta (DAA), interferon- α peguilado (um modulador de resposta imunológica) e ribavirina (um análogo de guanossina). A escolha do esquema de tratamento vai depender da idade do paciente, genótipo infectante, tratamento prévio ou não para HCV, gestação, presença de fibrose ou cirrose hepática, doenças pré-existentes (como doença renal crônica) e coinfeção com HIV e/ou HBV. O objetivo do tratamento é a manutenção de níveis indetectáveis de RNA viral após 12 ou 24 semanas de tratamento. Mesmo após a eliminação do HCV, de forma espontânea ou através de tratamento, o paciente ainda pode ser reinfestado, visto que a infecção não gera resposta imune protetiva. Por esse motivo, é importante o trabalho de conscientização na prevenção da infecção de hepatite C, a fim de se evitar casos de primo-infecção e reinfecção (Brasil, 2019; Rabaan *et al.*, 2020).

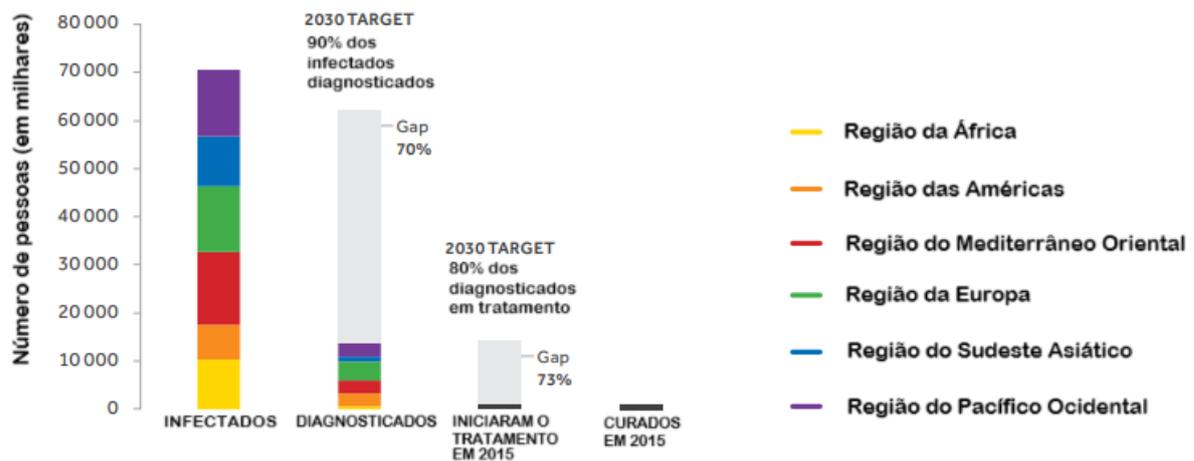
A prevenção à hepatite C ainda está relacionada a medidas de educação quanto as formas de transmissão da doença, a conscientização para a testagem e ao tratamento dos indivíduos acometidos, visto que ainda não há uma vacina testada e validada para prevenir a infecção. A dificuldade no desenvolvimento de vacinas efetivas contra o HCV está relacionada às características da infecção pelo vírus, como a alta variabilidade genética, o desenvolvimento de resposta imune genótipo-específica com reatividade cruzada limitada entre os genótipos, habilidade de evadir ao sistema imune com a mutação dos epítopos dos linfócitos e anticorpos neutralizantes e proteção das próprias lipoproteínas do hospedeiro associadas ao vírus. Além disso, há uma dificuldade de se avaliar a eficácia dessas vacinas por meio de modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, algumas estratégias de desenvolvimento de vacinas já estão em estudo, como as vacinas de proteínas/peptídeos recombinantes,

de partículas vírus-like, de DNA e de vetor viral (como adenovírus e poxvírus). Por fim, o financiamento e comprometimento por parte dos setores público e privado são extremamente necessários para estimular o desenvolvimento dessas novas tecnologias, a fim de se alcançar o objetivo de erradicação da hepatite C (Liang, 2013; Duncan *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

Em 2016, a OMS publicou um documento onde descrevia que as hepatites virais foram a principal causa de morte em todo mundo em 2013, devido a sequelas das infecções pelo HBV e pelo HCV. Diante disso, a organização colocou como uma meta a eliminação das hepatites virais causadas por esses dois patógenos até 2030. No caso da hepatite C, o alvo até 2030 é diagnosticar pelo menos 90% dos indivíduos infectados e tratar pelo menos 80% deles (WHO, 2016; 2017a). Até 2015, ainda existia uma lacuna de cerca de 70% em ambas as metas, conforme descrito na Figura 11.

Figura 11 – Cascata do cuidado da Hepatite C.



Nessa imagem, há a descrição da cascata do cuidado (diagnóstico, tratamento e cura) da Hepatite C. Na primeira coluna, percebe-se que a hepatite C está relativamente distribuída uniformemente em todas as regiões mencionadas. Na segunda coluna, pode-se observar que apenas uma pequena parcela é devidamente diagnosticada, principalmente nas regiões do Pacífico Oriental, Europa, Mediterrâneo Oriental e nas Américas, além da ênfase na lacuna de 70% para o alvo de diagnóstico de pelo menos 90% dos indivíduos. Na terceira coluna, há a ênfase também na lacuna de 73% para o alvo de tratamento em 80% dos diagnosticados. Na quarta e última coluna, há o percentual de curados da hepatite C.

Fonte: Traduzido de WHO, 2017a.

Neste contexto, existe um “Plano para Eliminação da Hepatite C no Brasil”, publicado em 2018, que possui como meta a redução de 90% de novas infecções e de 65% da mortalidade associada até 2030, englobando medidas de diagnóstico, tratamento e prevenção (Brasil, 2018b).

Devido a quantidade de pessoas acometidas pelo vírus que desconhecem a sua condição e a importância clínica da cronificação da infecção, para que a erradicação

da hepatite C se torne uma realidade no Brasil e no mundo, a principal ferramenta que deve ser fortalecida é a do diagnóstico. Entretanto, as metodologias convencionais possuem alguns obstáculos a serem contornados, como a necessidade de punção venosa, infraestrutura laboratorial especializada para a realização dos testes e a perda dos indivíduos durante o atendimento. Assim, para o aumento na identificação de infectados com o HCV, estratégias facilitadoras podem ser criadas e colocadas em prática, a fim de se oferecer tratamento precoce aos que contraíram o vírus (Grebely *et al.*, 2017; Brasil, 2018b; Terrault, 2019).

Uma metodologia aplicável para a ampliação da testagem para hepatite C e citada pela Organização Mundial da Saúde são as amostras de DBS, as quais são uma alternativa para a testagem convencional em soro e plasma que podem ser utilizadas nas metodologias laboratoriais tradicionais, após sua validação. Uma outra estratégia são as metodologias *point-of-care*, que incluem os testes rápidos para detecção de anticorpos anti-HCV. As principais vantagens da utilização dos testes rápidos são a facilidade de uso, a rapidez (resultados em menos de uma hora) e a possibilidade de realização do teste em ambiente fora do laboratorial (Bajis *et al.*, 2018; Chevaliez, 2019).

Com base no exposto, este trabalho visa padronizar e validar testes para detecção de anticorpos totais contra o vírus da hepatite C em amostras humanas de soro, plasma e sangue impregnado em papel de filtro (DBS), com sensibilidade e especificidade comparável às metodologias convencionais. O emprego de testes rápidos e a utilização das amostras de sangue em papel filtro visam viabilizar a triagem em larga escala de indivíduos de risco e em situações de baixa infraestrutura laboratorial.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Desenvolver testes diagnósticos sorológicos para a detecção de anticorpos totais contra o vírus da hepatite C em amostras humanas de soro, plasma e sangue impregnado em papel filtro.

4.2 Objetivos específicos

Padronização das condições ideais dos reagentes necessários para o funcionamento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) com amostras de soro, plasma e sangue impregnado em papel filtro;

Padronização das condições ideais dos reagentes necessários para o funcionamento de um teste imunocromatográfico (Teste Rápido) com amostras de soro e plasma;

Avaliar os parâmetros de sensibilidade e especificidade clínicas dos métodos desenvolvidos, tanto para as amostras de soro ou plasma (ELISA e Teste Rápido) quanto para as amostras de sangue impregnado em papel filtro (ELISA);

Avaliar a existência de reatividade cruzada com outras infecções nos métodos desenvolvidos;

Avaliar os parâmetros de desempenho, como repetibilidade, reprodutibilidade e interensaio, quando aplicável ao método.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de realização dos testes

Os experimentos deste trabalho foram realizados na empresa Quibasa Química Básica LTDA (Quibasa-Bioclin). Todos os materiais e reagentes utilizados foram adquiridos pela empresa, bem como toda a calibração e qualificação dos equipamentos necessários.

5.2 Amostras utilizadas

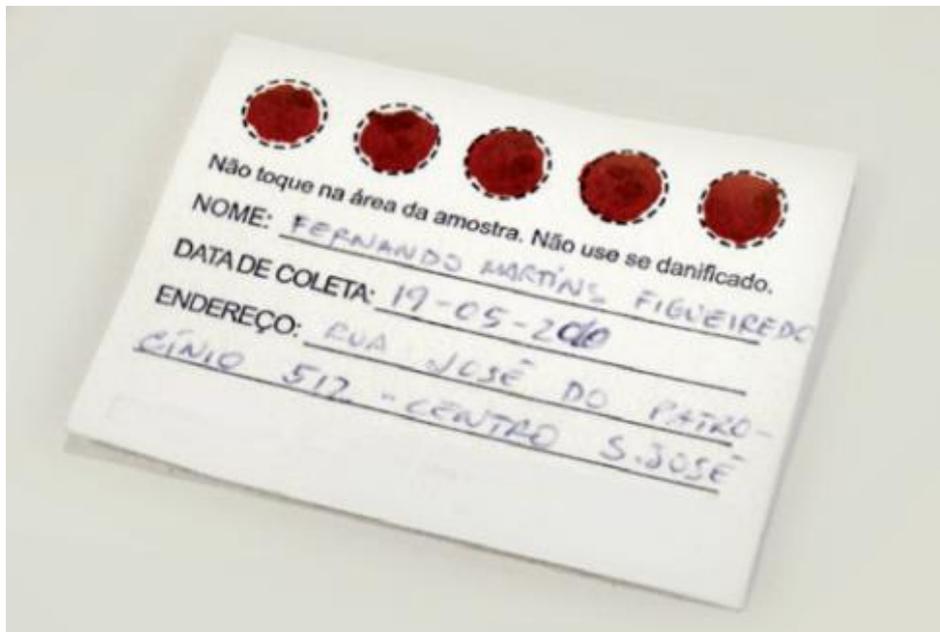
O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número CAAE 73285523.0.0000.5149. Todas as amostras utilizadas para a padronização e validação do ensaio tinham como origem o banco de amostras da empresa Quibasa-Bioclin. Essas amostras são provenientes de laboratórios de todo o Brasil, parceiros da empresa, fornecidas pelo indivíduo a caráter de serviço e concedidas pelo laboratório de forma completamente anônima. Ou seja, ao receber a amostra, a empresa não detém de informação do paciente (como nome, idade, sexo, dados e prontuário etc.), apenas a reatividade (positiva ou negativa) para determinado patógeno (HCV ou outras infecções).

Ao receber as amostras, a empresa faz o processamento das mesmas a fim de serem armazenadas. A impregnação em papel de filtro é realizada conforme o manual “Coleta de Sangue – Diagnóstico e Monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais” (Brasil, 2010), através da dispensação de 60 μ L de sangue coletado em EDTA no papel filtro. Para cada amostra, são impregnados 5 círculos em um mesmo papel de filtro, como exemplificado na Figura 12, e secos à temperatura ambiente por 3 horas. Depois de secas, as amostras de DBS são acondicionadas separadamente em sacos plásticos contendo um sachê de sílica em gel 0,5 gr como dessecante e armazenadas em refrigeradores a 2-8 °C. As amostras em tubo sem anticoagulante e com anticoagulante foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos, para a obtenção do soro e do plasma, respectivamente. As amostras de soro e plasma foram aliquotadas

em microtubos de 2,0 mL e armazenadas em freezers a -20 °C. Todas as amostras foram identificadas por meio de um número serial e cadastradas no sistema do banco de amostras da empresa. Para o projeto em questão, foi montado um biorrepositório com as amostras provenientes do banco de amostra da empresa, através da seleção pela sua caracterização prévia:

- Amostras positivas para HCV;
- Amostras negativas para HCV;
- Amostras negativas para HCV, mas positivas para outras infecções importantes.

Figura 12 – Exemplo de amostra de DBS.



Fonte: Brasil, 2010.

Para o ensaio de ELISA com soro e plasma, foram utilizadas 237 amostras, sendo 85 positivas (35,86%) e 152 negativas (64,14%). Das amostras positivas, 50 eram provenientes do painel de soros adquiridas pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade – PNCQ (lote 1020, validade dezembro/2023), caracterizadas pelo fornecedor através do método de quimioluminescência ARCHITECT (Abbot). Para o ensaio com DBS, foram utilizadas 185 amostras, sendo 84 positivas (45,41%) e 101 negativas (54,59%). Das 84 amostras positivas, 50 eram amostras batizadas com os soros controles adquiridos pelo PNCQ, diluídos na proporção de 1/2 em sangue

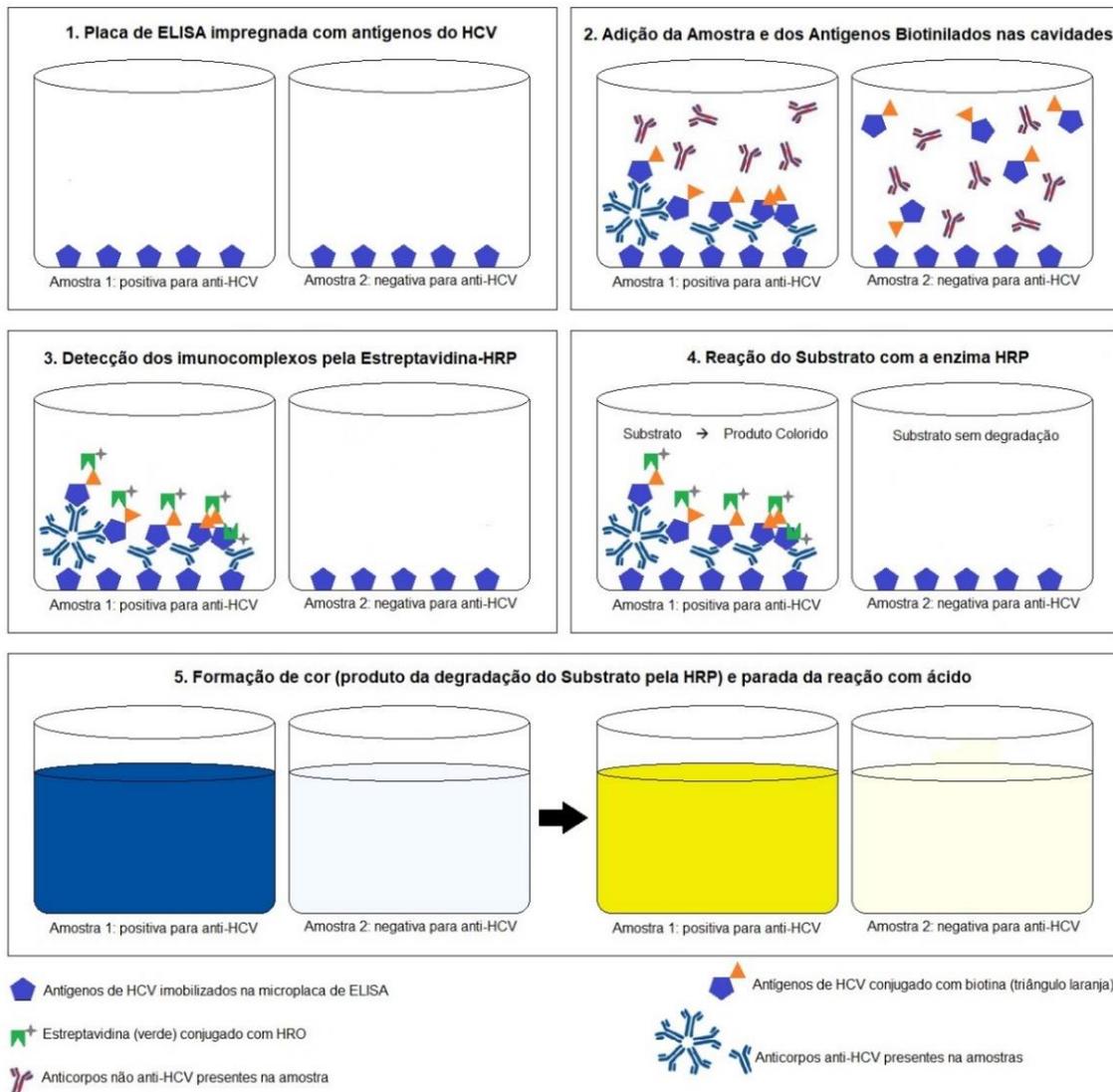
negativo e impregnados no papel de filtro. Das 101 amostras negativas, 53 tinham amostras de soro coletadas no mesmo dia, incluídas no ensaio de soro e plasma descrito acima.

Para a validação do teste rápido, foram utilizadas 90 amostras, sendo 60 positivas (66,66%) e 30 negativas (33,33%), todas também testadas no ensaio de ELISA descrito acima. Das amostras positivas, 40 eram provenientes do painel de soros adquiridas pelo PNCQ.

5.3 Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA)

A metodologia escolhida para o ensaio foi o ELISA duplo sanduíche, com antígenos específicos de HCV fixados à placa e antígenos biotinilados para a captura dos anticorpos anti-HCV presente na amostra. A detecção do complexo [antígeno fixado – anticorpo anti-HCV – antígeno biotinilados] e a amplificação do sinal são feitos através da estreptavidina conjugada à enzima peroxidase HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*). Para a padronização do ELISA, foram escolhidos pares de antígenos e conjugados disponíveis comercialmente. Por se tratar de informações confidenciais da empresa Quibasa-Bioclin, os nomes e os fornecedores dos antígenos utilizados foram mantidos em sigilo. A Figura 13 ilustra o modo de funcionamento do ELISA desenvolvido.

Figura 13 – Funcionamento do ELISA sanduíche anti-HCV.



Esquema do ensaio de ELISA desenvolvido. A microplaca é revestida com antígenos recombinantes de HCV (Core, NS3, NS4 e NS5). No primeiro momento, a amostra é incubada junto ao Conjugado 1, constituído de antígenos recombinantes de HCV conjugados à biotina. Anticorpos anti-HCV presentes na amostra se ligam aos antígenos de HCV imobilizados na microplaca e aos antígenos biotinilados presentes no Conjugado 1, formando o imunocomplexo antígeno-anticorpo-antígeno biotinilado. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O Conjugado 2, constituído de estreptavidina conjugada à Peroxidase, é adicionado à microplaca, que é então incubada. A Estreptavidina se liga aos antígenos biotinilados ligados aos anticorpos anti-HCV. Uma nova lavagem é realizada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul que indica a detecção de anticorpos anti-HCV presentes na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, havendo uma mudança de cor de azul para amarelo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na microplaca de ELISA, foi utilizado um antígeno quimérico de HCV das proteínas Core, NS3, NS4 e NS5 do HCV, testado em três concentrações diferentes: 0,095 µg/mL, 0,38 µg/mL e 0,76 µg/mL. Para tanto, o antígeno foi diluído na concentração

indicada em tampão carbonato 50 mM pH 9,6; 100 μ L dessa solução foram adicionados em cada um dos poços da microplaca, incubada a 2-8 °C por 18-24 horas. Foram utilizadas placas de poliestireno de alta ligação (COSTAR), com 96 cavidades divididas em 12 tiras (strips), ilustrada pela Figura 14. Depois desse tempo, as placas foram bloqueadas com a adição de 150 μ L de solução de bloqueio (lisina <0,5 M e sacarose <0,5 M) e incubadas a temperatura ambiente (25-30 °C) por 4 horas. Depois do tempo de bloqueio, todo o conteúdo foi desprezado por inversão e as placas foram secas em estufa a 37 °C. Por fim, as placas foram acondicionadas em sachês aluminizados contendo um sachê de sílica gel 2,0 gr e armazenadas a 2-8 °C até o momento do uso. Os procedimentos descritos acima e as soluções utilizadas para sensibilização e bloqueio das placas foram pré-estabelecidas em padronizações anteriores do laboratório.

Figura 14 – Exemplo de microplaca de ELISA em tiras.



Fonte: ECONOLAB.

Foram utilizados dois antígenos conjugados à biotina: um contendo apenas a proteína Core e outro contendo um antígeno quimérico com as proteínas não-estruturais. Os dois foram utilizados sempre na proporção de 1:1, ou seja, em volumes iguais, e diluídos na mesma solução estabilizadora (Quibasa-Bioclin). Foram testadas três diluições diferentes: 1:1.000, 1:2.000 e 1:4.000. A solução pronta para uso com os dois conjugados diluídos será chamada a partir daqui de “Conjugado 1”. Para a detecção, foi utilizada a estreptavidina conjugada à HRP, testada nas diluições de

1:10.000 e 1:20.000. O conjugado de estreptavidina também foi diluído em solução estabilizadora (Quibasa-Bioclin) e será chamado de “Conjugado 2”. Foi utilizado no ensaio o substrato enzimático 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, ou TMB, utilizado adquirido comercialmente (OneStep TMB Linear - Scienco).

No primeiro momento, foi realizada a padronização da quantidade dos reagentes utilizando as amostras de soro e plasma. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para isso, o volume de reagente, o tempo e a temperaturas das incubações foram mantidas fixas. Dessa forma, o protocolo do ensaio foi definido da seguinte forma:

- 1) Antes de iniciar o ensaio, as amostras a serem testadas eram descongeladas e os reagentes eram colocados a temperatura ambiente por pelo menos 40 minutos.
- 2) Os strips da microplaca a serem utilizados eram separados e montados em um suporte à parte. O restante dos strips são armazenados novamente na embalagem e guardados até uso posterior.
- 3) 50 μ L de cada amostra a ser analisada eram adicionados em sua respectiva cavidade. Depois, eram pipetados 50 μ L do Conjugado 1 em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco. As cavidades eram cobertas por selador de placas adesivo e em seguida incubadas por 60 minutos a 37 °C.
- 4) A lavagem da placa era feita com Lavadora Automática de Microplacas (BioTek). Todo o conteúdo das cavidades era aspirado e eram adicionados 300 μ L de solução de lavagem pronta (PBS 0,01 M e Tween 20 0,05%) em cada cavidade por cinco vezes. OBS.: A solução de lavagem é produzida concentrada em 20x e é preparada no momento do ensaio.
- 5) 100 μ L do Conjugado 2 eram adicionados e incubados a 37 °C por 30 minutos, com as cavidades cobertas. Depois, uma nova etapa de lavagem era realizada, como descrito acima.
- 6) 100 μ L de substrato TMB eram adicionados e incubados por 10 minutos a 37 °C, protegido de exposição à luz. Depois desse tempo, 100 μ L de solução de parada (ácido clorídrico 1 M) eram adicionados.

7) A leitura dos valores de absorbância era realizada em Leitora de Microplacas (BioTek) em até no máximo 15 minutos após a parada, em filtro duplo de 450 nm / 630 nm de comprimento de onda.

Depois de determinadas as concentrações dos reagentes descritos, foi feita a padronização do ensaio com as amostras de sangue impregnado em papel de filtro. Para sua utilização, as amostras de DBS devem ser devidamente eluídas para que os anticorpos sejam extraídos da amostra seca no papel. Foram testados três protocolos distintos de eluição das amostras em papel de filtro, descritos no Quadro 2. Para todos os protocolos, as amostras de DBS foram picotadas no momento do ensaio, com o auxílio de um picotador de papel no diâmetro de 3 mm. Cada círculo de amostra picotado foi adicionado em sua cavidade determinada e 50 µL de tampão de eluição (PBS 0,01 M, Tween 20 0,5% e lisina <0,1 M) foi adicionado. Nos Protocolos 1 e 2, a amostra passa por um processo de eluição antes da adição do Conjugado 1 (50 µL). No Protocolo 3, como não há qualquer tipo de pré-tratamento, as amostras de DBS foram eluídas com o tampão de eluição e incubadas com o Conjugado 1 de forma concomitante. Depois da adição do Conjugado 1, o mesmo procedimento descrito para as amostras de soro e plasma era seguido.

Quadro 2 – Protocolos testados com amostras de DBS.

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Pré-incubação da microplaca com DBS + tampão de eluição	Sim. 20 minutos a 37 °C.	Não.	Não.
Pré-agitação da microplaca com DBS + tampão de eluição	Não.	Sim. 10 minutos a 3000 rpm em agitador de placa.	Não.

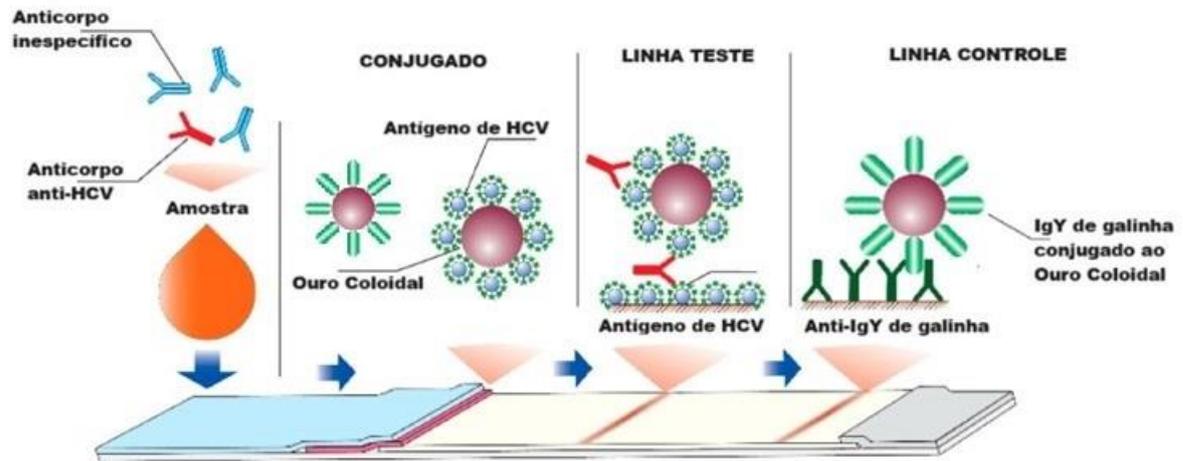
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Padronização do ensaio imunocromatográfico (teste rápido)

A metodologia escolhida para o ensaio imunocromatográfico também foi o duplo sanduíche, com antígenos específicos de HCV fixados na linha teste na membrana de nitrocelulose e antígenos específicos de HCV conjugados ao ouro coloidal para a

captura dos anticorpos anti-HCV presente na amostra. Na linha controle, foram utilizados anticorpos anti-IgY de galinha, que se ligavam especificamente a anticorpos IgY, também conjugados ao ouro coloidal. Foram escolhidos pares de antígenos e conjugados disponíveis comercialmente. A Figura 15 esquematiza a metodologia e o funcionamento do teste rápido desenvolvido. Por se tratar de informações confidenciais da empresa Quibasa-Bioclin, os nomes e os fornecedores dos antígenos utilizados foram mantidos em sigilo. No desenvolvimento do teste rápido, foram avaliados todos os componentes que fazem parte do teste imunocromatográfico.

Figura 15 – Funcionamento do teste rápido.



Após a amostra ser aplicada na *sample pad*, ela começa a migrar pela tira imunocromatográfica por capilaridade, onde os anticorpos anti-HCV presentes na amostra, se positiva, se ligam às partículas de ouro coloidal conjugadas com antígenos de HCV (proteínas do Core, NS3, NS4 e NS5), formando imunocomplexos. Esses complexos continuam a migrar pela membrana em direção aos antígenos de HCV imobilizados na região teste (T), levando a formação de banda rósea que indica a presença de anticorpos anti-HCV. Quando negativa, não há interação dos anticorpos da amostra nem com o conjugado e nem com a linha teste, não havendo, portanto, a formação da linha rosa. As partículas de ouro coloidal continuam percorrendo a membrana até a linha controle, onde ocorre o conjugado de IgY de galinha se liga aos anticorpos anti-IgY presentes na linha controle, levando à formação de uma linha, tanto para amostras reativas quanto não-reativas.

Fonte: Adaptado de Sotnikov, Zherdev e Dzantiev, 2021.

O conjugado do teste era feito em duas etapas. Primeiro, conjuga-se o ouro coloidal a uma proteína acopladora, formada de anticorpos anti-*tag*. Depois, era adicionado o antígeno quimérico de HCV, marcado com uma *tag*, para ser imobilizado ao ouro coloidal por meio da proteína acopladora.

Assim, as condições ideais para a imobilização dos antígenos de HCV ao ouro coloidal também foram analisadas. Para tanto, foi utilizado ouro coloidal contendo partículas de 40 nm de diâmetro, sintetizadas pelo método de redução por citrato de sódio, como descrito em Dong *et al.* (2020). O ouro coloidal foi ajustado em 3 pHs diferentes (6,0, 7,0 e 9,0) com K_2CO_3 a 0,1 M. Em cada um desses pHs, foi verificada a quantidade de proteína acopladora necessária para formar conjugados estáveis com o ouro coloidal. Foram testadas as concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. A estabilização do conjugado foi verificada com a adição de uma solução concentrada em sal (PBS 10x), observada quando não há alteração na cor do conjugado; nas condições em que o conjugado se desestabiliza, há a mudança de cor de rosa para roxo a preto.

Após a etapa de verificação de pH e concentração de proteína, foi avaliado o desempenho do ensaio frente a diferentes concentrações de antígenos de HCV (1 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$) e bloqueio do ouro coloidal, variando 0,1% a 1,0% de caseína. O procedimento de conjugação realizado foi o seguinte: após o acerto do pH do ouro com a solução de K_2CO_3 , adiciona-se a quantidade preconizada de proteína acopladora, homogeneizando por 10 minutos. Após esse tempo, a solução de bloqueio contendo 1,0% de caseína é adicionada, a fim de se bloquear todos os sítios do ouro coloidal em que não houve a adesão da proteína acopladora. Após o bloqueio, a proteína de HCV era adicionada sob homogeneização por 30 minutos. Depois, o conjugado era centrifugado por 5 minutos a 21.300 g. O sobrenadante era desprezado para retirar os materiais não ligados e o pellet de conjugado era ressuspenso em solução tampão contendo 1,0% de caseína, NaCl a $<0,01\text{M}$, tetraborato de sódio a 0,01 M, sacarose a 10% e Tween 20 a 0,5%. Por fim, foi avaliado o desempenho frente a diferentes volumes de ressuspensão do pellet de conjugado em tampão de armazenamento. Após finalizado, o conjugado de antígenos de HCV era misturado ao conjugado IgY de galinha, responsável pela marcação da linha controle. Essa solução era então impregnada em uma tira de 30 cm x 1 cm (largura x altura) de fibra de vidro previamente tratada com 0,1% de Tween 20, seca a 37 °C por 4 horas e guardada em ambiente seco (umidade relativa abaixo de 40%) até o momento do uso. Para cada tira de fibra de vidro, eram adicionados 1,5 mL do conjugado pronto.

Também foram avaliadas diferentes membranas de nitrocelulose para ser utilizada como substrato para a impregnação das linhas teste e controle do ensaio. Foi escolhida a nitrocelulose NC140 (Sartorius), que possui como características uma boa sensibilidade e uma rápida limpeza de background da corrida imunocromatográfica, de acordo com o descrito pelo fornecedor. Na linha teste, o antígeno quimérico de HCV (Core, NS3, NS4 e NS5 do HCV) foi diluído em tampão PBS contendo 10 mM de NaCl e 2% de sacarose na concentração final de 2,0 mg/mL. Na linha controle, foi utilizada uma concentração fixa de 1,0 mg/mL do anticorpo anti-IgY de galinha. Para a impregnação das linhas na nitrocelulose, foi utilizado um equipamento para dispensação das linhas na nitrocelulose (BioDot), numa quantidade fixa de 1 µL/cm. Após impregnadas, as membranas eram mantidas em ambiente seco até o uso.

A *sample pad* e a necessidade de membrana adicional contendo agentes de bloqueio também foram avaliadas quanto a capacidade de reter hemácias para a utilização de sangue no ensaio, melhora do fluxo imunocromatográfico e inibição de reações inespecíficas. As soluções de tratamento, tanto da *sample pad* quanto da membrana de bloqueio, eram adicionadas em uma fibra de vidro sem tratamento, secas em condição igual à descrita acima para o conjugado.

Por fim, diferentes diluentes de amostra, utilizados para induzir a corrida da amostra pela tira imunocromatográfica, foram avaliados em diferentes tampões e pHs. Foram testados os tampões PBS no pH 7,4, TRIS-EDTA 10 mM no pH 8,0, Borato 20 mM no pH 8,5, TBS no pH 9,0 e Carbonato-Bicarbonato no pH 9,5. Ainda, também foram avaliadas as quantidades de tween 20 e cloreto de sódio no diluente de amostra frente ao fluxo da corrida imunocromatográfica e desempenho ao utilizar amostras de soro e sangue.

Para a avaliação do ensaio imunocromatográfico, o procedimento do teste foi mantido fixo, da seguinte forma:

- 1) Adição da amostra a ser testada na *sample pad*, em um volume definido (testados volumes de 25 e 50 µL de amostra).
- 2) Adição de 80 µL de diluente de amostra.

3) Leitura do resultado do teste após 30 minutos do início da corrida imunocromatográfica.

5.5 Validação do ensaio imunoenzimático

Depois de estabelecidos as concentrações e as diluições dos reagentes e o protocolo de ensaio com as amostras de DBS, os ensaios de validação foram feitos. Todos os testes foram realizados em duplicada e em cada um deles foram utilizados controles de reação: controle positivo, controle negativo, controle positivo de DBS e controle negativo de DBS.

5.5.1 Cut-off, sensibilidade e especificidade

A determinação do cut-off foi feita através da Curva ROC (*Receiver Operator Characteristics*) com o software MedCalc, com intervalo de confiança (CI) de 95%. Através do valor de cut-off, calcula-se o índice de cada uma das amostras para classificá-las como positivas ou negativas, de acordo com o descrito abaixo:

Índice = (absorbância média das duplicatas da amostra) / (valor de cut-off calculado)

- Índice <0,90: amostra negativa;
- Índice >1,10: amostra positiva;
- Índice entre 0,90 e 1,10: amostra indeterminada.

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram calculados a partir de uma tabela de contingência 2x2, após a classificação das amostras. Para os cálculos de VPP e VPN, foi considerada a prevalência de 2% da população, conforme descrito por Martins, Narciso-Schiavon e Schiavon (2011). As fórmulas estão descritas adiante:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de resultados positivos}}{\text{amostras verdadeiramente positivas}} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de resultados negativos}}{\text{amostras verdadeiramente negativas}} \times 100$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{sensibilidade} \times \text{prevalência}}{\text{sensibilidade} \times \text{prevalência} + (1 - \text{especificidade}) \times (1 - \text{prevalência})} \times 100$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{especificidade} \times (1 - \text{prevalência})}{(1 - \text{sensibilidade}) \times \text{prevalência} + \text{especificidade} \times (1 - \text{prevalência})} \times 100$$

5.5.2 Repetibilidade

Para a análise de repetibilidade, três amostras de soro ou plasma e três amostras de DBS foram testadas por 10 vezes em um mesmo ensaio. Espera-se que os valores de absorvância obtidas para cada uma das amostras após a leitura possua um coeficiente de variação de até 20%, calculado através da fórmula:

$$\text{CV} = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100.$$

5.5.3 Reprodutibilidade

Para a análise de reprodutibilidade, três amostras de soro ou plasma e três amostras de DBS foram testadas por 10 vezes, em três dias consecutivos. Espera-se que os valores de absorvância obtidas para cada uma das amostras após a leitura, de todos os três ensaios e da média entre eles, possua um coeficiente de variação de até 20%, calculado como descrito acima.

5.5.4 Interensaio

Para a análise de interensaio, três amostras de soro ou plasma e três amostras de DBS foram testadas por 10 vezes, em três lotes diferentes do kit. Assim como os testes de repetibilidade e reprodutibilidade, espera-se que os valores de absorvância obtidas para cada uma das amostras após a leitura, de todos os três lotes e da média entre eles, possua um coeficiente de variação de até 20%.

5.5.5 Reatividade cruzada

Para a análise de reatividade cruzada, foram utilizadas amostras sabidamente negativas para anticorpos anti-HCV, mas positivas para outras infecções. A Tabela 1 descreve a quantidade e os analitos para as quais as amostras eram reativas.

Tabela 1 – Número de amostras utilizadas para reatividade cruzada.

Amostra	Soro/Plasma	DBS
Positiva para HIV	10	5
Positiva para HTLV	10	9
Positiva para Hepatite B (HBsAg)	10	9
Positiva para Dengue	10	0
Positiva para Zika	10	6
Positiva para Chikungunya	4	0
Positiva para Doença de Chagas	10	10
Positiva para Sífilis	9	9
Vacinados contra Influenza	10	0
Vacinados contra Hepatite B (positivos para anti-HBs)	10	0
Total	93	48

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Validação do ensaio imunocromatográfico

Depois de estabelecidos as concentrações dos reagentes e o protocolo de ensaio, os ensaios de validação foram feitos.

5.6.1 Sensibilidade e especificidade

Os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram calculados a partir de uma tabela de contingência 2x2, através das fórmulas já descritas acima.

5.7 Comparativo de sensibilidade analítica entre os métodos

Para comparar a sensibilidade analítica entre os métodos, uma mesma amostra positiva para HCV foi diluída de forma seriada, tanto em soro quanto em sangue,

negativos. Para tanto, a diluição inicial foi feita na proporção de 1:2, e seguiu de forma seriada até a diluição 1:1.024. No caso do sangue, cada diluição também foi impregnada em papel filtro para a fabricação de amostras de DBS, conforme previamente descrito. As diluições seriadas foram testadas em ambos os métodos desenvolvidos, sendo a amostra de sangue testadas no ELISA no formato de DBS.

Para a análise do comparativo de métodos, utilizou-se a medida de concordância *Kappa*, estratificada da seguinte forma (Silva, Velo e Pereira, 2016):

- <0,00: concordância ruim
- 0,00-0,20: concordância fraca
- 0,21-0,40: concordância sofrível
- 0,41-0,60: concordância regular
- 0,61-0,80: concordância boa
- 0,81-0,99: concordância ótima
- 1,00: concordância perfeita

6 RESULTADOS

6.1 Padronização do ensaio imunoenzimático

A quantidade de proteína presente na placa sensibilizada e a titulação dos conjugados 1 e 2 foi padronizada com a testagem simultânea desses reagentes. Para isso, foram utilizadas 2 amostras positivas e 1 amostra negativa. O procedimento realizado foi o descrito na seção anterior, utilizando de 50 µL de amostra não diluída. A Tabela 2 mostra os resultados encontrados com a titulação dos reagentes, em valores de densidade óptica (absorbância).

Tabela 2 – Titulação dos reagentes – teste inicial.

		Densidade óptica (DO) – Média das duplicatas							
Amostra	Am. 1 (+)	3,715	3,639	3,181	2,981	3,622	3,517	3,150	2,938
	Am. 2 (+)	1,851	1,829	1,459	1,429	1,991	2,088	1,562	1,736
	Am. 3 (-)	0,033	0,024	0,026	0,026	0,030	0,025	0,028	0,026
Condição testada	Conjugado 1	1:1.000	1:2.000	1:1.000	1:2.000	1:1.000	1:2.000	1:1.000	1:2.000
	Conjugado 2	1:10.000		1:20.000		1:10.000		1:20.000	
	Placa	0,76 µg/mL				0,38 µg/mL			

Fonte: Elaborado pela autora.

No teste acima, observou-se que a concentração de 0,38 µg/mL de proteína na placa apresentava os mesmos ganhos de absorbância nas amostras positivas que 0,76 µg/mL. De forma parecida, a diluição de 1:2.000 do Conjugado 1 apresentava os mesmos ganhos que 1:1.000, dentro das mesmas condições de ensaio. Assim, testou-se maiores diluições desses dois reagentes para avaliar a resposta (Tabela 3). Já para o Conjugado 2, ficou estabelecido a diluição de 1:10.000, pelo melhor resultado que esse apresentava em todas as condições testadas.

Tabela 3 – Titulação dos reagentes – teste final.

		Densidade óptica (DO) – Média das duplicatas			
Amostra	Am. 1 (+)	3,267	2,641	2,456	1,891
	Am. 2 (+)	1,321	1,228	0,957	0,888
	Am. 3 (-)	0,043	0,043	0,030	0,029
Condição testada	Conjugado 1	<u>1:2000</u>	1:4.000	1:2000	1:4.000
	Placa	<u>0,38 µg/mL</u>		0,095 µg/mL	
	Conjugado 2	<u>1:10.000</u>			

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir do teste acima, foram definidas as concentrações de todos os componentes. Pode-se observar que o protocolo com 0,38 µg/mL de proteína, diluição de 1:2.000 de conjugado 1 e 1:10.000 de conjugado 2 oferece melhor ganho de absorvância para as amostras positivas, com a amostra negativa sem alteração significativa em sua densidade óptica.

Após a padronização do ensaio em soro e plasma, o procedimento com as amostras de DBS foi testado em 3 protocolos distintos, conforme explicado em Materiais e Métodos. A Tabela 4 descreve os resultados obtidos.

Tabela 4 – Protocolos com amostras de DBS.

		Densidade óptica (DO) – Média das duplicatas		
Amostra	Am. 1 (+)	0,424	0,580	0,457
	Am. 2 (+)	0,086	0,145	0,104
	Am. 3 (+)	0,418	0,609	0,433
	Am. 4 (+)	3,367	3,560	3,371
	Am. 5 (-)	0,232	0,391	0,043
	Am. 6 (-)	0,037	0,141	0,038
	Am. 7 (-)	0,034	0,118	0,040
Condições Testadas		Pré-incubação por 20 minutos a 37°C.	Pré-agitação por 10 minutos a 3000 rpm.	Sem pré-tratamento prévio.

Fonte: Elaborado pela autora.

Com o teste acima, ficou definido que não há necessidade de procedimentos prévios com a amostra de DBS e o tampão de eluição antes da adição do Conjugado 1. Nas

duas condições testadas onde há pré-incubação ou pré-agitação da amostra antes do ensaio, observa-se o aumento de inespecificidade, com amostra negativa 5 obtendo ganhos de absorbância maiores que a amostra positiva mais baixa (amostra 2). Dessa forma, o protocolo selecionado tinha a incubação com o Tampão de Eluição e o Conjugado 1 feita de forma concomitante.

6.2 Padronização do ensaio imunocromatográfico

No primeiro momento, foi verificado o melhor pH e concentração de anticorpo para conjugação da proteína acopladora no ouro coloidal, através do teste de precipitação do outro coloidal após a adição de solução rica em sal. As Figuras 16, 17 e 18 mostram o resultado desses testes.

Figura 16 – Verificação de pH e concentração de anticorpo no pH 6,0.



Imagem representativa da verificação da estabilização do conjugado de ouro coloidal no pH 6,0. Observa-se que o conjugado é instável (roxo) utilizando até 25 ug de proteína para cada 5 mL de ouro coloidal (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A partir de 50 ug (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o conjugado se torna estável, mantendo a coloração rósea do ouro puro.

Fonte: Fotografado pela autora.

Figura 17 – Verificação de pH e concentração de anticorpo no pH 7,0.

TITULAÇÃO DO OURO COLOIDAL pH 7,0

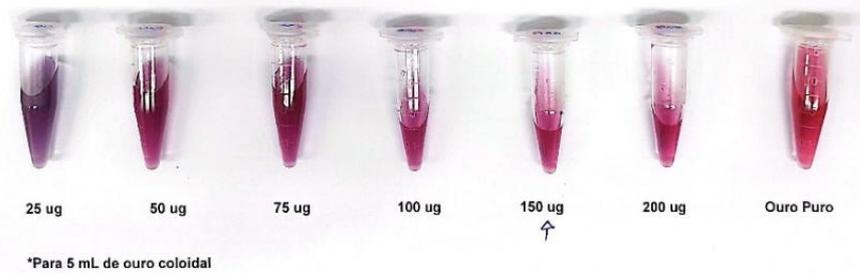


Imagem representativa da verificação da estabilização do conjugado de ouro coloidal no pH 7,0. Observa-se que o conjugado é instável (roxo) utilizando até 100 μg de proteína para cada 5 mL de ouro coloidal (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A partir de 150 μg (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o conjugado se torna estável, mantendo a coloração rósea do ouro puro.

Fonte: Fotografado pela autora.

Figura 18 – Verificação de pH e concentração de anticorpo no pH 9,0.

TITULAÇÃO DO OURO COLOIDAL pH 9,0

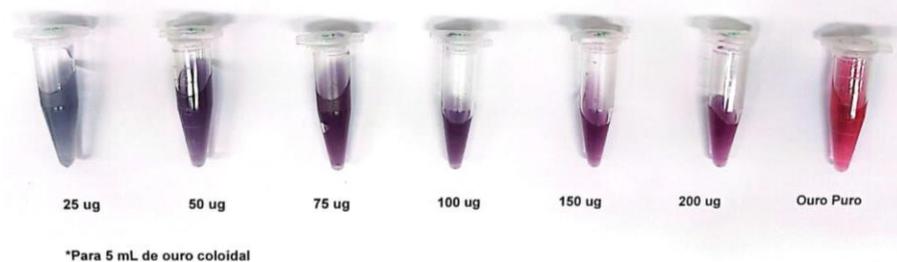


Imagem representativa da verificação da estabilização do conjugado de ouro coloidal no pH 9,0. Observa-se que o conjugado é instável (roxo) em todas as concentrações de proteína testada (de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Fonte: Fotografado pela autora.

Conforme observado nas fotos, o melhor pH para a conjugação é o pH 6,0, onde se observa uma melhor estabilização do conjugado com menores concentrações de anticorpo (manutenção da cor rosa do ouro coloidal puro). Ainda, observa-se que com

10 µg/mL de anticorpo (50 µg por 5 mL de ouro coloidal), o conjugado já se mantém estável, sendo a condição escolhida para as próximas etapas.

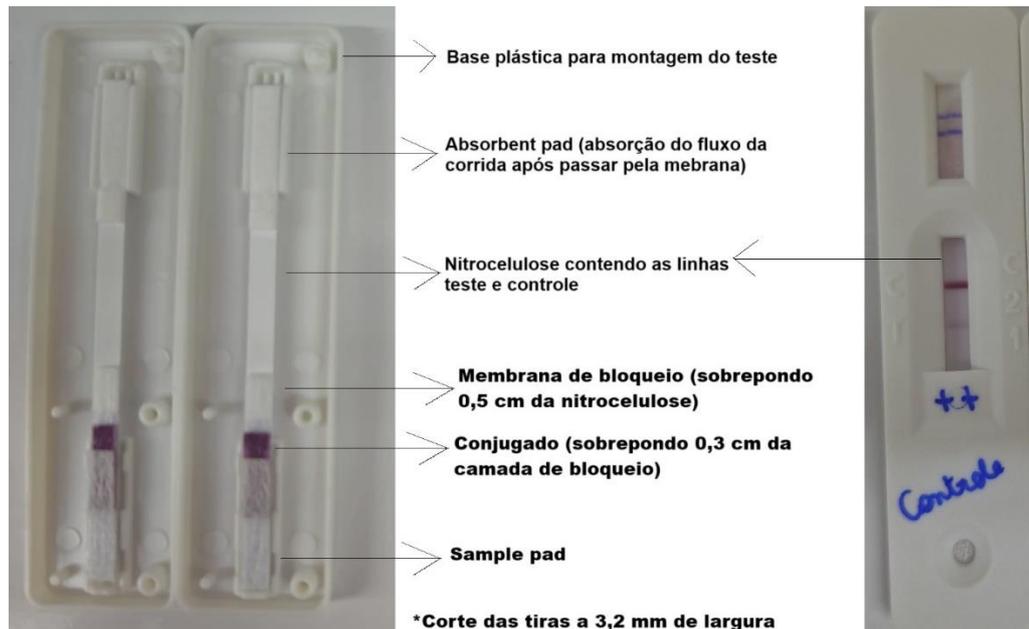
A concentração do antígeno de HCV no conjugado, a quantidade de tampão de armazenamento a ser utilizado para ressuspender o pellet de ouro após a centrifugação, a composição da sample pad e a necessidade de bloqueio de interações inespecíficas foram avaliados frente ao desempenho com o painel conhecido de amostras. Era observado, de forma visual, a intensidade da positividade das amostras testadas. O Quadro 3 descreve as condições de ensaio que foram padronizadas para o funcionamento do teste rápido. Ainda, a Figura 19 mostra o modo de montagem do teste imunocromatográfico desenvolvido.

Quadro 3 – Condições padronizadas para o teste rápido.

Nitrocelulose	NC140 (Sartorius) Linha teste 2,0 mg/mL (antígenos de HCV) Linha controle 1,0 mg/mL (anti-IgY de galinha)
Conjugado	10 µg/mL de proteína acopladora 1 µg/mL de proteína de HCV Ressuspensão após centrifugação: 3 mL finais de conjugado para cada 5 mL iniciais de ouro coloidal
Sample pad	Tampão TRIS 10 mM NaCl 150 mM Sacarose 5% Tween 20 0,1% Anticorpo anti-RBC 20 mg/mL (anticorpo anti-hemácia)
Camada de Bloqueio	Albumina 1% Tween 20 0,1%
Diluyente	Tampão TRIS 10 mM EDTA 1 mM NaCl 150 mM Tween 20 0,1% pH 8,0

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 19 – Esquema de montagem do teste rápido



Na imagem à esquerda, pode-se observar como a sobreposição de membranas foi realizada. Na extremidade superior da nitrocelulose, foi colocada a *absorbent pad* com 1,5 cm de altura. Na extremidade inferior da nitrocelulose, foi adicionada a membrana de bloqueio, com 1,0 cm de altura, sobrepondo 0,5 cm da nitrocelulose. Sobrepondo 0,3 cm da membrana de bloqueio, foi adicionada a membrana de conjugado, também com 1,0 cm de altura. Por fim, para finalizar o teste e de modo a manter contato com o conjugado, a *sample pad* foi adicionada, com 1,5 cm de altura. Cada uma das tiras tinha 3,2 mm de largura e eram acondicionadas no cassete plástico conforme a figura. Na imagem à direita, observa-se o cassete fechado com a tira imunocromatográfica dentro, onde há a marcação das linhas teste e controle após a corrida de uma amostra positiva. No cassete, há o orifício de aplicação da amostra (redondo), o painel de leitura, onde há as indicações dos locais da linha teste (T) e controle (C), além do orifício da *absorbent pad* (retangular).

Fonte: Fotografado pela autora.

6.3 Validação do ensaio imunoenzimático

6.3.1 Cut-off, sensibilidade e especificidade

A Tabela 5 resume os resultados obtidos para as amostras de soro/plasma e DBS.

Tabela 5 – Resultado das amostras testadas em densidade óptica.

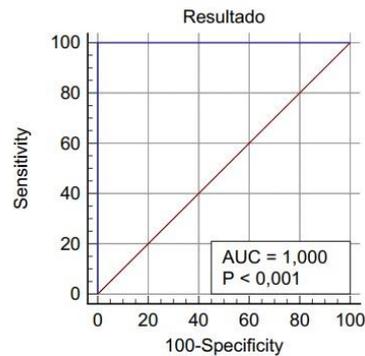
Soro	Média	Limite inferior	Limite superior	DBS	Média	Limite inferior	Limite superior
Positivas	1,437	0,508	2,835	Positivas	1,638	0,183	2,578
Negativas	0,029	0,016	0,067	Negativas	0,037	0,027	0,055
Média do Controle Positivo: 1,985				Média do Controle Positivo de Extração: 1,702			
Média do Controle Negativo: 0,059				Média do Controle Negativo de Extração: 0,050			

Fonte: Elaborado pela autora.

Para a determinação do cut-off, a densidade óptica (DO) obtida através da leitura da absorbância das amostras foi utilizada para a análise da Curva ROC. A Figura 20 e a Figura 21 são os resultados obtidos pelo *software* MedCalc.

Figura 20 – Resultado da curva ROC para amostras de soro e plasma.

Sample size	237					
Positive group ^a	85 (35,86%)					
Negative group ^b	152 (64,14%)					
^a Variável = 1						
^b Variável = 0						
Disease prevalence (%)	unknown					
Area under the ROC curve (AUC)						
Area under the ROC curve (AUC)	1,000					
Standard Error ^a	0,000					
95% Confidence interval ^b	0,985 to 1,000					
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001					
^a DeLong et al., 1988						
^b Binomial exact						
Youden index						
Youden index J	1,0000					
Associated criterion	>0,098					
Sensitivity	100,00					
Specificity	100,00					
Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]						
Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0,016	100,00	95,8 - 100,0	0,00	0,0 - 2,4	1,00	
>0,098	100,00	95,8 - 100,0	100,00	97,6 - 100,0		0,00
>2,835	0,00	0,0 - 4,2	100,00	97,6 - 100,0		1,00

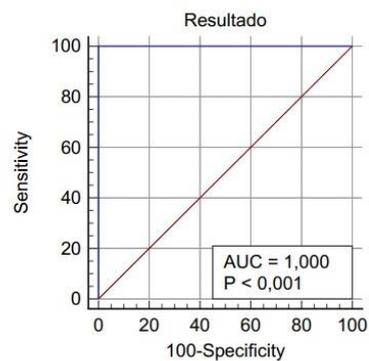


Curva ROC gerada para as amostras de soro e plasma. O cut-off estipulado está descrito em “Associated criterion”.

Fonte: *Print screen* do software MedCalc.

Figura 21 – Resultado da curva ROC para amostras de DBS.

Sample size	185					
Positive group ^a	84 (45,41%)					
Negative group ^b	101 (54,59%)					
^a Variável = 1						
^b Variável = 0						
Disease prevalence (%)	unknown					
Area under the ROC curve (AUC)						
Area under the ROC curve (AUC)	1,000					
Standard Error ^a	0,000					
95% Confidence interval ^b	0,980 to 1,000					
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001					
^a DeLong et al., 1988						
^b Binomial exact						
Youden index						
Youden index J	1,0000					
Associated criterion	>0,055					
Sensitivity	100,00					
Specificity	100,00					
Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]						
Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0,027	100,00	95,7 - 100,0	0,00	0,0 - 3,6	1,00	
>0,055	100,00	95,7 - 100,0	100,00	96,4 - 100,0		0,00
>2,578	0,00	0,0 - 4,3	100,00	96,4 - 100,0		1,00

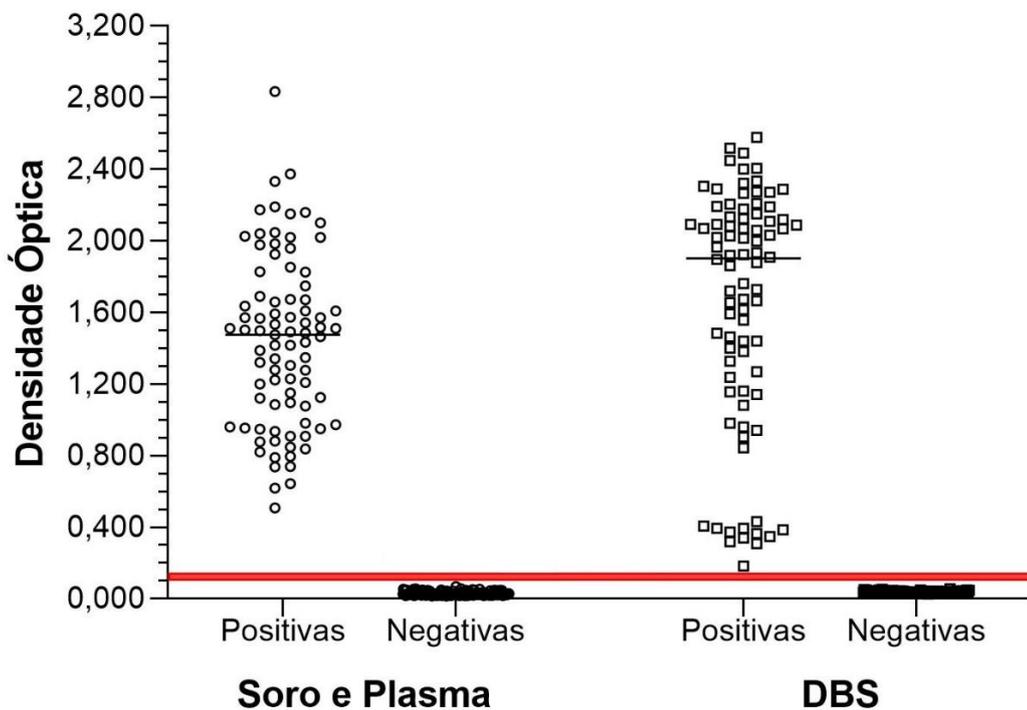


Curva ROC gerada para as amostras de soro e plasma. O cut-off estipulado está descrito em “Associated criterion”.

Fonte: *Print screen* do software MedCalc.

O ponto de corte estipulado, indicado como “*Associated criterion*” nas análises de Curva ROC, foi de 0,098 para as amostras de soro e plasma e 0,055 para as amostras de DBS. Dessa forma, foi definida a absorvância de 0,100 como cut-off do teste de ELISA, visto que esse valor consegue abranger de forma satisfatória os pontos de corte obtidos para ambos os tipos de amostra. O Gráfico 1 mostra o padrão de dispersão das amostras frente ao valor de cut-off (0,100) estipulado.

Gráfico 1 – Dispersão das amostras e análise do cut-off.



O gráfico representa a dispersão das absorvâncias obtidas das amostras no ELISA. Cada ponto representa uma amostra de soro ou plasma diferente, enquanto cada quadrado representa uma amostra de DBS. A linha vermelha representa o ponto de corte entre positivas e negativas. A linha horizontal presente nas amostras positivas representa a mediana das amostras, onde marca metade das amostras.

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da estipulação do valor de cut-off, as amostras podem ser categorizadas para o cálculo de sensibilidade e especificidade. A Tabela 6 e a Tabela 7 mostram os resultados obtidos com as amostras no ensaio desenvolvido para soro/plasma e DBS, respectivamente.

Tabela 6 – Amostras de soro e plasma - ELISA.

ELISA	Referência		Total
	Positivas	Negativas	
desenvolvido	Positivas	85	85
	Negativas	0	152
	Total	85	237

Fonte: Elaborado pela autora.

Sensibilidade: >99,99% - CI 95%: 95,8% - 100,0%

Especificidade: >99,99% - CI 95%: 97,6% - 100,0%

VPP: 99,51%

VPN: 99,99%

Tabela 7 – Amostras de DBS - ELISA.

ELISA	Referência		Total
	Positivas	Negativas	
desenvolvido	Positivas	84	84
	Negativas	0	101
	Total	84	185

Fonte: Elaborado pela autora.

Sensibilidade: >99,99% - CI 95%: 95,7% - 100,0%

Especificidade: >99,99% - CI 95%: 96,4% - 100,0%

VPP: 99,51%

VPN: 99,99%

Analisou-se também se há perda ou mudança no diagnóstico se utilizava-se amostras de plasma ou DBS. Assim, comparou-se o índice das amostras positivas (batizadas em sangue de carneiro) e negativas (colhidas no mesmo dia) quando o teste era feito nos dois tipos de amostra (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação do índice entre as amostras de plasma e DBS.

Amostras Positivas					Amostras Negativas			
Plasma	DBS	Plasma	DBS		Plasma	DBS	Plasma	DBS
13,40	17,23	11,94	15,65		0,37	0,27	0,14	0,30
16,53	13,78	11,80	10,31		0,21	0,37	0,17	0,28
13,41	17,70	12,58	12,98		0,31	0,42	0,18	0,25
10,87	21,48	6,14	16,00		0,41	0,38	0,41	0,25
7,92	20,01	12,51	9,63		0,15	0,27	0,20	0,29
16,32	18,14	17,92	16,65		0,20	0,30	0,18	0,27
6,58	17,34	16,04	11,06		0,13	0,29	0,36	0,45
13,09	18,25	7,06	17,57		0,18	0,28	0,37	0,31
11,18	20,03	7,95	19,35		0,35	0,37	0,24	0,26
16,88	14,40	13,93	11,99		0,42	0,29	0,14	0,28
12,78	17,93	15,23	14,67		0,24	0,28	0,16	0,29
7,56	20,98	17,50	15,50		0,20	0,31	0,28	0,26
17,00	12,00	10,23	16,03		0,14	0,31	0,14	0,33
13,10	17,44	16,83	7,03		0,20	0,30	0,20	0,38
13,06	16,83	13,63	18,28		0,17	0,27	0,39	0,33
16,48	13,88	7,31	18,37		0,23	0,30	0,18	0,34
12,38	14,32	14,08	11,66		0,15	0,31	0,15	0,28
7,33	17,15	5,36	20,40		0,33	0,32	0,18	0,25
16,82	11,51	7,57	16,12		0,27	0,31	0,44	0,28
19,78	8,18	10,07	16,38		0,26	0,30	0,30	0,41
12,63	16,89	6,15	18,88		0,56	0,28	0,18	0,30
12,20	16,93	10,67	17,24		0,20	0,27	0,18	0,43
7,80	2,57				0,35	0,31	0,21	0,28
12,43	17,67				0,44	0,29	0,33	0,30
15,21	10,58				0,18	0,37	0,15	0,32
13,82	17,39				0,13	0,33		
14,58	17,44				0,42	0,30		
5,16	16,79				0,22	0,46		

Fonte: Elaborado pela autora.

6.3.2 Repetibilidade

Repetibilidade visa demonstrar a capacidade do teste em apresentar os mesmos resultados com sucessivas medições em condições inalteradas (lote, operador, dia).

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos no estudo de repetibilidade, com as amostras de soro/plasma e DBS. Foram utilizadas 2 amostras positivas e 1 amostra negativa para cada um, e foram calculadas as médias, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) de cada uma das amostras. Considera-se como aceitável se o coeficiente de variação das três amostras se apresenta abaixo de 20%, como apresentado em Growter (2001) e Minic e Zivkovic (2020).

Com CVs de 4,40%, 7,94% e 11,66% para as amostras de soro/plasma e 2,26%, 3,94% e 18,51% para as amostras de DBS, conclui-se que o kit desenvolvido apresenta padrões aceitáveis de repetibilidade dentro de um mesmo ensaio.

Tabela 9 – Ensaio de repetibilidade.

Soro/Plasma				DBS			
Repetições	Am. 1	Am. 2	Am. 3	Repetições	Am. 1	Am. 2	Am. 3
1	1,858	1,552	0,018	1	2,225	1,722	0,039
2	1,716	1,476	0,017	2	2,209	1,783	0,028
3	1,683	1,786	0,017	3	2,082	1,704	0,029
4	1,682	1,490	0,016	4	2,142	1,772	0,033
5	1,680	1,353	0,020	5	2,179	1,602	0,045
6	1,637	1,478	0,019	6	2,158	1,752	0,049
7	1,624	1,578	0,022	7	2,093	1,781	0,046
8	1,643	1,524	0,015	8	2,133	1,732	0,032
9	1,831	1,368	0,021	9	2,229	1,644	0,036
10	1,731	1,398	0,020	10	2,139	1,597	0,041
Média	1,709	1,500	0,019	Média	2,159	1,709	0,038
DP	0,075	0,119	0,002	DP	0,049	0,067	0,007
CV	4,40%	7,94%	11,66%	CV	2,26%	3,94%	18,51%

Fonte: Elaborado pela autora.

6.3.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade demonstra a capacidade do teste de manter os mesmos resultados em sucessivas medições em condições operacionais distintas. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos no estudo de reprodutibilidade, com as amostras de soro/plasma e DBS. Foram utilizadas 2 amostras positivas e 1 amostra negativa para cada um, e

foram calculadas as médias, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) de cada uma das amostras, nos três dias de ensaio.

Com a média dos CVs dos três dias – 3,55%, 6,34% e 13,21% para as amostras de soro/plasma e 5,68%, 4,33% e 14,86% para as amostras de DBS – pode-se observar que o kit desenvolvido apresenta boa reprodutibilidade entre ensaios (CV <20%).

Tabela 10 – Ensaio de reprodutibilidade.

Soro/Plasma				DBS			
	Am. 1	Am. 2	Am. 3		Am. 1	Am. 2	Am. 3
Média	1,575	1,679	0,041	Média	2,340	1,899	0,042
DP	0,057	0,105	0,005	DP	0,135	0,081	0,006
CV	3,55%	6,34%	13,21%	CV	5,68%	4,33%	14,86%

Fonte: Elaborado pela autora.

6.3.4 Interensaio

O teste de interensaio é realizado com lotes diferentes do kit, a fim de se observar a concordância e manutenção dos resultados entre os lotes. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos no estudo de interensaio, com as amostras de soro/plasma e DBS. Foi utilizado 1 amostra positiva para cada um, testadas em três lotes distintos do kit. Foram calculadas as médias, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) da mesma amostra nos três lotes.

Tabela 11 – Ensaio de interensaio.

Soro e Plasma				DBS			
Repetições	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Repetições	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1	1,798	1,653	1,648	1	0,368	0,370	0,447
2	1,782	1,819	1,714	2	0,374	0,371	0,428
3	1,816	1,858	1,642	3	0,404	0,389	0,394
4	1,746	1,798	1,567	4	0,398	0,372	0,418
5	1,764	1,730	1,613	5	0,423	0,412	0,463
6	1,751	1,618	1,700	6	0,402	0,371	0,475
7	1,774	1,639	1,695	7	0,410	0,417	0,553
8	1,823	1,696	1,736	8	0,348	0,330	0,476
9	1,763	1,626	1,492	9	0,354	0,375	0,450
10	1,854	1,746	1,517	10	0,380	0,349	0,446
Média	1,787	1,718	1,632	Média	0,386	0,376	0,455
DP	0,033	0,082	0,080	DP	0,024	0,025	0,041
CV	1,86%	4,75%	4,90%	CV	6,15%	6,57%	8,93%

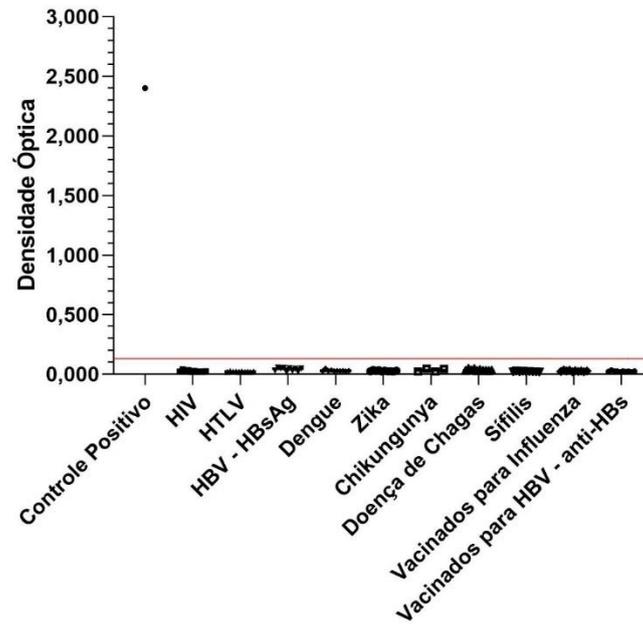
Fonte: Elaborado pela autora.

Com o teste acima, conclui-se que todos os três lotes possuem boa variação, abaixo de 20%. Para as amostras de soro e plasma, houve uma pequena diferença entre a variação do lote 1 para os outros dois lotes; porém, não foi observada essa diferença para as amostras de DBS. Entretanto, essa diferença não impacta na validação do ensaio, visto que a média da amostra foi muito próxima em todos os lotes.

6.3.5 Reatividade cruzada

No estudo de reatividade cruzada, foram testadas amostras negativas para anticorpos anti-HCV, mas positivas para outras infecções. O Gráfico 2 e o Gráfico 3 mostram os dados de reatividade cruzada para soro/plasma e DBS, respectivamente.

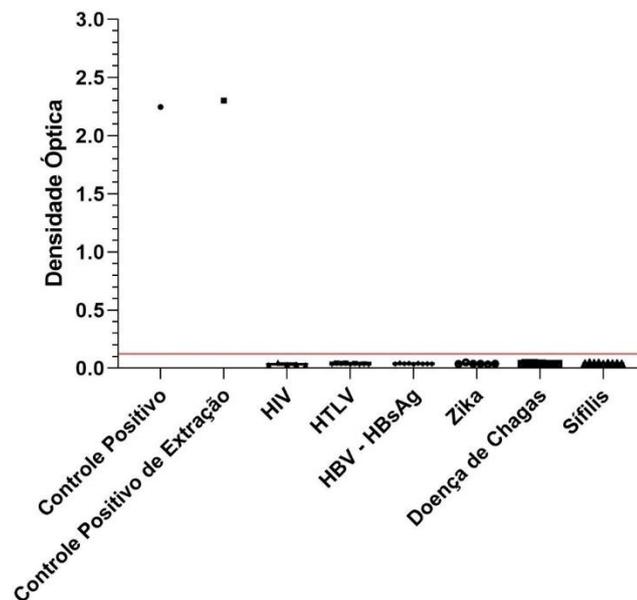
Gráfico 2 – Ensaio de reatividade cruzada com amostras de soro e plasma.



Dispersão das amostras no ensaio de reatividade cruzada. A linha vermelha representa o cut-off do ELISA desenvolvido.

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 3 – Ensaio de reatividade cruzada com amostras de DBS.



Dispersão das amostras no ensaio de reatividade cruzada. A linha vermelha representa o cut-off do ELISA desenvolvido.

Fonte: Elaborado pela autora.

Não foi encontrada nenhuma amostra com reatividade positiva no kit desenvolvido com as amostras utilizadas, demonstrando assim a especificidade do teste para amostras de indivíduos com anticorpos anti-HCV.

6.4 Validação do ensaio imunocromatográfico

6.4.1 Sensibilidade e especificidade

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos com as amostras no ensaio desenvolvido.

Tabela 12 – Amostras de soro e plasma – teste rápido.

	Referência		Total
	Positivas	Negativas	
Teste rápido desenvolvido	Positivas	60	60
	Negativas	0	30
Total	60	30	90

Fonte: Elaborado pela autora.

Sensibilidade: >99,9% - CI 95%: 94,0% - 100,0%

Especificidade: >99,9% - CI 95%: 88,4% - 100,0%

VPP: 99,51%

VPN: 99,99%

6.5 Comparativo de sensibilidade analítica entre os métodos

O comparativo de sensibilidade analítica foi feito através da testagem de uma diluição seriada de uma amostra tanto em soro, quanto em sangue. As amostras sangue foram analisadas no ELISA no formato de amostras de DBS. Para a classificação clínica das diluições, foi tomado como referência o resultado obtido na testagem do soro na metodologia de ELISA. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos com as amostras no ensaio desenvolvido.

Tabela 13 – Sensibilidade analítica comparada entre as metodologias.

Diluição	ELISA (Soro) - Referência		Teste Rápido		ELISA (DBS)	
	Índice	Resultado	Soro	Sangue	Índice	Resultado
1:2	7,4	Positivo	Positivo	Positivo	11,0	Positivo
1:4	10,5	Positivo	Positivo	Positivo	7,7	Positivo
1:8	13,1	Positivo	Positivo	Positivo	5,8	Positivo
1:16	11,8	Positivo	Positivo	Positivo	3,9	Positivo
1:32	12,2	Positivo	Positivo	Positivo	3,0	Positivo
1:64	7,8	Positivo	Positivo	Positivo	1,9	Positivo
1:128	4,0	Positivo	Positivo	Positivo	1,2	Positivo
1:256	2,3	Positivo	Positivo	Positivo	0,9	Indeterminado
1:512	1,4	Positivo	Positivo	Negativo	0,6	Negativo
1:1024	0,7	Negativo	Negativo	Negativo	0,4	Negativo

Fonte: Elaborado pela autora.

Para a análise comparativa da sensibilidade analítica, a diluição seriada da amostra foi testada em todos os ensaios desenvolvidos. O resultado obtido (positivo ou negativo) da dosagem em soro das diluições na metodologia de ELISA foi tomado como resultado de referência, ou seja, considerado como resultado esperado para todas as outras metodologias. Dessa forma, foi calculado o valor *kappa* para as metodologias de teste rápido e ELISA DBS, quando comparado o resultado obtido nessas metodologias com o resultado encontrado para o soro no ELISA. Conforme demonstrando na tabela acima, para o teste rápido utilizando-se de amostras de soro, todas as diluições da amostra resultaram na mesma classificação clínica que o obtido no soro em ELISA, obtendo-se um *kappa* calculado de 1,0, representando uma concordância perfeita de 100%. Para as amostras de sangue na mesma metodologia, uma diluição detectada como positiva no ELISA em soro foi classificada como negativa (1:512), levando a um *kappa* de 0,61, o que representa uma boa concordância de 90%. Já para as amostras de DBS, testadas no ELISA, duas diluições (1:256 e 1:512) tiveram um resultado discordante quando comparado à diluição testada em soro em ELISA. Assim, para as amostras de DBS, o *kappa* calculado foi de 0,41, representando uma concordância regular de 80%.

7 DISCUSSÃO

A escolha dos antígenos tanto no teste de ELISA quanto no teste rápido desenvolvidos neste trabalho caracteriza os ensaios como de terceira geração. De acordo com a literatura, essa geração de imunoenaios possui excelente especificidade e sensibilidade e foi capaz de diminuir consideravelmente a janela imunológica para a detecção de anticorpos anti-HCV para 7 a 8 semanas, quando comparado com os imunoenaios de gerações anteriores (Marwaha e Sachdev, 2014; Warkad *et al.*, 2019).

Ambas as metodologias desenvolvidas possuem como característica principal serem do tipo sanduíche. Os imunoenaios sanduíche do tipo duplo-antígeno possuem como vantagem o aumento na especificidade do teste, visto que uma “dupla seleção” é realizada no anticorpo presente na amostra, que deve se ligar de forma específica tanto do antígeno imobilizado na microplaca/nitrocelulose quanto no antígeno presente no conjugado. Por não selecionar o isotipo de anticorpo, podendo detectar tanto IgM quanto IgG, a sensibilidade do teste também pode ser aumentada nesse tipo de ensaio (He *et al.*, 2011).

O teste rápido padronizado possui como principal diferencial a utilização de uma proteína acopladora como parte do processo de conjugação. Geralmente, no desenvolvimento de técnicas imunocromatográficas, o método de conjugação escolhido é a adsorção física das moléculas de detecção (no caso, o antígeno de HCV), diretamente na superfície na nanopartícula de ouro coloidal. Entretanto, esse tipo de conjugação pode levar a resultados errôneos, devido à orientação aleatória do antígeno no ouro coloidal, levando ao bloqueio dos locais de ligação aos anticorpos e, conseqüentemente, diminuição da sensibilidade (Mirica *et al.*, 2022; Omidfar, Riahi e Kashanian, 2023). Dessa forma, a conjugação de forma orientada do elemento de detecção é uma estratégia para melhorar a performance do ensaio e garantir uma boa sensibilidade analítica. Utilizando-se de um antígeno marcado com uma *tag*, a utilização de um anticorpo anti-*tag* para intermediar a conjugação do antígeno ao ouro coloidal favorece a manutenção da conformação do antígeno, garantindo a exposição de todos os seus epítomos para o reconhecimento pelos anticorpos da amostra.

Ainda, o teste de ELISA desenvolvido possui como característica o ensaio sanduíche com detecção e amplificação de sinal pelo sistema biotina-estreptavidina. O sistema biotina-estreptavidina também é utilizado para o aumento da sensibilidade, através da amplificação de sinal. Esse fenômeno acontece de dois jeitos: múltipla biotilação do antígeno de captura, possibilitando a ligação de mais de uma estreptavidina a uma molécula de antígeno, e múltipla conjugação da estreptavidina com a enzima HRP, aumentando o sinal gerado pelo aumento da degradação do substrato e, conseqüentemente, aumento na intensidade da cor (Diamandis e Christopoulos, 1991).

Com a falta de padronização dos fabricantes de kits de diagnóstico para a utilização de sangue impregnado em papel de filtro, os laboratórios que utilizam esse tipo de amostra frequentemente têm que validar o seu próprio procedimento de extração e testagem desse tipo de amostra, tendo que alterar o cut-off estipulado pelo fabricante, aumentando a variação entre laboratórios (WHO, 2017b; Vázquez-Morón *et al.*, 2019). O teste desse estudo foi padronizado com o cálculo de cut-off utilizando a mesma referência tanto para amostras de soro quanto para amostras de DBS, facilitando a utilização e análise do ensaio para o consumidor final, sem a necessidade de padronização *in house* e manipulação do cut-off para as amostras de DBS.

Os imunoenaios desenvolvidos apresentaram excelente sensibilidade e especificidade clínicas (>99,9%) tanto para as amostras de soro e plasma (no caso do ELISA e teste rápido), através da testagem de amostras sabidamente positivas e negativas para HCV. Ao comparar a sensibilidade analítica dos métodos com a metodologia de referência (dosagem em soro por ELISA) através de uma diluição seriada de amostra, foi observado que mesmo com a utilização de um volume diminuído de amostra no ensaio de DBS, não houve a perda significativa de sensibilidade (índice *kappa* associado regular). Isso ocorreu mesmo com a utilização de amostras de soro diluídas em sangue de carneiro, possivelmente pela união do tipo de ensaio sanduíche e pela amplificação de sinal pela biotina-estreptavidina. Ainda, para o teste rápido, foi observado um índice *kappa* satisfatório classificado como perfeito e bom para as amostras de soro e sangue, respectivamente. Ambos os

testes com soro/plasma e DBS demonstraram alta especificidade, sem influência do tipo de amostra utilizado e da presença de outras infecções (reatividade cruzada).

Entretanto, como foi observada uma pequena variação de sensibilidade analítica entre as metodologias, um estudo robusto com amostras de soro e DBS positivas, coletadas no mesmo momento e com baixos níveis de anticorpos anti-HCV deve ser realizado, a fim de se confirmar que não há a perda de diagnóstico ao se utilizar amostras de DBS ou a metodologia de imunocromatografia para o diagnóstico de infecções por HCV. Um estudo de soroconversão também pode ser interessante, a fim de se verificar a janela imunológica para a detecção de anticorpos anti-HCV após a infecção tanto para as amostras de soro/plasma quanto para as amostras de DBS. Esse estudo pode ser feito por meio do acompanhamento de indivíduos com risco aumentando para se contrair o vírus do HCV, como aqueles que moram em zonas endêmicas (Fukuizumi *et al.*, 1997), usuários de drogas (Anagnostou *et al.*, 2023) e indivíduos submetidos à hemodiálise (Dharmesti, Wibawa e Kandarini, 2022), e comparar o tempo em dias pós-infecção que os ensaios são capazes de detectar a presença de anticorpos anti-HCV, em comparação com outros produtos disponível no mercado. Além disso, já existem painéis comerciais para se avaliar a sensibilidade analítica de um produto em relação à soroconversão de indivíduos que contraíram o vírus.

A análise da precisão do ensaio é realizada através dos estudos de repetibilidade, reprodutibilidade e interensaio, dados em valores de coeficiente de variação. Segundo a literatura, esses parâmetros devem apresentar um CV menor que 10-15% (Growter, 2001; Minic e Zivkovic, 2020). Entretanto, para valores muito baixos como os encontrados para as amostras negativas, o CV possui um valor aumentado mesmo em pequenas alterações. Portanto, foi estipulado um CV máximo de 20% para todas as análises. Nas amostras positivas, os ensaios de precisão resultaram em um CV ótimo entre 1,86% e 8,93%. Já nas amostras negativas, o CV resultante esteve entre 11,66% e 18,51%, dentro dos limites estabelecidos e sem impacto na classificação da amostra como positiva ou negativa.

A infecção pelo vírus da hepatite C é uma condição que afeta um grande número de

peças, onde sua cronificação afeta de forma significativa a qualidade de vida dos indivíduos, levando a consequências graves para a sua saúde. Para que o manejo clínico da doença seja efetivo a fim de se promover o tratamento e a cura da infecção, as ferramentas disponíveis para o diagnóstico confiável da doença devem ser fortalecidas. Entretanto, a hepatite C possui peculiaridades que dificultam uma triagem efetiva: a grande maioria dos portadores crônicos não são cientes de sua condição e a doença afeta em maior número as pessoas em situação de vulnerabilidade, como os usuários de drogas, encarcerados, imigrantes e indivíduos que trabalham com prostituição, os quais, em geral, possuem pouco ou nenhum acesso aos serviços de saúde ou não são propensos a divulgar sua condição (WHO, 2017b; Chevaliez, 2019). As metodologias convencionais para a testagem do HCV, apesar de serem bem estabelecidas, possuem diversas lacunas que impedem o amplo diagnóstico da hepatite C, especialmente nas populações de risco. Elas possuem a necessidade de punção venosa, infraestrutura laboratorial e armazenamento das amostras em refrigeração ou congelamento, o que dificulta o alcance das populações vulneráveis e em locais de acesso remoto. Ainda, a necessidade de várias visitas aos centros de saúde para a primeira consulta, coleta de sangue para triagem, retorno para o resultado, segunda coleta para confirmação e consulta para encaminhamento de tratamento é uma causa de perdas desses indivíduos durante o atendimento (Grebely *et al.*, 2017; Terrault, 2019). Dessa forma, o desenvolvimento de opções que ampliem o acesso aos testes e diminuam os desafios no alcance dos indivíduos alvo, como o *point-of-care* e as amostras de DBS, são questões que podem ser investigadas e colocadas em prática.

As amostras de DBS dispensam a venopunção, sendo necessária apenas a punção digital para a impregnação do papel de filtro com a amostra a ser analisada. Além disso, uma única coleta pode ser utilizada tanto para a triagem de anticorpos anti-HCV quanto para a confirmação de RNA viral pelos ensaios moleculares, além do diagnóstico de outros patógenos relacionados, como o HIV e o HBV. Apesar de ainda necessitarem de envio a laboratórios centralizados para a realização dos testes (facilitado pela estabilidade a temperatura ambiente), as DBS aumentam a adesão à triagem para hepatite C pela facilidade de coleta, armazenamento e transporte da amostra, útil na triagem de grandes populações e de indivíduos de difícil acesso

(Coats e Dillon, 2015; Grebely *et al.* 2017; WHO, 2017b). Assim como as amostras de DBS, os testes POC dispensam a necessidade inicial da punção venosa para a realização do exame, sendo bem tolerado pelas populações alvo de triagem, como os usuários de drogas. (Bajis *et al.*, 2018; Chevaliez, 2019). Dessa forma, ambas as metodologias desenvolvidas podem ser utilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para ampliar a testagem para hepatite C nas populações-alvo.

A estratégia de testagem POC ainda conta com a possibilidade autotestagem, ou seja, na utilização de testes rápidos em que o próprio indivíduo faz a coleta de sangue capilar e realiza seu teste. Esse método já possui diretrizes e recomendações da Organização Mundial da Saúde, publicados em 2021. A própria OMS coordenou estudos de validação da autotestagem na China, Egito, Georgia, Quênia, Paquistão, Ruanda e Vietnã, onde demonstrou que essa estratégia é altamente aceitável pela população devido a sua facilidade, o que aumenta a adesão da triagem para a hepatite C. Ainda, podem ser distribuídos em locais de fácil acesso à população alvo, como centros de saúde primária, farmácias, clínicas de reabilitação, durante campanhas de conscientização ou ainda diretamente no domicílio, através de serviços de entrega. Entretanto, esse método ainda requer o acompanhamento por profissionais de saúde principalmente na conscientização da população, visto que erros na manipulação dos testes podem ocorrer, a confirmação por testes moleculares ainda é necessária (sendo o próprio indivíduo o responsável pela procura) e a vigilância dos casos positivos deve ser reforçada a fim de fornecer o tratamento adequado (WHO, 2021). Entretanto, para que a autotestagem para HCV seja uma realidade no Brasil, assim como foi para COVID-19 durante a pandemia, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) deve regulamentar e aprovar o seu uso no país.

Ainda que testes com as mesmas metodologias são disponíveis comercialmente para a compra pelos laboratórios brasileiros, os mesmos são importados aumentando-se o custo do diagnóstico. Dessa forma, o desenvolvimento, fabricação e disponibilização comercial desses testes no Brasil possui diversas vantagens. Pode-se listar a melhor gestão da qualidade, aumento da disponibilidade de testes, distribuição mais ágil e simplificada dos produtos e diminuição dos custos de transporte (WHO, 2012).

8 CONCLUSÃO

Foi padronizado um teste de imunoensaio enzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos totais anti-HCV através da metodologia duplo antígeno, ou sanduíche, com amplificação de sinal com a utilização de estreptavidina conjugada à peroxidase. O ensaio foi desenvolvido para a utilização de amostras de soro, plasma e DBS, apresentando ótima sensibilidade de >99,99% e especificidade de >99,99% para todas as amostras. Também não foi observada reatividade cruzada com outros interferentes em amostras sabidamente positivas para outros patógenos ou vacinados para outras doenças. Ainda, foi desenvolvido um teste rápido de metodologia semelhante para utilização em amostras de soro, plasma e sangue, com ótimas sensibilidade e especificidade (>99,99% para ambos). A sensibilidade analítica encontrada em todos os testes foi satisfatória, independentemente do tipo de amostra utilizado (soro, plasma, sangue ou DBS).

Os testes de diagnóstico para hepatite C desenvolvidos poderão vir a ser utilizados na prática clínica, beneficiando o diagnóstico e tratamento da infecção. Ainda, os testes desenvolvidos poderão ser utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para amplo uso no controle da Hepatite C.

REFERÊNCIAS

- ALTER, M. J. HCV Routes of Transmission: What Goes Around Comes Around. **Seminars in Liver Disease**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 340-346, 2011.
- ALTER, H. J. *et al.* Clinical and Serological Analysis of Transfusion-Associated Hepatitis. **The Lancet**, Londres, v. 306, n. 7940, p. 838-841, 1 nov. 1975.
- ALTER, H. J. *et al.* Transmissible Agent in Non-a, Non-B Hepatitis. **The Lancet**, Londres, v. 311, n. 8062, p. 459-463, 4 mar. 1978.
- ANAGNOSTOU, O. Anti-HCV testing acceptance and seroconversion rates among people who use drugs and are under opiate substitution treatment (Hippocrates Epidemic Detection System). In: 17th World Congress on Public Health, 2032, Roma.
- ANSALDI, F. *et al.* Hepatitis C Virus in the New Era: Perspectives in Epidemiology, Prevention, Diagnostics and Predictors of Response to Therapy. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 29, p. 9633-9652, 7 ago. 2014.
- ASHFAQ, U. A. *et al.* An Overview of HCV Molecular Biology, Replications and Immune Responses. **Virology Journal**, [s. l.], v. 8, n. 161, 2011.
- BAJIS, S. *et al.* Acceptability and preferences of point-of-care finger-stick whole-blood and venepuncture hepatitis C virus testing among people who inject drugs in Australia. **International Journal of Drug Policy**, [s. l.], v. 61, p. 61-63, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Coleta de Sangue – Diagnóstico e Monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais**. Distrito Federal: Virtual Publicidade Ltda, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. Distrito Federal, 2018a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de Eliminação da Hepatite C no Brasil**. Distrito Federal, 2018b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Distrito Federal, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais**. Distrito Federal, 2020.
- CHEVALIEZ, S. Strategies for the Improvement of HCV Testing and Diagnosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 341-347, 2019.
- CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 35-40, 2006.

COATS, J. T.; DILLON, J. F. The effect of introducing point-of-care or dried blood spot analysis on the uptake of hepatitis C virus testing in high-risk populations: A systematic review of the literature. **International Journal of Drug Policy**, [s. l.], v. 26, p. 1050-1055, 2015.

CONSTANCIO, N. S. *et al.* Hepatite C nas Unidades de Hemodiálise: diagnóstico e abordagem terapêutica. **Brazilian Journal of Nefrology**, [s.l.], v. 41, n. 4, p. 539-549, 2019.

DHARMESTI, N. W.; WIBAWA, I. D. N.; KANDARINI, Y. Hepatitis C Seroconversion Remains High among Patients with Regular Hemodialysis: Study of Associated Risk Factors. **International Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 2022, 2022.

DIAMANDIS, E. P.; CHRISTOPOULOS, T. K. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Application in Biotechnology. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 625-636, 1991.

DONG, J. *et al.* Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. **Kona**, [s. l.], v. 10, n. 37, p. 224-232.

DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Virology and Cell Biology of the Hepatitis C Virus Life Cycle – An Update. **Journal of Hepatology Update: Hepatitis C**, [s. l.], v. 61, p. S3-S13, 2014.

DUBUISSON, J.; PENIN, F.; MORADPOUR, D. Interactions of Hepatitis C Virus Proteins with Host Cell Membranes and Lipids. **TRENDS in Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 517-523, nov. 2002.

DUNCAN, J. D. *et al.* Hepatitis C Virus Vaccine: Challenges and Prospects. **Vaccines**, [s.l.], v. 8, n. 90, 2020.

ECONOLAB. **Placa ELISA em tiras high binding Corning Ref. 2592**. Disponível em: econolab.com.br/produto/placa-elisa-em-tiras-high-binding-corning-ref-2592-copia/. Acesso em: 29 jun. 2023.

FLORES, G. L. *et al.* Dried blood spot sampling as an alternative for the improvement of hepatitis B and C diagnosis in key populations. **World Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 504-514, 27 abr. 2021.

FUKUIZUMI, K. *et al.* Hepatitis C Virus Seroconversion Rate in a Hyperendemic Area of HCV in Japan: A Prospective Study. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 4, 1997.

GRASSI, G. *et al.* Hepatitis C Virus Relies on Lipoprotein for Its Life Cycle. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1935-1965, 14 fev. 2016.

GREBELY, J. *et al.* Hepatitis C point-of-care diagnostics: in search of a single visit diagnosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1109-1115, 2017.

GROWTHER, J. R. Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases. In: _____ . **The ELISA Guidebook**. v. 149. Nova Jersey: Humana Press, 2001. p. 301-394.

HE, J. *et al.* Double-Antigen Sandwich ELISA for the Detection of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 171, p. 163-168, 2011.

HOUGHTON, M. Discovery of the Hepatitis C Virus. **Liver International**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 82-88, 2009.

HU, W. *et al.* Hepatitis C: Milestones from Discovery to Clinical Cure. **Military Medical Research**, [s. l.], v. 7, n. 59, 2020.

JACKOWIAK, P. *et al.* Phylogeny and Molecular Evolution of the Hepatitis C Virus. **Infections, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 21, p. 67-82, 2014.

KIM, C. W.; CHANG, K. Hepatitis C Virus: Virology and Life Cycle. **Clinical and Molecular Hepatology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 17-25, 2013.

LIANG, T. J. Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 869-878, 2013.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The Ins and Outs of Hepatitis C Virus Entry and Assembly. **Nature Review Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 688-700, out. 2013.

MANNS, M. P. *et al.* Hepatitis C Virus Infection. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, n. 17006, 2017.

MARCOTRIGIANO, J.; CATANESE, M. T. Hepatitis C Virus Genotypes and Their Evolution. In: MIYAMURA, T. *et al.* **Hepatitis C Virus I: Cellular and Molecular Virology**. Japão: Springer, 2016. p. 15-29.

MATHEW, B. C.; BIJU, R.S.; THAPALIA, N. An overview of electrochemiluminescent (ECL) technology in laboratory investigations. **Kathmandu University Medical Journal**, [s.l.], v. 3, n. 11, p. 91-93, 2005.

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

MARWAHA, N.; SACHDEV, S. Current Testing Strategies for Hepatitis C Virus Infection in Blood Donor and the Way Forward. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 2948-295, 21 mar. 2014.

MERCK MILLIPORE. Rapid Lateral Flow Test Strips: **Considerations for Product Development**. 2013.

MESSINA, K. P. *et al.* Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 77-87, 2015.

MINIC, R. ZIVKOVIC, I. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. **Intech Open**. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/optimization-validation-and-standardization-of-elisa>. Acesso em: 30 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. RDC Nº 786, de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mai. 2023. Seção 1, p. 161.

MIRICA, A. C. *et al.* Latest Trends in Lateral Flox Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, 2022.

MOROZOV, V. A.; LAGAYE. S. Hepatitis C Virus: Morphogenesis, Infection and Therapy. **World Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 186-212, 27 fev. 2018.

NIQUINI, R. P. *et al.* Persistently high hepatitis C rates in haemodialysis patients in Brazil [a systematic review and meta-analysis]. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 12, n. 330, 2022.

OMIDFAR, K.; RIAHI, F.; KASHANIAN, S. Lateral Flow Assay: A Summary of recente Progress for Improving Assay Performance. **Biosensors**, [s. l.], v. 13, n. 837, 2023.

PARK, S. H. REHERMANN, B. Immune Response to HCV and Other Hepatitis C Viruses. **Immunity**, v. 40, p. 13-24, 16 jan. 2014.

PAROLO, C. *et al.* Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. **Nature Protocols**, v. 15, nov. 2020.

POL, S.; LAGAYE, S. The Remarkable History of the Hepatitis C Virus. **Genes and Immunity**, [s. l.], v. 20, p. 436-446, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41435-019-0066-z>. Acesso em: 05 jul. 2023.

PONDÉ, R. A. A. Enzyme-linked immunosorbent/chemiluminescence assays, recombinant immunoblot assays and nucleic acid tests in the diagnosis of HCV infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 32, p. 985-988, 2013.

PRECIADO, M. V. *et al.* Hepatitis C Virus Molecular Evolution: Transmission, Disease Progression and Antiviral Therapy. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 43, p. 15992-16013, 21 nov. 2014.

RABAAN, A. A. *et al.* Overview of Hepatitis C Infection, Molecular Biology, and New Treatment. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], v. 13, p. 773-783, 2020.

REHERMANN, B. Hepatitis C Virus Versus Innate and Adaptive Immune Responses: A Tale of Coevolution and Coexistence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1745-1754, 2009.

RICE C. M. *et al.* Transmission of Hepatitis C by Intrahepatic Inoculation with Transcribed RNA. **Science**, Washington DC, v. 277, p. 570-574, 25 jul. 1997.

SAJID, M.; KAWDE, A. N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, [s.l.], v. 19, p. 689-705, 2015.

SILVA, A. F.; VELO, M. M. A. C.; PEREIRA, A. C. Importância da reprodutibilidade dos métodos para diagnóstico em odontologia. **RFO**, Passo Fundo, v. 21, n. 1, p. 115-120, jan./abr. 2016.

SIMMONDS, P. The Origin of Hepatitis C Virus. In: BARTENSCHLAGER, R. **Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy**. Berlim: Springer-Verlag, 2013. p. 1-15.

SIMMONDS, P. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 98, p. 2-3, 2017.

SHIN-I, T.; SUGIYAMA, M.; MIZOKAMI, M. Hepatitis C Virus Genotype and Their Evolution. In: MIYAMURA, T. *et al.* **Hepatitis C Virus I: Cellular and Molecular Virology. Japão**: Springer, 2016. p. 15-29.

SMITH, D. B. *et al.* Proposed Update to the Taxonomy of the Genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae Family. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 97, p. 2894-2907, 2016.

SOTNIKOV, D. V.; ZHERDEV, A. V.; DZANTIEV, B. B. Lateral Flow Serodiagnosis in the Double-Antigen Sandwich Format: Theoretical Consideration and Confirmation of Advantages. **Sensors**, [s. l.], v. 21, n. 39, 2021.

STRATECH. **Lateral Flow Assay Development Guide**, v. 1. 2016

STASI, C.; SILVESTRI, C.; VOLLER, F. Update on Hepatitis C Epidemiology: Unaware and Untreated Infected Population Could Be the Key to Elimination. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, [s. l.], v. 2, p. 2808-2815, 2020.

SUKUMARAN, A. *et al.* Development and Troubleshooting in Lateral Flow Immunochromatography Assays. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 2, p. 208-212, abr.-jun. 2021.

STUART, J. D.; SALINAS, E. GRAKOU, A. Immune system control of hepatitis C virus infection. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 46, p. 36-44, 2021.

TERRAULT, N. A. Hepatitis C elimination: challenges with under-diagnosis and under-treatment. **F1000 Research**, [s. l.], v. 8, n. 54, 2019.

VÁZQUEZ-MORÓN, S. *et al.* Evaluation of the Diagnostic Accuracy of Laboratory-Based Screening for Hepatitis C in Dried Blood Spot Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 7316, 2019.

WARKAD, S. D. *et al.* Developments in the HCV Screening Technologies Based on the Detection of Antigens and Antibodies. **Sensors**, [s. l.], v. 19, n. 4257, 2019.

WHO World Health Organization. **Local Production and Technology Transfer to Increase Access to Medical Devices: Addressing the barriers and challenges in low- and middle-income countries**. Geneva, 2012.

WHO World Health Organization. **Combating Hepatitis B and C to Reach Elimination by 2030**. Geneva, 2016.

WHO World Health Organization. **Global Hepatitis Report**. Geneva, 2017a.

WHO World Health Organization. **Guidelines on Hepatitis B and C Testing**. Geneva, 2017b.

WHO World Health Organization. **Recommendations and Guidance on Hepatitis C Virus Self-Testing**. Geneva, 2021.

WRENSCH, F. *et al.* Hepatitis C Virus (HCV) – Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 1436, 21 jun. 2018.