

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CAMILLE PETRUCCIO URAGO BRANDÃO

ADAPTAÇÃO DE MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS DE DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C PARA USO EM AMOSTRAS DE SANGUE COLETADO EM PAPEL DE FILTRO

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

RIO DE JANEIRO
2011

Ficha catalográfica elaborada pela

Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

Brandão, Camille Petruccio Urago

Adaptação de métodos imunoenzimáticos de diagnóstico da hepatite C para uso com amostras de sangue coletado em papel de filtro. / Camille Petruccio Urago Brandão – Rio de Janeiro, 2011.

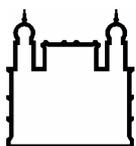
xxi, 105f. il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.

Bibliografia:: 77-87

1. Hepatite C. 2. Diagnóstico. 3. Sangue coletado em papel de filtro. I. Título.

Trabalho realizado no Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Livia Melo Villar e do Prof. Dr. José Antônio Sá Ferreira.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CAMILLE PETRUCCIO URAGO BRANDÃO

**ADAPTAÇÃO DE MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS DE DIAGNÓSTICO
DA HEPATITE C PARA USO EM AMOSTRAS DE SANGUE COLETADO
EM PAPEL DE FILTRO**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Livia Melo Villar

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Antônio Sá Ferreira

Dissertação aprovada em 5 de outubro de 2011.

Examinadores:

Prof^o Dr. Adilson José de Almeida

UNIRIO / Presidente

Prof^o Dra. Glória Regina da Silva e Sá

FIOCRUZ / Bio-Manguinhos

Prof^o Dra. Vanessa Salette de Paula

FIOCRUZ / IOC

RIO DE JANEIRO

2011

Dedico o meu trabalho:

Ao meu amado marido Rodney que suportou os momentos difíceis ao meu lado sempre me encorajando a seguir em frente.

A minha filha pequenina Beatriz que nasceu junto deste trabalho e definitivamente mudou para sempre a minha vida.

As minhas enteadas Jaqueline e Patrícia que me apoiaram em todos os momentos.

Aos meus pais Marco e Mariza, aos meus irmãos Kátia e Marcus Vinicius, e minha avó Hilda cuja ajuda e compreensão incondicional foram imprescindíveis para o sucesso deste trabalho.

Aos meus cunhados Sully e Marina e minhas sobrinhas / afilhada Giovanna e Manuela que incentivaram com muita alegria.

AGRADECIMENTO

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos e a Coordenação, os funcionários e os professores do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos - MPTI pela oportunidade ímpar de crescimento profissional.

Ao meu grande amigo Michel Vergne Sucupira, ao Dr. Renato S. Marchevsky, ao Dr. Antonio Gomes Pinto Ferreira pela apresentação e incentivo ao ingresso no curso.

Aos meus orientadores Dr^a. Livia Melo Villar e Dr. José Antônio Sá Ferreira pelo acolhimento, orientação, compreensão e carinho com que transmitiram os seus conhecimentos fundamentais para o meu aprimoramento profissional e desenvolvimento desta dissertação.

À Dra. Maria Tereza Machado de Paula, Dra. Izabel Maria de Siqueira e toda a equipe do Serviço de Hemoterapia do Hospital Federal dos Servidores do Estado que acreditaram e permitiram o desenvolvimento deste estudo, em especial, minhas amigas e companheiras de trabalho, Erica Lopes, Luana Xavier e Sabrina Alberti, que me incentivaram e cuidaram do trabalho na minha ausência para que o ingresso e a manutenção do curso de mestrado fossem possíveis.

À Dra Elisabeth Lampe e a toda equipe do Laboratório de Hepatites Virais, em especial: Juliana Custódio, Elisângela Ferreira e Jaqueline Correia que me deram todo suporte para o desenvolvimento dos experimentos.

À Brunna Marques que compartilhou comigo todas as atividades e os desafios desse projeto.

Aos voluntários do Hospital Federal dos Servidores do Estado, do Ambulatório de Hepatites Virais da Fiocruz, Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ, e do Hospital Privado de Petrópolis que participaram desse projeto.

Aos revisores e a banca examinadora, em especial a Dr^a. Vanessa de Paula, ao Dr. Adilson José de Almeida e a Dr^a. Glória da Silva e Sá, pelas sugestões e críticas construtivas.

A todos os meus companheiros de turma pela união e superação dos inúmeros desafios.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais.”

“Mas, se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.”

“NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS.”

Augusto Cury

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | x |
| LISTA DE TABELAS E QUADROS | xiv |
| LISTA DE FIGURAS | xvii |
| RESUMO | xx |
| 1- INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1- Histórico | 1 |
| 1.2- Estrutura do vírus e entrada do HCV na célula hospedeira | 2 |
| 1.3- Organização do genoma viral | 4 |
| 1.4- Estrutura e função das proteínas virais | 6 |
| 1.4.1- Proteínas estruturais | 6 |
| 1.4.2- Proteínas não-estruturais | 7 |
| 1.5- Diversidade genética | 8 |
| 1.6- Aspectos clínicos | 8 |
| 1.7- Epidemiologia | 9 |
| 1.8- Diagnóstico | 17 |
| 1.9- Uso de amostras de sangue coletado em papel de filtro | 19 |
| 2- OBJETIVOS | 22 |
| 2.1- Geral | 22 |
| 2.2- Específicos | 22 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.1- Desenho do estudo | 23 |
| 3.2- Amostra populacional | 23 |
| 3.3- Coleta e preparo das amostras biológicas | 25 |
| 3.4- Ensaio imunoenzimático | 27 |
| 3.5- Testes de detecção de anticorpos anti-HCV | 28 |
| 3.5.1- Princípio dos testes de detecção de anticorpos anti-HCV | 28 |
| 3.5.2- Procedimento dos testes de detecção de anticorpos anti-HCV | 28 |
| 3.5.2.1- Teste HCV Ab..... | 28 |
| 3.5.2.1.a- Interpretação dos resultados: | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.2.2- Teste ETI-AB-HCVK-4 | 30 |
| 3.5.2.2.a- Interpretação dos resultados: | 32 |
| 3.6- Teste de detecção simultânea de anticorpos anti-HCV e antígeno do HCV | 32 |
| 3.6.1- Princípio dos testes de detecção silmutânea de anticorpos anti-HCV e antígeno do HCV | 32 |
| 3.6.2- Procedimento dos testes de detecção simultânea de anticorpos anti-HCV e antígenos do HCV | 35 |
| 3.6.2.1- Teste Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA | 35 |
| 3.6.2.1.a- Interpretação dos resultados: | 37 |
| 3.6.2.2- Teste Murex HCV Ag/Ac Combination..... | 37 |
| 3.6.2.2.a- Interpretação dos resultados: | 39 |
| 3.7- Parâmetros avaliados para os testes de diagnóstico da infecção pelo HCV em SCPF | 39 |
| 3.7.1- Padronização do tampão de eluição da amostra..... | 40 |
| 3.7.2- Padronização do volume de amostra empregado no teste..... | 40 |
| 3.7.3- Padronização do tempo de incubação da amostra..... | 41 |
| 3.7.4- Padronização do volume de conjugado empregado no teste..... | 42 |
| 3.7.5- Cálculo do valor de ponto de corte do ensaio | 42 |
| 3.8- Avaliação do desempenho do teste..... | 43 |
| 3.8.1- Limite de detecção da amostra de SCPF..... | 44 |
| 3.8.2- Precisão da amostra de SCPF..... | 44 |
| 3.9- Estabilidade da amostra de sangue coletado em papel de filtro | 46 |
| 3.10- Análise dos dados | 46 |
| 4- RESULTADOS..... | 47 |
| 4.1-Amostra populacional | 47 |
| 4.2- Padronização do tampão de eluição | 48 |
| 4.3-Padronização do volume de amostra (eluato)..... | 51 |
| 4.4-Padronização do tempo de incubação | 54 |
| 4.5- Padronização do volume de conjugado | 56 |
| 4.6- Cálculo do ponto de corte | 58 |
| 4.7- Desempenho do teste | 63 |
| 4.8- Avaliação do limite de detecção | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9- Avaliação da precisão da amostra de SCPF | 66 |
| 4.10- Estabilidade da amostra de SCPF | 70 |
| 5- DISCUSSÃO | 75 |
| 6- CONCLUSÕES | 81 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |
| 8- ANEXOS | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AgAc – Antígeno e anticorpo

ALT – Alaninaminotransferase

Anti-HCV – Anticorpo contra o vírus da hepatite C.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCLIN – Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos

AST – Aspartato aminotransferase

BSA – *Bovine sera albumin* ou soro de albumina bovina

C – Capsídeo

C – Citosina

°C – Grau celsius

CLDN-1 - Claudina

CD – *Cluster of differentiation* ou diferenciação de grupo

cDNA – DNA complementar

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* ou Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CNX – Média do controle negativo

CPX – Média do controle positivo

CO – *Cut off*

CORE / C - proteínas que envolvem o genoma viral, também chamadas de capsídeo

CRE - *cis-acting replication element* ou elemento de replicação *cis-acting*

CV – Coeficiente de variação

Curva ROC – Curva característica recebida pelo operador

DBS – *Dried blood spot*

DNA - *Deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico

D.O. – Densidade ótica ou absorbância

DP – Desvio padrão

E – Envelope

EIA - *Enzyme immunoassays*

EIE – Ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

FAPERJ – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FS – Fator de significância

g – Força gravitacional

GAG - Glicosaminoglicano

GBD – *Global Burden of Disease* ou Carga Global de Doenças

γ-GT – Gama-glutamil transpeptidase

h - Hora

HA – Hepatite A

HAV – *Hepatitis A virus* ou vírus da hepatite A

HB – Hepatite B

HBV – *Hepatitis B virus* ou vírus da hepatite B

HBsAg – *Hepatitis B surface antigen* ou Antígeno de superfície da hepatite B

HCV – *Hepatitis C virus* ou Vírus da hepatite C.

HIV – *Human immunodeficiency virus* ou vírus da imunodeficiência humana

HRP – *Horseradish peroxidase* ou peroxidase de rábano

HFSE – Hospital Federal dos Servidores do Estado

IC – Intervalo de confiança

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Virus* ou Comissão Internacional de Taxonomia de Vírus

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRES – *Internal ribosome entry site* ou sítio interno de entrada de ribossomo

ISDR – *Interferon sensitivity determining region* ou região determinante da sensibilidade ao interferon

Kb – Kilobase

Kg - Kilograma

LAHEP – Laboratório de Hepatites Virais

LD – Limite de detecção

LDL - *Low-density lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade

LRNHV - Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais

M – Molar

mL – Mililitro

μL – Microlitro

min - Minuto

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MPTI – Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

MS – Ministério da Saúde

N – Normal

NaCl – Cloreto de sódio

NANB – não-A, não-B

NCR – *non codificant regions* ou região não codificante

nm – Nanômetro

nM – Nano molar

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – *Open reading frame* ou região aberta de leitura

PBS – Tampão salino-fosfato

PC – Ponto de Corte

% - Percentagem

pH – Potencial de hidrogênio

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RdRp – *RNA-dependent RNA polymerase* ou RNA polimerase dependente de RNA

RE – Retículo endoplasmático

RE – Resolução

RJ – Rio de Janeiro

RNA – *Ribonucleic acid* ou ácido ribonucléico

rpm – Rotação por minuto

SCPF – Sangue coletado em papel de filtro

SR-BI - *scavenger* classe B tipo I

TFA – *Tubule forming agent* ou agente formador de túbulo

TM - Transmembrana

TMB – Tetrametilbenzidina

TRIS - hidroximetilaminometano

U - Uracila

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VLDL – *Very-low-density lipoprotein* ou lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1.1- Prevalência regional de hepatite C em 2010 estimada com base na detecção de anti-HCV em diferentes regiões do mundo (Lavanchy 2011)..... | 11 |
| Tabela 3.1- Volumes de amostra de SCPF e de diluente da amostra usados no teste de detecção de anticorpos anti-HCV HCV Ab (Radim). | 40 |
| Tabela 3.2- Volumes de amostra de SCPF e de diluente da amostra usados no teste de detecção de anticorpos anti-HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin)..... | 41 |
| Tabela 3.3- Volumes de conjugado usados nos testes de padronização para amostras de SCPF eluídas..... | 42 |
| Tabela 4.1- Distribuição da amostra populacional estudada de acordo com faixa etária e sexo... | 48 |
| Tabela 4.2 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE HCV Ab (Radim) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes. | 49 |
| Tabela 4.3 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes. | 49 |
| Tabela 4.4 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-rad) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes. | 50 |
| Tabela 4.5 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes. | 51 |
| Tabela 4.6 Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de eluato e diluente usados no EIE HCV Ab (Radim, Itália). .. | 52 |
| Tabela 4.7- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de eluato e diluente usados no EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália)..... | 53 |
| Tabela 4.8- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de amostra e diluente usados no EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, França)..... | 53 |

| | |
|--|----|
| Tabela 4.9- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de amostra e diluente usados no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)..... | 54 |
| Tabela 4.10- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE HCV Ab (Radim, Itália). | 55 |
| Tabela 4.11- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin Itália)..... | 55 |
| Tabela 4.12- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, França). | 55 |
| Tabela 4.13- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)..... | 56 |
| Tabela 4.14- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o volume de conjugado usado no EIE HCV Ab (Radim, Itália)..... | 57 |
| Tabela 4.15- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o volume de conjugado usado no EIE HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália)..... | 57 |
| Tabela 4.16- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o volume de conjugado usado no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)..... | 57 |
| Tabela 4.17- Resultados dos valores de ponto de corte obtidos nos ensaios imunoenzimáticos comerciais anti-HCV dos fabricantes Radim e DiaSorin e HCVAg-Ac dos fabricantes Bio-Rad e Abbott. | 59 |
| Tabela 4.18- Valores padrões da qualidade do teste anti-HCV em SCPF pelo EIE HCV Ab (Radim) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados..... | 60 |
| Tabela 4.19- Valores padrões da qualidade do teste anti-HCV em SCPF pelo EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados. | 60 |
| Tabela 4.20- Valores padrões da qualidade do teste HCVAg-Ac em SCPF pelo EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Tabela 4.21- Valores padrões da qualidade do teste HCV Ag-Ac em SCPF pelo EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados. | 62 |
| Tabela 4.22- Valores dos padrões de qualidade obtidos nos testes anti-HCV e HCV Ag-Ac em amostras de SCPF..... | 63 |
| Tabela 4.23: Valores de precisão do estudo preliminar com 8 replicatas da amostra de concentração 10^1 (positivo forte)..... | 67 |
| Tabela 4.24: Valores de precisão do estudo preliminar com 8 replicatas da amostra de concentração 10^3 (positivo fraco). | 67 |
| Tabela 4.25: Avaliação do estudo de precisão intraensaio com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^1 (positivo forte). | 68 |
| Tabela 4.26: Avaliação do estudo de precisão intraensaio com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^3 (positivo fraco)..... | 68 |
| Tabela 4.27: Avaliação do estudo de precisão interensaio com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^1 (positivo forte). | 69 |
| Tabela 4.28: Avaliação do estudo de precisão interensaio -reprodutibilidade- com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^3 (positivo fraco)..... | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1- Virofera 2005: em destaque a família <i>Flaviviridae</i> do vírus da hepatite C (ICTVdB 2005)..... | 2 |
| Figura 1.2- Estrutura do capsídio viral visível (Koop 2011)..... | 3 |
| Figura 1.3- Mecanismo de entrada do HCV na célula (Budkowska 2009)..... | 4 |
| Figura 1.4- Organização do genoma do vírus da hepatite C (Moradpour et al. 2007)..... | 5 |
| Figura 1.5- Prevalência global de hepatite C em 2010 (Lavanchy 2011) | 11 |
| Figura 1.6- Taxa de detecção de hepatite C por Unidade Federativa de residência, Brasil, 2009 | 13 |
| Figura 1.7- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000) hab. segundo região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2009..... | 14 |
| Figura 1.8- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 hab.) segundo sexo por ano de notificação e razão de sexos. Brasil, 1999 a 2009..... | 14 |
| Figura 1.9- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 hab.) segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2009 | 15 |
| Figura 1.10- Distribuição percentual dos casos de hepatite C segundo definição da provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2009 | 16 |
| Figura 1.11- Distribuição percentual dos casos de hepatite C segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2009..... | 16 |
| Figura 1.12- Cinética dos marcadores sorológicos durante a fase aguda (a) e crônica (b) da infecção pelo vírus da hepatite C (Chevaliez 2010)..... | 17 |
| Figura 3.1- Coleta e preparo das amostras (Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais - LRNHV)..... | 26 |
| Figura 3.2- Procedimento de eluição do SCPF (Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais - LRNHV)..... | 27 |
| Figura 3.3- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático HCV Ab (Radim, Itália)..... | 29 |
| Figura 3.5- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália) | 31 |
| Figura 3.6- Placa de teste imunoenzimático para detecção de Ac. Anti-HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália)..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.7- Desenho esquemático do teste Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (adaptado de Bio-Rad, França)..... | 34 |
| Figura 3.8- Desenho esquemático do teste Murex HCV Ag/Ab Combination (adaptado de Abbott, África do Sul) | 35 |
| Figura 3.9- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, França) | 36 |
| Figura 3.10- Placa de teste imunoenzimático para detecção de Ag/Ac. Anti-HCV Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, Itália)..... | 37 |
| Figura 3.11- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)..... | 38 |
| Figura 3.12- Placa de teste imunoenzimático para detecção de Ag/Ac. Anti-HCV Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)..... | 39 |
| Figura 3.13- Curva característica recebida pelo operador – ROC (Adaptado de Margotto 2011) | 43 |
| Figura 4.1- Distribuição dos locais de captação de voluntários para de coleta de amostra de soro e SCPF..... | 47 |
| Figura 4.2- Gráfico obtido pela curva ROC para o teste anti-HCV (DiaSorin, Itália) | 61 |
| Figura 4.3- Gráfico obtido pela curva ROC para o teste HCV AgAc (Bio-Rad, França) | 62 |
| Figura 4.4- Comparativo dos resultados obtidos entre as amostras de soro e SCPF nos testes EIE HCV Ab (Radim) e EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) para o marcador anti-HCV, e EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) e EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) para o marcador antígeno e anticorpo anti-HCV..... | 64 |
| Figura 4.5- Resultado do teste de limite de detecção no EIE HCV Ab (Radim) | 65 |
| Figura 4.6- Resultado do teste de limite de detecção no EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin)..... | 65 |
| Figura 4.7- Resultado do teste de limite de detecção no EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad)..... | 66 |
| Figura 4.8- Resultado do teste de limite de detecção no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) | 66 |
| Figura 4.9- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Radim (Itália). | 70 |
| Figura 4.10- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Radim (Itália). | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.11- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante DiaSorin (Itália). | 71 |
| Figura 4.12- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante DiaSorin (Itália). | 72 |
| Figura 4.13- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Bio-Rad (França). ... | 72 |
| Figura 4.14- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Bio-Rad (França). ... | 73 |
| Figura 4.15- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Abbott (África do Sul). | 73 |
| Figura 4.16- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Abbott (África do Sul). | 74 |

RESUMO

O presente estudo visa à adaptação de ensaios imunoenzimáticos comerciais de diagnóstico da hepatite C para uso em amostras de sangue coletado em papel de filtro (SCPF). Foram coletadas amostras pareadas de soro e SCPF de 411 indivíduos com média de idade de 40 anos, provenientes de banco de sangue e três unidades de saúde. As amostras foram submetidas a dois ensaios imunoenzimáticos (EIEs) para detecção de anticorpos anti-HCV: HCV Ab, Radim (Itália) e ETI-AB-HCVK-4, DiaSorin (Itália); e a dois EIEs para detecção simultânea de antígeno *core* do HCV e anticorpos anti-HCV, Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA, Bio-Rad (França) e Murex HCV Ag/Ab Combination, Abbott (África do Sul). A detecção de anti-HCV e simultânea de antígeno e anticorpos anti-HCV em amostras de soro foi feita conforme recomendações dos fabricantes, e em SCPF foram avaliados os parâmetros, tampão de eluição, volumes de amostra, de diluente de amostra e de conjugado, tempo de incubação da amostra e valor do ponto de corte (PC). Após otimização desses parâmetros foram determinados os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), concordância (valor de *kappa*), limite de detecção do teste, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), precisão intraensaio e interensaio. A estabilidade das amostras de SCPF foi avaliada em diferentes condições ambientais (22-26°C, 2-8°C e -20°C). Como resultado, o tampão PBS/BSA 0,5% foi selecionado para eluição das amostras de SCPF e estabelecido um aumento no volume de amostra para todos os fabricantes. Os tempos de incubação e os volumes de conjugado seguiram a recomendação dos fabricantes. Para o EIE HCV Ab os valores determinados foram S = 97,50%, E = 99,46%, *kappa* (*k*) = 0,959, VPP = 64,59% e VPN = 99,97%, para uma prevalência de doença de 1% na população. Para o EIE ETI-AB-HCVK-4, o PC foi estabelecido pela curva *ROC* e observou-se S = 88,89%, E = 98,89%, *k* = 0,875, VPP = 44,71% e VPN = 99,89%. O PC do EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA foi obtido pela curva *ROC* e verificou-se S = 95,12%, E = 100%, *k* = 0,959, VPP = 100% e VPN = 99,95%. O PC para o EIE Murex HCV Ag/Ab Combination foi determinado pela média dos valores de densidade ótica (D.O.) das amostras de SCPF correspondentes àquelas de soro negativas no teste, acrescido de três desvios padrão proporcionando S = 78,05%, E = 99,43%, *k* = 0,838, VPP = 58,04% e VPN = 99,78%. O limite de detecção mostrou reatividade até a diluição de 1/10.000 para EIE HCV Ab e EIE ETI-AB-HCVK-4 e até 1/1.000 com EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA e EIE Murex HCV Ag/Ab Combination. Os resultados das amostras de SCPF obtiveram erro total inferior a 17% e as mesmas mantiveram-se estáveis nas diferentes condições de armazenamento por 60 dias. Os resultados obtidos nos EIE HCV ab e EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA mostraram-se mais concordantes com os observados com as amostras de soro, indicando melhor desempenho desses ensaios em amostras de SCPF.

Palavras chaves: hepatite C, diagnóstico, sangue coletado em papel de filtro.

ABSTRACT

The present study aims at adaptation of commercial enzyme immunoassays for diagnosis of hepatitis C to be used with dried blood spots (DBS). Paired serum and DBS samples from 411 individuals with mean age of 40 years, were collected at Blood Center and three out patient units. Samples were tested for the detection of anti-HCV antibodies by using two enzyme immunoassays (EIAs): HCV Ab, Radim (Italy) and ETI-AB-HCVK-4, DiaSorin (Italy); and two EIAs for the simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies: MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA, Bio-Rad (France) and Murex HCV Ag/Ab Combination, Abbott (South Africa). Anti-HCV detection and simultaneous detection of HCV core antigen and anti-HCV antibodies in serum sample were performed according to the manufacturer's recommendations. In DBS samples parameters such as elution buffer, sample, diluent, and conjugate volumes, incubation period, and cut off (CO) values were evaluated. After optimization of these parameters, values of sensitivity, specificity, inter-rater agreement (*kappa* value), detection limit, intra- and inter-assay precision were determined. Stability of DBS samples was investigated in different conditions (22-26°C, 2-8°C e -20°C). As results, PBS/BSA 0,5% buffer was chosen as elution buffer in DBS samples and an increased volume of the samples in all EIAs was established. Incubation duration and volume of conjugate were in accordance with manufacturer's recommendations. With EIA HCV Ab values sensitivity of 97,50%, specificity 99,46%, inter-rate agreement 0,959, positive predictive value 64,59%, and negative predictive value (1% of disease prevalence) 99,97% were observed. For the EIA ETI-AB-HCVK-4 best cut-off values were obtained from ROC curve and observed values were sensitivity 88,89%, specificity 98,89%, inter-rate agreement 0,875, positive predictive value 44,71%, and negative predictive value 99,89%. For the EIA MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA best cut-off values were obtained from ROC curve with sensitivity of 95,12%, specificity 100%, inter-rate agreement 0,959, positive predictive value 100%, and negative predictive value 99,95%. For the EIA Murex HCV Ag/Ab Combination best cut-off values were obtained by calculating the average of optical density of DBS samples correspondent to those with negative results in serum plus three standard deviations, resulting in a sensitivity of 78,05%, specificity of 99,43%, inter-rate agreement of 0,838, positive predictive value of 58,04%, and a negative predictive value of 99,78%. The lower limit of HCV Ab and ETI-AB-HCVK-4 tests in DBS was 1/10.000, and for MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA and Murex HCV Ag/Ab Combination was 1/1.000. Total error of DBS results was below 17% and all DBS samples maintained stable in all storage conditions for 60 days. Results obtained with EIE HCV Ab and EIA MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA were found to be more concordant with those observed for serum samples, indicating a better performance of these assays in DBS samples.

Key words: hepatitis C, diagnostic, dried blood spot

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

A história da classificação das hepatites virais começa nas décadas de 50 e 60 com a categorização das hepatites em dois grupos principais: hepatite infecciosa e hepatite por soro homólogo (Krugman et al. 1962). Posteriormente, foi comprovado pelo Dr. Stephen Feinstone et al. (1973) que a infecção por hepatite infecciosa era causada pelo vírus da hepatite A (*Hepatitis A virus* ou HAV) e Dr. Baruch Blumberg et al. (1968) provaram que o vírus da hepatite B (*Hepatitis B virus* ou HBV) era a causa da hepatite por soro homólogo. Na década de 70, com o desenvolvimento dos testes sorológicos para a detecção do HAV e HBV, surpreendentemente foram observados vários casos de hepatite por transmissão sanguínea que não eram causadas pelo HAV e HBV (Feinstone et al. 1975) e, assim estabeleceu-se o conceito de hepatite não-A, não-B (NANB). Observou-se, também, que pelo menos 10% das transfusões sanguíneas resultavam em hepatite NANB (Berman et al. 1979; Aach et al. 1981), causando dano hepático persistente e evoluindo em pelo menos 20% dos casos para cirrose hepática nas infecções crônicas (Hoofnagle e Alter 1985). Além disso, uma parcela dos casos ocorria esporadicamente na comunidade e não estava associada necessariamente à transfusão sanguínea e à recepção de derivados do sangue (Alter et al. 1982).

Outra fase importante foi quando o Dr. Harvey Alter (1978) e outros grupos (Hollinger et al. 1978) analisaram chimpanzés como modelo de estudo experimental da hepatite aguda e crônica com o uso de sangue de pacientes com hepatite NANB. A utilização desse modelo (Shimizu et al. 1979) indicou a existência de dois possíveis agentes das hepatites NANB, e em um deles foram observados túbulos membranosos dentro do citoplasma dos hepatócitos de chimpanzés infectados, também chamado de agente formador de túbulo (*Tubule forming agent* ou TFA). A inativação do TFA por solventes orgânicos indicou que o agente possuía envelope lipídico (Feinstone et al. 1983). Em seguida, em meados dos anos 80, demonstrou-se que se tratava de um vírus pequeno, pois passava através de membrana com porosidade de 80 nM,

relacionando às famílias *flaviridae*, *togaviridae* ou ao agente da hepatite Delta ou alternativamente a um novo vírus envelopado (Bradley 1985).

Apesar de inúmeros progressos e pesquisas em todo mundo, a hepatite NANB só foi descoberta após seis anos de intensas investigações no período compreendido entre 1982 e 1988 no laboratório da *Chiron Corporation*, com o emprego e o desenvolvimento de diversas técnicas de biologia molecular (Houghton 2009a; Houghton 2009b). Foram avaliadas centenas de milhões de clones de cDNA (DNA complementar) derivados de amostras diferentes de plasma e fígado de chimpanzés infectados. Um único clone de cDNA, 5-1-1, foi eventualmente isolado em 1989 por Choo et al. da *Chiron Corporation*, Califórnia, EUA. Com o uso do método de triagem imunológica randômica (*blind immunoscreen*) em biblioteca de cDNA, onde os anticorpos provenientes de pacientes com diagnóstico de hepatite NANB foram usados, foi possível identificar um clone de cDNA codificando um epítipo imunodominante dentro da proteína não-estrutural 4 do vírus. Após seis meses de análises extensas o clone 5-1-1 foi identificado e recebeu o nome de vírus da hepatite C (Choo et al.1989).

1.2- Estrutura do vírus e entrada do HCV na célula hospedeira

O vírus da hepatite C (HCV) é classificado como membro do gênero *Hepacivirus* e da família *Flaviviridae* (Figura 1.1) (Robertson et al. 1998). O vírion é formado por envelope e nucleocapsídeo. Possui forma esférica e mede aproximadamente 50 nm de diâmetro (ICTVdB 2006).

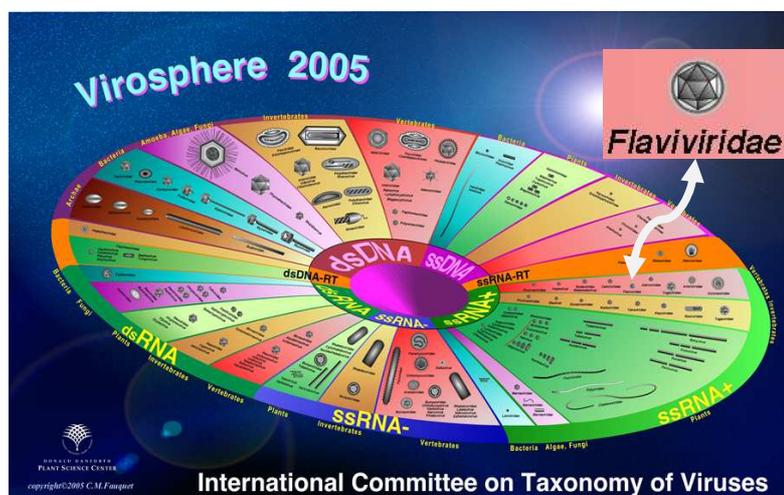


Figura 1.1- Virosfera 2005: em destaque a família *Flaviviridae* do vírus da hepatite C (ICTVdB 2005)

O capsídio/nucleocapsídio é arredondado, exibe simetria poliedrica e é envolvido por envelope lipoproteico sensível a detergente. O capsídio é icosaédrico e tem diâmetro de aproximadamente 30 nm (Figura 1.2).

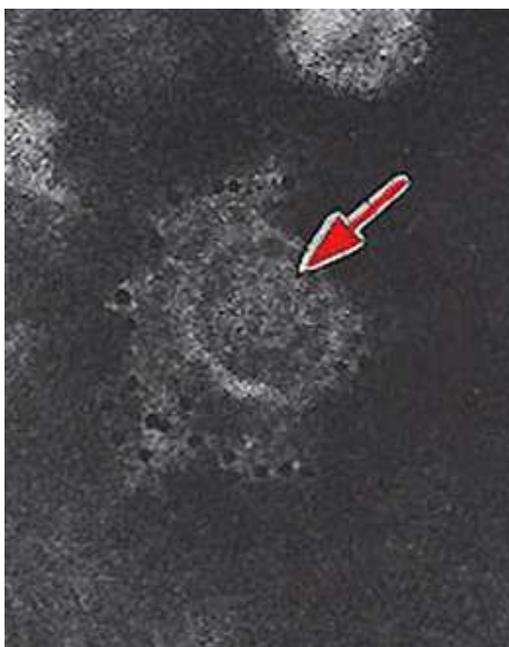


Figura 1.2- Estrutura do capsídio viral visível (Koop 2011)

A entrada do vírus na célula é um processo complexo que envolve diversas etapas. Andréo et al. (2007) demonstraram que a atividade catalítica da lipase de lipoproteínas permite a ligação e internalização de partículas do HCV por diferentes tipos celulares, agindo como “ponte” entre as lipoproteínas complexadas ao HCV e receptores de proteoglicanos na superfície das células. Baseado nisso, Burlone (2009) e Budkowska (2009) propuseram um modelo de entrada do vírus baseado na associação do HCV às lipoproteínas. Inicialmente, a interação do vírus com a superfície do hepatócito envolve a associação entre o HCV complexado às lipoproteínas, principalmente VLDL (*Very-low-density lipoprotein* ou lipoproteína de muito baixa densidade) e o receptor para LDL (*Low-density lipoprotein* ou lipoproteína de baixa densidade) e/ou GAG (glicosaminoglicano). Posteriormente, o HCV se liga ao receptor SR-BI (*scavenger* classe B tipo I) e CD 81, gerando o sinal para entrada do vírus. Em seguida, o HCV é transferido para junções estreitas onde se liga à CLDN-1 (claudina) e ocludina. O vírus entra na célula através das junções estreitas via endocitose mediada por clatrina seguido pela fusão no endossoma da célula através das glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, e libera o

nucleocapsídeo. A entrada e saída do vírus envolvem uma rede dinâmica de microtúbulos celulares (Figura 1.3).

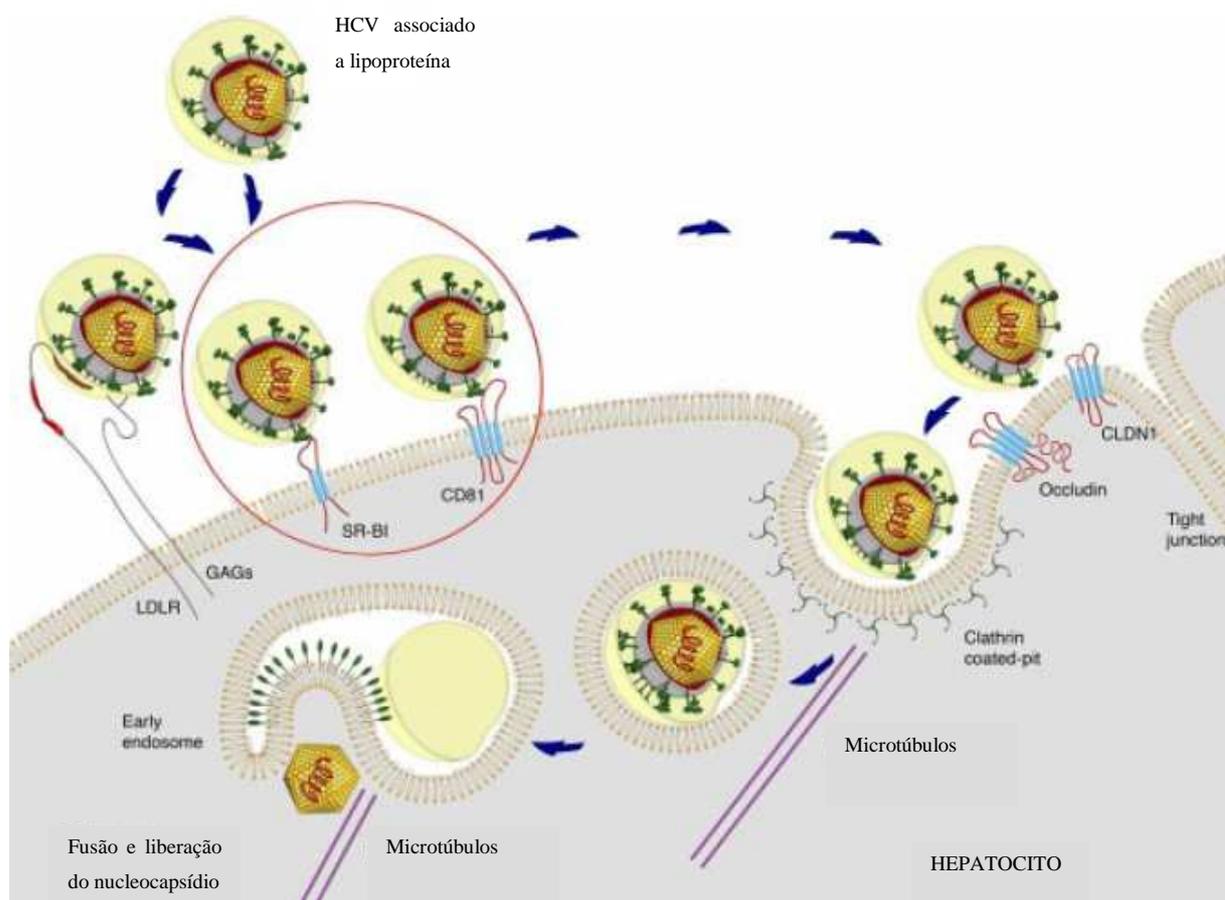


Figura 1.3- Mecanismo de entrada do HCV na célula (Budkowska 2009)

1.3-Organização do genoma viral

O genoma viral (Figura 1.4) é constituído por um RNA de fita simples, de polaridade positiva, medindo 9,6 kilobases (Kb) (ICTVdB 2006). É composto por uma região 5'-não-codificante (NC), que inclui um sítio interno de entrada do ribossomo (*Internal ribosome entry site* ou IRES), uma longa fase de leitura aberta (*open reading frame* ou ORF) codificando uma poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos (proteínas estruturais e não-estruturais), e uma região 3'-NC. Por ação de proteases virais e do hospedeiro (Budkowska 2009), esta poliproteína é clivada em três proteínas estruturais que formam a partícula viral: proteína do

capsídeo C, duas glicoproteínas do envelope E1 e E2; e várias proteínas não-estruturais: o canal iônico P7, a protease NS2-3, a serino protease NS3 e RNA helicase; o polipeptídeo NS4A, as proteínas NS4B e NS5A; e NS5B RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* ou RdRp).

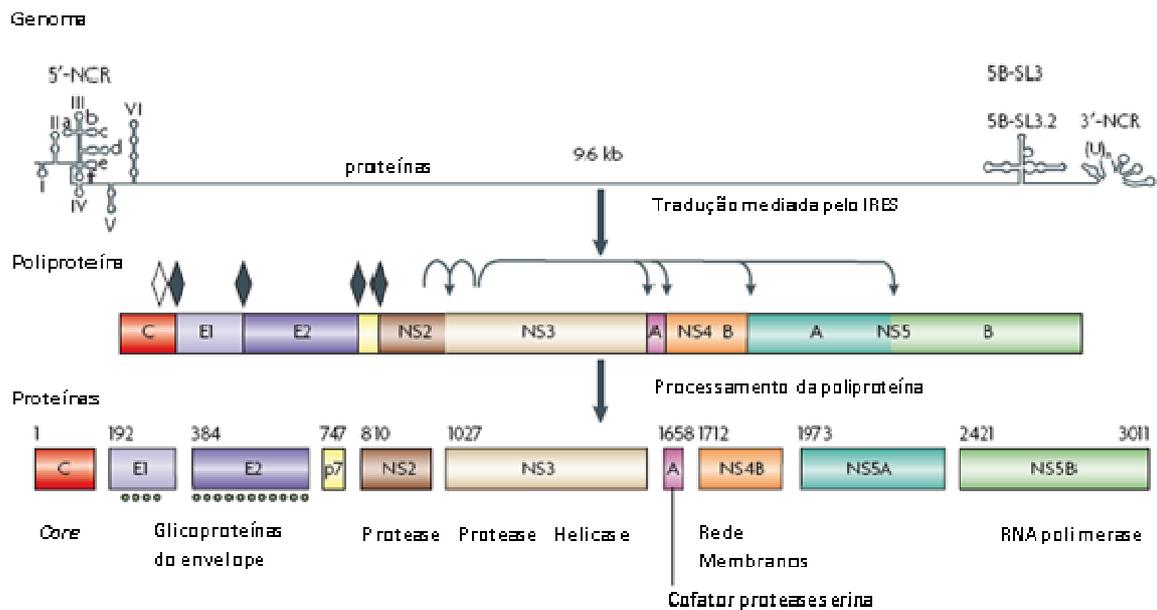


Figura 1.4- Organização do genoma do vírus da hepatite C (Moradpour et al. 2007)

A região 5'NC com aproximadamente 341 nucleotídeos, é altamente conservada entre os diferentes genótipos do HCV e contém o IRES, que é essencial para a iniciação da tradução de uma forma *cap*-independente do RNA viral. É composto por quatro domínios ordenados de I a IV, sendo os domínios I e II essenciais para replicação do RNA viral. A região 3'NC é composta de uma região variável de 80 nucleotídeos, um trato poli U/UC de comprimento variável e uma região altamente conservada de aproximadamente 98 nucleotídeos chamada cauda X, que são importantes para replicação e infecciosidade do vírus (Brass et al. 2006; Moradpour et al. 2007). Ao lado das regiões 5'NC e 3'NC, foi identificado o elemento de replicação *cis-acting* (*cis-acting* replication element ou CRE) que codifica a região C-terminal do NS5B. Uma haste principal denominada 5B-SL3.2 foi identificada dentro de um grande elemento cruciforme chamado de 5B-SL3. O laço superior do 5B-SL3.2 interage com a haste principal na cauda X, sugerindo a formação de um *pseudoknot* na região final 3' do genoma do HCV essencial para replicação

viral. Um *pseudoknot* é uma estrutura secundária de RNA contendo duas hastes principais na qual a primeira alça forma parte da segunda haste (Moradpour et al. 2007).

A tradução do RNA do HCV resulta na formação de uma poliproteína precursora que sofre processamento proteolítico co- e pós- tradução mediado por proteases virais e da célula hospedeira para dar origem às proteínas estruturais (*core*, E1, E2 e p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). As proteínas estruturais e o polipeptídeo p7 são processados no retículo endoplasmático (RE) através de peptidases. As proteínas não-estruturais são processadas por duas proteases virais: protease NS2-3 e a serino protease NS3-4A (Moradpour et al. 2007).

1.4-Estrutura e função das proteínas virais

1.4.1- Proteínas estruturais

A proteína *core* possui estrutura α -helicoidal, sendo encontrada nas membranas do RE dentro de redes membranosas e na superfície de resíduos de lipídios (Boulant et al. 2006). Existem evidências de que a interação da proteína *core* com os resíduos de lipídios pode afetar o metabolismo lipídico, contribuindo para o desenvolvimento de esteatose hepática, que ocorre principalmente em pacientes infectados com o genótipo 3 (Asselah et al. 2006). Esta proteína tem papel fundamental na formação do nucleocapsídeo, na modulação do gene de transcrição, na proliferação celular, morte celular e nos mecanismos de sinalização celular (Murphy et al. 2007).

As proteínas E1 e E2 são glicosiladas constituindo um complexo não-covalente responsável pela formação do envelope do HCV e têm papel importante na entrada do vírus na célula (Moradpour et al.2007).

A proteína p7 é formada por duas α -hélices transmembrana, TM1 e TM2, conectadas por uma alça voltada para o citoplasma. É uma proteína integral de membrana, hidrofóbica, localizada entre a região estrutural e não-estrutural do HCV. Sua função consiste em um íon oligomérico presente na formação do canal iônico capaz de mediar o fluxo de cátions através das membranas artificiais. O HCV também depende da função da proteína p7 para montagem, liberação e produção de *virions* infecciosos para célula hepática, porém acredita-se que esta proteína não tenha função na replicação viral (Khaliq et al. 2011).

1.4.2- Proteínas não-estruturais

A proteína NS2 desempenha um papel central na montagem da partícula viral. Popescu et al. (2011) demonstraram que a NS2 se acumula em estruturas derivadas das membranas do retículo endoplasmático e, juntamente com as glicoproteínas do envelope e componentes do complexo de replicação viral, ficam muito próximas às proteínas *core* e gotículas de gordura, localização esta essencial para a montagem da partícula viral. Essas observações parecem indicar que a NS2 atrai as proteínas do envelope viral para o sítio de montagem do vírus, e tem de promover a interação entre as demais proteínas não-estruturais para a montagem da partícula viral.

A proteína NS3-4A apresenta função de serino protease em seu terço inicial da região N-terminal, e função de RNA helicase/NTPase nos dois terços da região C-terminal. O polipeptídeo NS4A funciona como um cofator da serina protease NS3 (Moradpour et al.2007). É responsável pela clivagem da poliproteína viral nas junções NS3-4A, NS4A4B, NS4B5A e NS5A5B, e de duas proteínas adaptadoras da resposta imune da célula hospedeira, TRIF e MAVS. Dessa forma, é um dos principais alvos terapêuticos (Romano et al. 2011).

A proteína NS4B desencadeia a formação específica do rearranjo das membranas vesiculares que constituem a rede membranosa, correspondendo ao complexo replicativo do HCV. No entanto, o mecanismo de indução vesicular ainda é desconhecido (Paul et al. 2011).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína com múltiplas funções que pode ser encontrada nas formas basal e hiperfosforilada. A fosforilação é um processo altamente regulado por várias proteínas quinases celulares (Moradpour et al. 2007). Está localizada normalmente na membrana do retículo endoplasmático e acredita-se que faça parte de um componente do complexo de replicação viral compreendido entre NS2 e NS5B, também chamado de replicase. Possui uma região onde foram identificadas mutações chamada de região determinante da sensibilidade ao interferon (ISDR), que foi relacionada à eficiência do tratamento com interferon α . Está envolvido na modulação do ciclo celular, apoptose e via de resposta ao estresse, assim como nas vias de sinalização (Huang et al. 2007).

A proteína NS5B possui atividade RdRp, essencial para replicação do genoma viral e, assim, vem se constituindo também em um alvo intensamente estudado para terapia anti-HCV (Ferrari et al. 2008).

1.5-Diversidade genética

A infecção pelo HCV é altamente dinâmica, com o tempo de meia-vida viral de apenas poucas horas produzindo 10^{12} *virions* por dia no indivíduo. A alta atividade replicativa associada à RNA polimerase viral dependente de RNA desmovidada de alta fidelidade durante o processo de replicação, é a base para a alta variabilidade genética do HCV (Moradpour et al. 2007). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Virus* ou ICTV) classifica o HCV em seis grandes genótipos (1-6), subdivididos em subtipos (1a, 1b, 1c..., 2a, 2b, 2c..., 3a, 3b, 3g, 3k, 4a, 4c, 4d..., 5a, 6a, 6b, 6c...). A recombinação entre os diversos genótipos também trouxe implicações para a classificação, com a existência de quarenta termos específicos, como HCV cepa M21-2K/1b, HCV Recombinante quimérico 1b/2a 432/JFH-1, HCV Recombinante DBN-JFH1, entre outros. E existem, até o momento, vinte e sete tipos isolados do HCV não classificados denominados HCV (isolado EC1), HCV (isolado EC10), HCV (isolado *Glasgow*), entre outros (ICTV 2011). Os seis genótipos diferem em 30-35% dos sítios de nucleotídeos quando comparadas sequências completas do genoma. A diferença na composição genômica dos subtipos é de 20 a 25%. A variabilidade é mais frequente nos genes estruturais em relação aos não-estruturais ou das regiões não-codificantes (Irshad et al. 2010). A identificação genotípica tem importância fundamental para definição da terapia, estabelecimento da dose terapêutica e do tempo de tratamento (Simmons et al. 2005).

1.6- Aspectos clínicos

Uma vez que o indivíduo é infectado com o HCV, o vírus é transportado na corrente sanguínea até o fígado onde ocorre a replicação. A viremia ocorre em associação à ausência ou presença de poucos sintomas, e raros são os casos de hepatite aguda fulminante. Geralmente, os pacientes não eliminam o vírus naturalmente, de modo que a infecção pelo HCV evolui para infecção persistente (Dwyre et al. 2011).

O HCV RNA pode ser detectado no sangue com 1-3 semanas após a exposição inicial. Dentro de 4-12 semanas, a lesão das células do fígado se traduz pela elevação da alanina aminotransferase (ALT). A infecção aguda pode ser grave, mas raramente é fulminante. Os sintomas são incomuns, mas podem incluir mal estar, fraqueza, anorexia e icterícia. Geralmente,

desaparecem depois de várias semanas assim como ocorre o declínio dos níveis de ALT (NIH 2002).

A persistência da infecção pelo HCV, diagnosticada por pelo menos seis meses, caracteriza a infecção crônica. Entre 60 a 80% das pessoas infectadas desenvolvem a infecção crônica. A sequela mais importante desta fase é a fibrose hepática progressiva, podendo levar cirrose hepática, doença hepática em estágio terminal e carcinoma hepatocelular (NIH 2002).

Os pacientes com hepatite C crônica podem apresentar manifestações extra-hepáticas ou síndromes consideradas de origem imunológica, como sintomas reumatóides, ceratoconjuntivite seca, líquen plano, glomerulonefrite, linfoma e crioglobulinemia mista. Também está relacionado com porfiria cutânea tarda e depressão (NIH 2002).

1.7- Epidemiologia

A hepatite C é reconhecida nos dias atuais como uma doença de importância global, pois afeta todos os países do mundo, sendo um dos principais problemas de saúde pública que requer intervenções para prevenção e controle (Lavanchy 2011). A transmissão ocorre por meio de sangue infectado, principalmente pela via parenteral, sendo a transmissão sexual e a vertical (perinatal) pouco frequente (Brasil 2010b). São consideradas populações de risco acrescido: indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993; usuários de drogas injetáveis (cocaína, anabolizantes, complexos vitamínicos) ou inaláveis (cocaína) ou pipadas (crack); pessoas que compartilham ou utilizam instrumentos não esterilizados para realização de *piercings*, tatuagem e manicure, além de objetos para higiene pessoal (escovas de dente, lâminas de barbear e de depilar etc.).

Estudos prospectivos mostraram que 80% dos casos de hepatite C aguda evoluem para infecção crônica; desses, 10-20% desenvolverão complicações para doença crônica hepática, como a cirrose hepática e 1-5% desenvolverão câncer hepático (Di Bisceglie et al. 1991; Fattovich et al. 1997; Kiyosawa et al. 1990; Seeff et al. 1992; Global Burden of Hepatitis C Working Group 2004). A hepatite C crônica está associada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em muitas regiões do mundo (WHO 1996) e representa a principal causa de indicação de transplante de fígado (Brasil 2010b). São diagnosticados mais de 500.000 novos casos de câncer hepático por ano, sendo 22% (>100.000) atribuídos à infecção pelo HCV (WHO 1996). Até o presente momento, não existe vacina contra a hepatite C (Brasil 2010b).

A avaliação da prevalência e das formas de transmissão da hepatite C permitem que as autoridades de cada nação possam priorizar as medidas preventivas e fazer uso mais adequado dos recursos disponíveis. Existem muitas perguntas não respondidas sobre os papéis dos fatores de risco e das condições de vida que podem estar associados com a propagação do HCV nas diversas regiões do mundo. Estudos epidemiológicos sobre o papel dos fatores de risco potenciais têm mostrado grandes variações geográficas com implicações importantes para populações locais, programas de prevenção e controle em potencial. Também devem ser mais bem estudados o papel da coinfeção do HCV com outras doenças sexualmente transmissíveis como HIV/Aids, infecção por clamídia e sífilis (Lavanchy 2011; Martins et al. 2011).

A distribuição mundial do HCV ocorre entre pessoas de diferentes etnias, sexos e faixas de idade. O reflexo sócio-econômico da infecção pelo HCV não foi estabelecido na maioria dos países, mas as consequências da hepatite C crônica, do estágio terminal de cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular, têm mostrado um impacto cada vez maior nos sistemas nacionais de saúde (Adler et al. 2002).

A maioria dos casos de infecção aguda pelo HCV é assintomática (60-70%) e, portanto, os dados sobre a incidência da infecção aguda são escassos. Assim, as estimativas atuais são baseadas em dados de soro prevalência publicados em revisões de literatura, onde 130 a 170 milhões de pessoas, ou 2 a 3% da população mundial, podem estar cronicamente infectados pelo HCV (Hepatitis C 2000; Shepard et al. 2005; Hepatitis C 1997; Lavanchy 2011; Martins et al. 2011).

A estimativa da prevalência de indivíduos com infecção crônica na Austrália e Oceania é de 400.000 casos. São estimados mais de 14 milhões nas Américas, 16 milhões no Oriente Médio, 17,5 milhões na Europa, 28 milhões na África e 83 milhões na Ásia (Figura 1.5). Os dados publicados sugerem que a maioria das populações nas Américas, Europa Ocidental e Sudeste da Ásia apresentam soro prevalência de anticorpos anti-HCV de 2,5%. Já no Leste da Europa a taxa de anti-HCV varia entre 1,5-5%; para a região do Pacífico Ocidental varia entre 2,5-4,9%; e para Oriente Médio e Ásia Central as taxas vão de 1% a maior que 12%. Em termos absolutos (Tabela 1.1), a maioria das pessoas infectadas reside no Centro/Sudeste da Ásia e na região do Pacífico Ocidental (Lavanchy 2011).

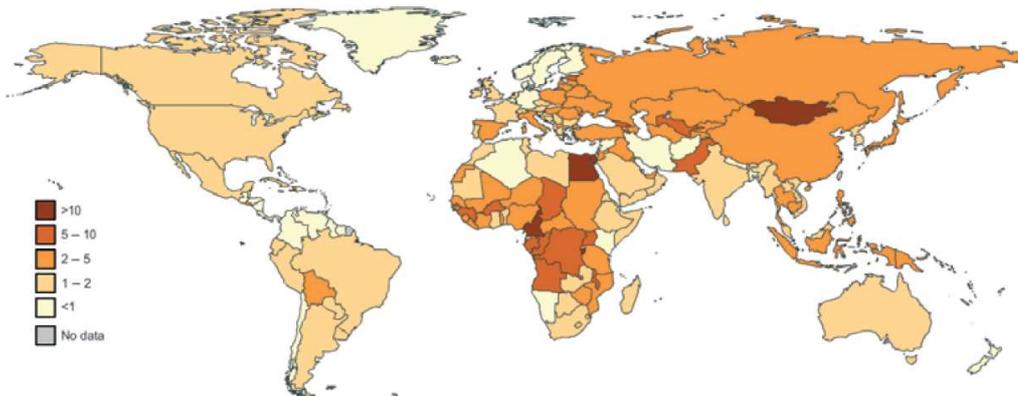


Figura 1.5- Prevalência global de hepatite C em 2010 (Lavanchy 2011)

Quadro 1.1- Prevalência regional de hepatite C em 2010 estimada com base na detecção de anti-HCV em diferentes regiões do mundo (Lavanchy 2011)

| Região | Anti-HCV (%) | Nº de infectados pelo HCV |
|---------------------|--------------|---------------------------|
| África | 3,2 | 28.100.000 |
| Américas | 1,5 | 14.000.000 |
| Ásia | 2,1 | 83.000.000 |
| Austrália e Oceania | 1,2 | 400.000 |
| Europa | 2,3 | 17.500.000 |
| Oriente Médio | 4,7 | 16.000.000 |
| Total | 2,35 | 159.000.000 |

O Brasil é um país de dimensões continentais e com grandes variações demográficas, sociais e culturais entre suas diferentes macroregiões. A partir do ano de 1996, as hepatites virais foram incluídas na lista de doenças de notificação compulsória. Desde então, a coleta de dados sobre a ocorrência dessas doenças passou a compor as ações de vigilância epidemiológica. Para tal, foi adotado o critério de caso confirmado segundo o Ministério da Saúde, ou seja, aquele em que o indivíduo preenche as condições de caso suspeito e que apresente anti-HCV reagente e HCV-RNA detectado em amostra de soro ou plasma. O Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, publicado em 2010(a), apresenta o levantamento realizado no Brasil no período de 1999 a 2009. Foram registrados 132.950 casos reagentes para anti-HCV (Anexo 8.1), sendo que 60.908 casos apresentaram tanto anti-HCV reagente como HCV-RNA detectado. Do total de casos confirmados, 69,3% (42.221) são residentes da região sudeste, que apresenta, desde 2002, as maiores taxas de detecção, com o mesmo padrão observado na região sul que ocupa a segunda

posição. Em 2009, a taxa de casos confirmados para o Brasil foi de 5,1 casos por 100 mil habitantes, com pouca variação desde 2006. A região sudeste apresentou o maior número de casos (6.620) e a maior taxa de detecção (8,2) em 2009 (Figuras 1.6 e 1.7). Dos estados brasileiros, o Acre exibiu a maior taxa em 2009 sendo 22,7 casos por 100 mil habitantes, superando os estados de São Paulo (14,2) e Rio Grande do Sul (10,4). O Rio de Janeiro apresentou a menor taxa da região sudeste, com 1,3 casos por 100 mil habitantes (Anexo 8.2). De 1999 a 2009, foram confirmados 37.147 casos de infecção pelo HCV no sexo masculino e 23.748 casos no sexo feminino (Anexo 8.3). Observou-se que a razão de sexos (M:F) passou de 2,2, em 1999, para 1,5, em 2009(Figura 1.8).

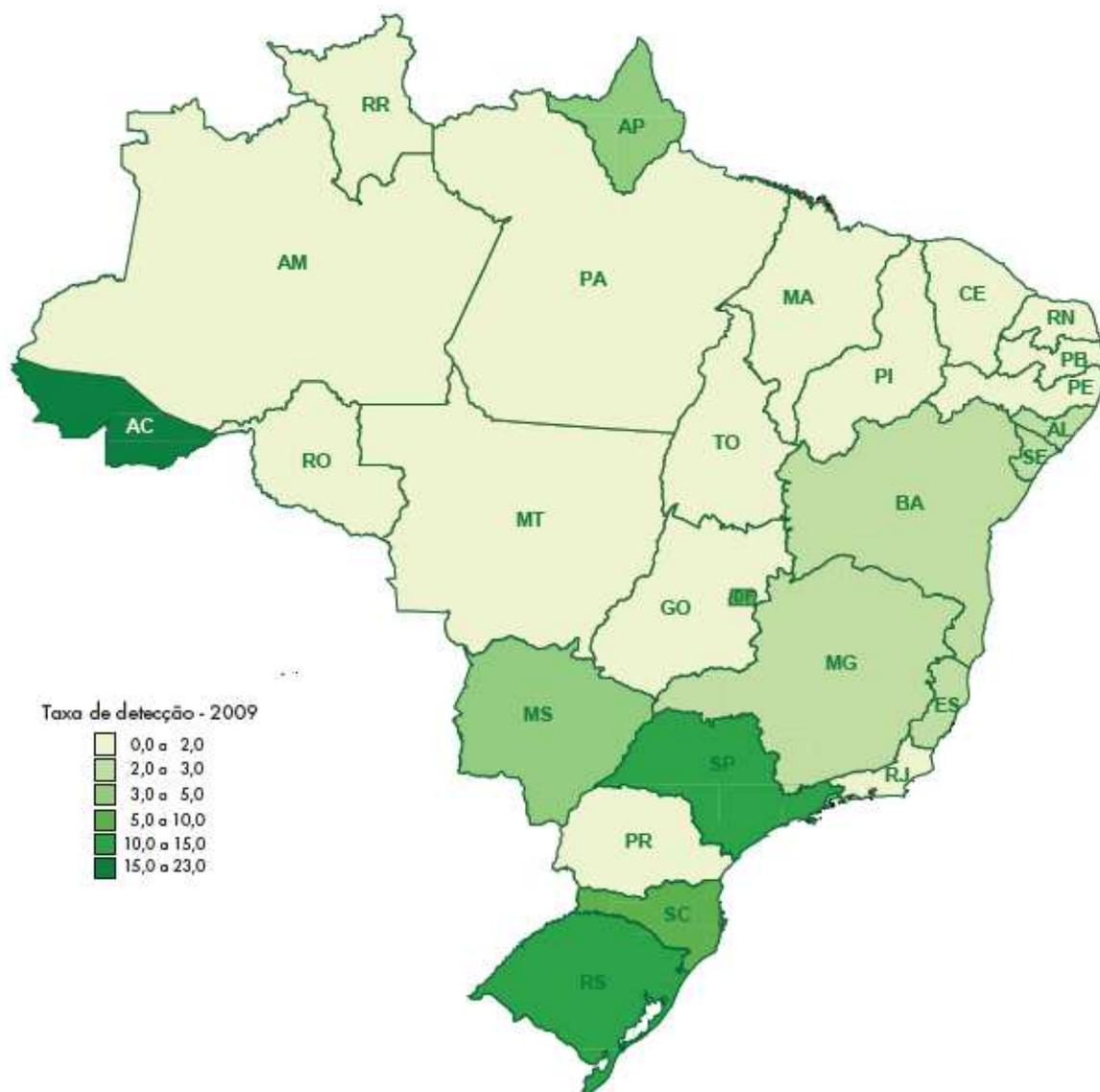


Figura 1.6- Taxa de detecção de hepatite C por Unidade Federativa de residência, Brasil, 2009

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; Casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2009. Dados preliminares para 2009; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

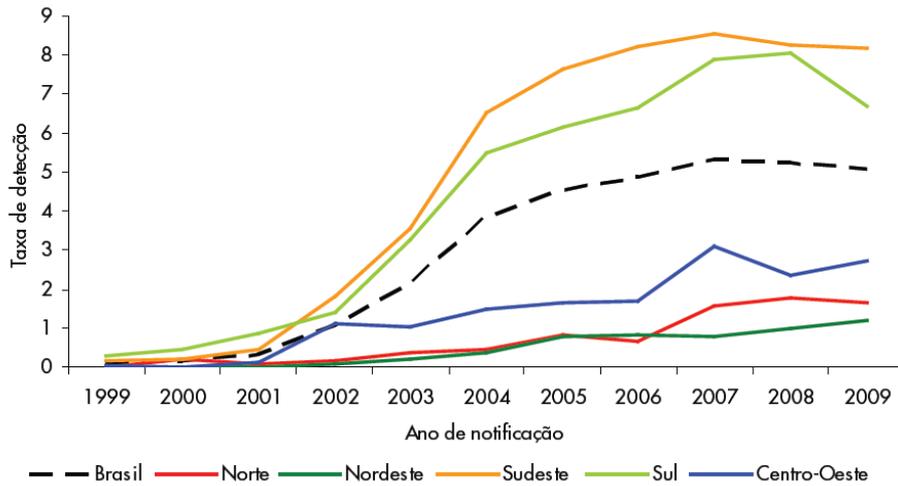


Figura 1.7- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000) hab. segundo região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2009

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; Casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2009. Dados preliminares para 2009; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

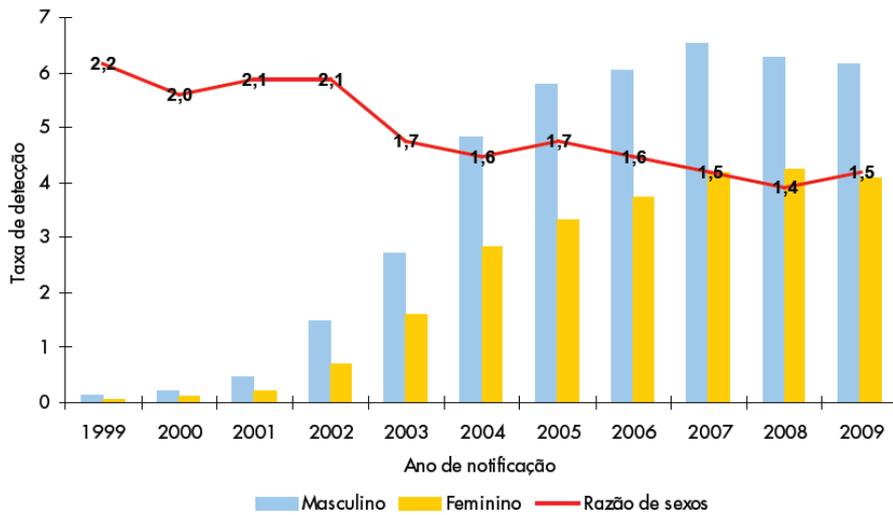


Figura 1.8- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 hab.) segundo sexo por ano de notificação e razão de sexos. Brasil, 1999 a 2009

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; Casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2009. Dados preliminares para 2009; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

O anexo 8.4 apresenta os casos confirmados de hepatite C, segundo sexo e faixa etária. De 1999 a 2009, observou-se que do total de casos confirmados do sexo masculino (37147), a maior proporção, 55,7%, encontrava-se na faixa etária de 40 a 59 anos de idade. Para o sexo feminino, a faixa etária de 40 a 59 anos de idade representou 49,7% dos casos. Com relação às taxas de detecção para ambos os sexos, as maiores taxas, em 2008 e 2009, foram registradas na faixa etária de 50 a 59 anos de idade (Figura 1.9).

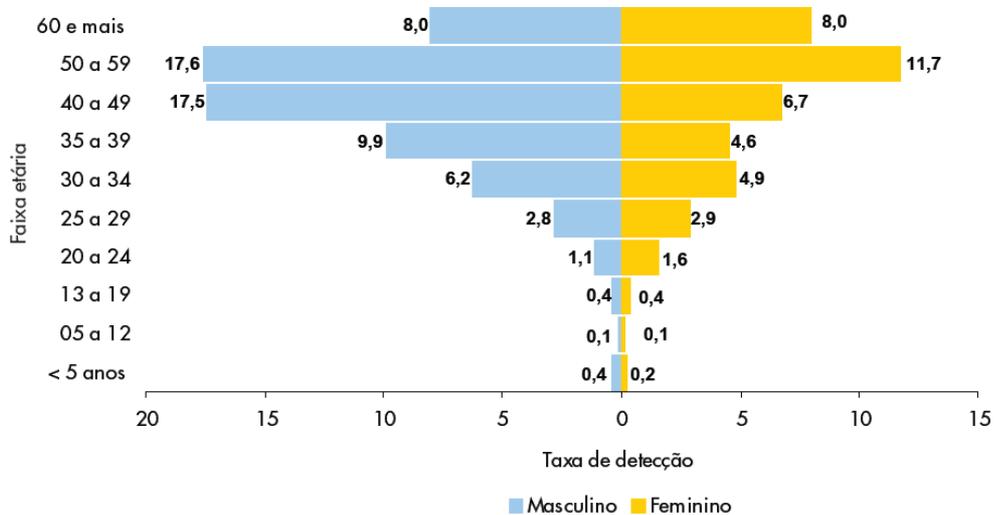


Figura 1.9- Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 hab.) segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2009

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; Casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2009. Dados preliminares para 2009; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

Em relação às formas clínicas dos casos confirmados, os maiores percentuais foram da forma crônica da doença (Anexo 8.5), onde aproximadamente 98% foram registrados nas faixas etárias a partir de 20 anos. Já em relação às prováveis fontes/mecanismos de infecção dos casos confirmados de infecção pelo HCV, apesar do alto percentual de ignorados (42,9%), observou-se que as maiores proporções de casos foram relacionadas ao uso de drogas (17,6%), transfusão de sangue e/ou hemoderivados (15,9%) e transmissão sexual (9%) (Figuras 1.10 e 1.11; Anexo 8.6).

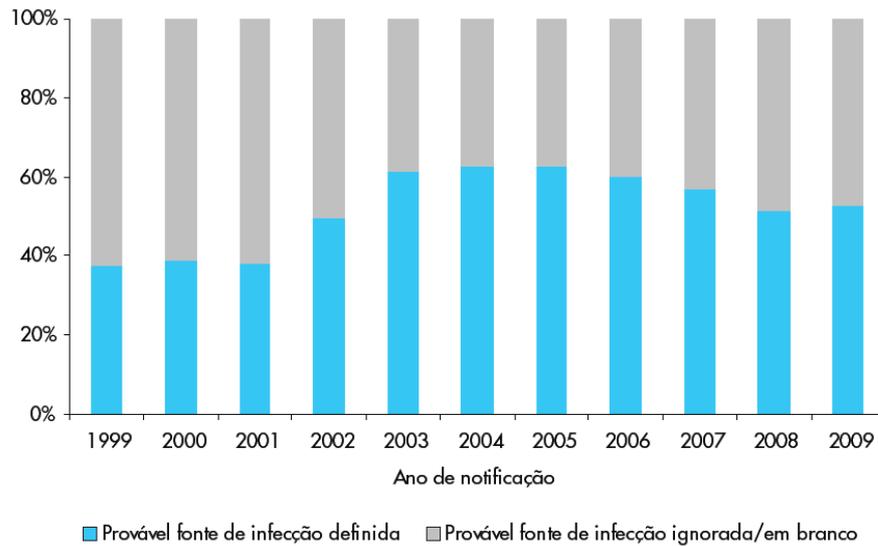


Figura 1.10- Distribuição percentual dos casos de hepatite C segundo definição da provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2009

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; Casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2009. Dados preliminares para 2009. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

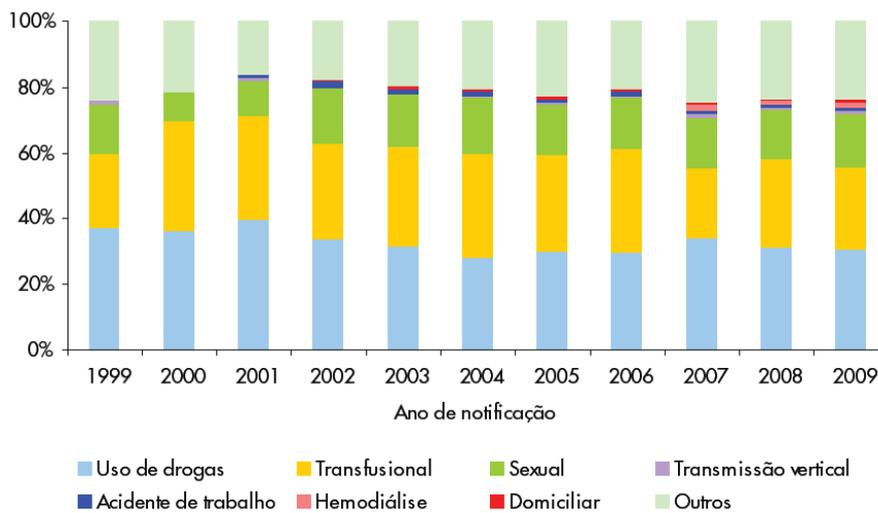


Figura 1.11- Distribuição percentual dos casos de hepatite C segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2009

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; Casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2009. Dados preliminares para 2009. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

1.8- Diagnóstico

O diagnóstico diferencial e a monitorização da infecção pelo HCV são baseados na utilização de marcadores virológicos diretos e indiretos. Na prática clínica, quatro marcadores são usados, sendo três diretos - detecção do antígeno *core* do HCV, detecção e quantificação do RNA viral, genotipagem, e um indireto - detecção do anticorpo anti-HCV total. No entanto, é necessário conhecer a cinética da infecção pelo HCV para fazer uso apropriado desses marcadores. O período de janela imunológica (Figura 1.12) foi estimado em aproximadamente 60 dias e é caracterizado pela capacidade de detectar o antígeno *core* e o RNA do HCV, e pela ausência de anticorpos anti-HCV circulantes ou detectáveis. Os anticorpos anti-HCV aparecem em média 2-8 semanas após a fase aguda da infecção e tendem a persistir por toda a vida (Busch et al. 2005).

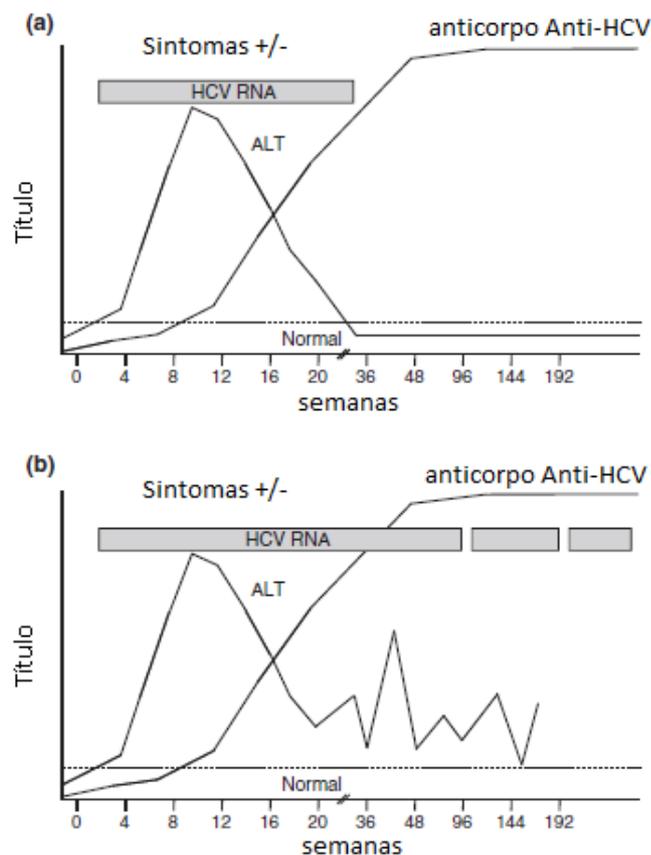


Figura 1.12- Cinética dos marcadores sorológicos durante a fase aguda (a) e crônica (b) da infecção pelo vírus da hepatite C (Chevaliez 2010)

A detecção e eventual quantificação de anticorpos específicos presentes em fluidos corporais são feitas utilizando-se ensaios imunoenzimáticos (EIEs). Antígenos recombinantes são fixados em poços de microplacas, pequenas esferas ou artifícios específicos usados para capturar anticorpos circulantes. A presença de anticorpos é revelada por anti-anticorpos ligados à enzima que catalisa a transformação do substrato em um composto colorido. A razão da densidade ótica (D.O.) da reação (D.O. da amostra dividida pela D.O. do controle interno) é proporcional a quantidade de anticorpos presente na amostra. Os EIEs são baratos, de fácil uso, podem ser automatizados e facilmente adaptados para grande volume de testes (Chevaliez 2010).

O antígeno *core* do HCV pode ser detectado em amostras de sangue periférico. Estudos com diferentes ensaios para o antígeno *core* mostraram que o nível de antígeno é equivalente à quantidade de RNA viral determinado por técnicas de biologia molecular (Bouvier-Alias et al. 2002; Park et al. 2010). A quantificação do antígeno *core* pode ser considerada uma alternativa para a determinação da quantidade de RNA viral, pois é de fácil execução por EIE, de menor custo e menos propensa à contaminação cruzada da amostra em relação aos métodos moleculares baseados na amplificação de um alvo. Porém, a detecção do antígeno *core* mostrou-se ser menos sensível que a detecção do RNA viral, e a razão entre antígeno *core* e RNA viral pode variar ligeiramente de um indivíduo para outro. Isto pode ocorrer devido à presença de antígeno *core* tanto no *vírion* quanto no RNA livre das proteínas estruturais do vírus presente na circulação periférica (Bouvier-Alias et al. 2002). A quantificação do antígeno *core* pode ser usada para monitorar a carga viral dos pacientes em tratamento para hepatite C crônica, incluindo a avaliação do nível de replicação viral e avaliação da resposta à terapia medicamentosa (Ross et al. 2010; Moscato et al. 2011). Também pode ser usado como alternativa ao teste molecular para triagem de doadores de sangue, órgão, tecidos e células para infecção aguda (Miedouge et al. 2010).

A primeira geração de EIE detectava apenas anticorpos contra antígeno representado a região NS4 do HCV com o uso do antígeno recombinante c100-3. Com o desenvolvimento da segunda geração de testes, foram adicionados antígenos representando a região *core* (C22-3), além da região NS3 (c33c) e uma parte do c100-3 (chamado 5-1-1) da região NS4. A terceira geração incluiu um antígeno adicional representando a região NS5 e uma reconfiguração dos antígenos *core* e NS3 (Kesli et al.; 2009). Esses avanços tecnológicos propiciaram um aumento significativo da sensibilidade do teste de 80% da primeira geração para 98% (Cao et al. 2011) e uma redução da janela imunológica de 82 para 66 dias (Laperche et al. 2005).

Há pouco mais de seis anos, foi desenvolvido o ensaio combinado que detecta mutuamente anticorpos anti-HCV e antígenos do *core* viral (Chevaliez 2010). Os ensaios combinados detectam a infecção aguda do HCV vinte e sete dias antes do ensaio de 3º geração para detecção de anticorpos. No entanto, são menos sensíveis que o ensaio molecular para detecção do HCV RNA. Apresentam sensibilidade de 100% e especificidade igual ou maior que 99,5% (Bio-Rad, França; Abbott, África do Sul) e, portanto, representam uma alternativa para o diagnóstico da infecção aguda pelo HCV e para triagem sorológica quando as tecnologias baseadas em ácido nucleico não estão disponíveis (Laperche et al. 2005).

A presença de HCV RNA no sangue periférico é um marcador de replicação viral. O HCV RNA pode ser detectado de 1 a 3 semanas após a infecção, e aproximadamente um mês antes do aparecimento de anticorpos anti-HCV. A presença de HCV RNA por mais de seis meses caracteriza uma infecção crônica (Pawlotsky 2002).

A detecção e quantificação do HCV RNA são obtidas por duas categorias de técnicas de biologia molecular: amplificação do alvo, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), e a amplificação do sinal, como o ensaio de DNA ramificado. A técnica de escolha para a prática clínica é a PCR em tempo real, por ser mais sensível que a PCR clássica, com limite de detecção na ordem de 10-15 UI/mL e faixa superior de quantificação de 7-8 log₁₀ UI/mL. Esse ensaio não produz resultados falso-positivos devido a contaminações e pode ser totalmente automatizado (Chevaliez 2010). Aplica-se ao diagnóstico da infecção crônica do HCV para indicar os pacientes que necessitam de terapia anti-retroviral, bem como monitorar a resposta virológica durante a terapia antiviral (Pawlotsky 2002). A análise da sequência do genoma viral é geralmente baseada no sequenciamento direto, sendo realizada por sequenciamento do fragmento amplificado ou hibridização reversa que identifica nucleotídeos específicos. O método de referência é a análise filogenética da sequência gerada após amplificação por PCR da porção do genoma viral com a sequência de referência. A determinação do genótipo viral é necessária para definir o tipo e a duração do tratamento, assim como, a taxa de resposta virológica (Chevaliez 2010).

1.9-Uso de amostras de sangue coletado em papel de filtro

O diagnóstico da infecção pelo HCV é baseado em métodos sorológicos e técnicas de biologia molecular aplicados em amostras de soro ou plasma humano (Brandão et al. 2001). Entretanto, a coleta de sangue para obtenção do soro ou plasma requer punção venosa e necessita

de pessoal treinado e infraestrutura para ser realizada dentro das condições de biossegurança. Além disso, a coleta de sangue é bastante difícil em grupos com acesso venoso difícil, tais como: idosos, usuários de drogas e crianças.

O sangue coletado em papel de filtro (SCPF) pode ser preparado aplicando-se cuidadosamente poucas gotas de sangue fresco coletado por punção digital com lanceta em um papel de filtro absorvente. O sangue é saturado no papel, seco a temperatura ambiente e enviado dentro de um envelope para o laboratório. É estável por várias semanas e pode ser transportado a temperatura ambiente (Abe e Konomi 1998). Esta técnica requer um volume de amostra menor, é menos invasivo, é de fácil de armazenamento e transporte (Lin et al. 2011). Em 1963, Guthrie e Suzi introduziram o uso de SCPF para a detecção de fenilcetonúria em recém-nascidos. Depois, o SCPF passou ter uma ampla aplicabilidade em estudos epidemiológicos para triagem e monitoramento de doenças infecciosas (Parker e Cubitt 1999; Cassol et al. 1992); na detecção de biomarcadores como hormônios, proteína C reativa, marcadores da inflamação (Kapur et al. 2008; Skogstrand et al. 2005); anticorpos contra vários vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (Castro et al. 2008), rubéola (Punnarugsa e Mungmee 1991; Helfand et al. 2001, Helfand et al. 2007; Karapanagiotidis et al. 2005), sarampo (Helfand et al. 2001; Ridell et al. 2002; Mercarder et al. 2006), HTLV (Parker et al. 1995), vírus Epstein-barr (Fachiroh et al. 2008) e hepatites virais (Villa et al. 1981; Gil et al. 1997; Tappin et al. 1998; De Almeida et al. 1999; McCarron et al. 1999; Desbois et al. 2009); no diagnóstico de anemia falciforme (Jinks et al. 1989) e, mais recentemente, passou a ser utilizado no monitoramento de medicamentos, estudos toxicológicos, farmacodinâmicos e farmacocinéticos (Edelbroek et al. 2009; Barfield et al. 2008; Spooner et al. 2009).

No Brasil, o SCPF foi introduzido pelo pediatra Benjamin J. Schmidt, em 1976, para o diagnóstico de desordens metabólicas congênitas em recém-natos. Em 1992, o teste se tornou obrigatório em todo o país por meio da Lei Federal nº 326 (1992). Para que a lei fosse cumprida, o Ministério da Saúde (MS) publicou a Portaria nº 822 (2001) criando o Programa Nacional de Triagem Neonatal. Em 2009, o uso deste tipo de amostra foi aprovado pelo MS por meio da Portaria nº 151 (2009) para detecção de anticorpos anti-HIV, possibilitando maior acesso ao diagnóstico em populações remotas.

Vários estudos sobre o desempenho de ensaios para detecção de anticorpos contra o HCV e HCV RNA demonstraram que o SCPF é uma alternativa possível e reprodutiva para o diagnóstico da infecção pelo HCV (Parker et al. 1997; Parker e Cubitt 1999; Croom et al. 2006;

Abe e Konomi 1998; Solmone et al. 2002; Montebugnoli et al. 1999; Tuailon et al. 2010). Em todos os casos, os conjuntos de diagnósticos foram adaptados de forma diferente para uso de amostras de SCPF e em populações diferentes. De acordo com os estudos recentes de Tuailon et al. (2010), em uma população de 200 pacientes de uma unidade hospitalar, o EIE para detecção de anticorpos obteve taxas de sensibilidade e especificidade de 99% e 98% respectivamente (95% de intervalo de confiança), o limite de detecção variou em torno da diluição 1/512 (1/64-1/4.096) e as amostras se mantiveram estáveis durante 2 dias a temperatura ambiente, sendo recomendada a refrigeração para maiores períodos de tempo. Este estudo também contemplou a detecção, quantificação e genotipagem do HCV RNA.

Apesar dos excelentes resultados, à medida que se faz uso de ensaios comerciais de fabricantes diferentes, novos estudos são necessários para avaliar se a adaptação realizada se aplica da mesma forma e apresenta o mesmo desempenho. Além disso, não existem informações sobre o desempenho de EIE com detecção combinada de antígeno e anticorpo para o HCV em SCPF, limitando o uso de um recurso importante para um país onde os testes moleculares não são acessíveis para todos.

Os estudos de estabilidade dos marcadores da infecção pelo HCV em SCPF disponíveis na literatura não se enquadram no perfil do Brasil, pois as amostras obtidas em nosso país são oriundas de áreas remotas onde temperaturas e índices de umidade são elevados e o período entre coleta e destino final pode alcançar 30 dias ou mais.

Por estes motivos, torna-se necessário a adaptação de testes de diagnóstico da infecção pelo HCV em amostras de SCPF para facilitar a realização de estudos epidemiológicos e o acesso ao diagnóstico em áreas distantes do laboratório.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Adaptar métodos imunoenzimáticos de diagnóstico da hepatite C para uso em amostras de sangue coletado em papel de filtro.

2.2- Específicos

A- Estabelecer as melhores condições para realização do teste de detecção de anticorpos anti-HCV e detecção simultânea de antígenos e anticorpos anti-HCV em amostras de sangue coletadas em papel de filtro, segundo os parâmetros: tipo de tampão de eluição da amostra, volume de tampão de eluição, volume de amostra, tempo de incubação da amostra, e valor do ponto de corte;

B- Padronizar a detecção de anticorpos anti-HCV e de antígenos e anticorpos anti-HCV em amostras de sangue coletado em papel de filtro usando ensaios imunoenzimáticos comerciais e avaliar os parâmetros de sensibilidade, especificidade, concordância, valor preditivo positivo e negativo e precisão intraensaio (repetitividade) e interensaio (reprodutibilidade);

C- Avaliar a estabilidade das amostras de sangue coletado em papel de filtro em diferentes condições ambientais, incluindo temperaturas (22-26°C, 2-8°C e -20°C) e períodos de armazenamento diferentes (7, 14, 28, 60 e 117 dias).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está inserido no projeto “Avaliação da estabilidade de marcadores para hepatites B e C em sangue coletado em papel de filtro”, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, segundo resolução 196/96, sob nº 459/2008 (Anexo 8.7). Também foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Federal dos Servidores do Estado, sob o nº 000.420, em 25/02/2011, com o título: “Adaptação de ensaios imunoenzimáticos comerciais para o diagnóstico da infecção pelo vírus de hepatite C em amostras de sangue coletado em papel de filtro” (Anexo 8.8).

3.1- Desenho do estudo

Estudo transversal.

3.2- Amostra populacional

A amostra foi dimensionada de acordo com o mínimo requerido para padronização de um teste com 99% de eficiência. A coleta de 100 amostras foi realizada de forma consecutiva. No entanto, devido ao baixo número de amostras reativas para anti-HCV foi necessário continuar a coleta.

Participaram do estudo candidatos considerados aptos à doação de sangue no Serviço de Hemoterapia do Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE), após passarem por uma triagem clínica e hematológica, reduzindo as chances de serem portadores de alguma patologia. Ainda assim, todas as amostras coletadas foram analisadas e classificadas de acordo com o resultado obtido para pesquisa de anticorpo anti-HCV. Os critérios de inclusão no estudo foram adequados aos critérios de inclusão estabelecidos pelo Serviço de Hemoterapia / HFSE para doadores de sangue, disponíveis em <http://www.hse.rj.saude.gov.br/cidadao/clin/hemote.asp>. São eles: ser de qualquer um dos sexos qualquer raça, ter idade variando entre 18 e 60 anos.

Os critérios de exclusão adotados também foram em concordância com os requisitos estabelecidos para a doação de sangue: ser portador de algum tipo de patologia, pesar menos de 50 Kg, estar grávida ou amamentando, ser usuário de drogas, ter tido contato sexual com pessoas que tenham comportamento de risco, intercorrências durante a doação de sangue que inviabilizasse a coleta da amostra como - o doador não ter veia acessível, perda do acesso venoso, e queda da pressão arterial- e, a não concordância com os termos do consentimento livre e esclarecido. Neste grupo houve a participação de 132 indivíduos que foram informados sobre o projeto e concordaram com a participação na pesquisa, tendo em seguida assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 8.9), conforme resolução nº 01, de 13 de junho de 1988 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

Participaram também do estudo pacientes com suspeita ou sabidamente portadores da infecção pelo HCV, que procuraram atendimento no Ambulatório de Hepatites Virais do Laboratório de Hepatites Virais (IOC/FIOCRUZ) e Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ), além de profissionais de saúde de um hospital privado de Petrópolis (RJ). Todas as amostras de sangue coletadas foram analisadas e classificadas de acordo com o resultado obtido para pesquisa de anticorpos anti-HCV. Os critérios de inclusão no estudo foram: qualquer um dos sexos, qualquer raça, ter idade variando entre 18 e 60 anos e ter a suspeita de estar infectado pelo HCV [histórico clínico sugestivo, comportamento de risco para doenças infectocontagiosas ou histórico familiar de infecção por HCV para os pacientes do Ambulatório de Hepatites Virais do Laboratório de Hepatites Virais (IOC/FIOCRUZ) e do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ)]. Os critérios de exclusão no estudo foram: ocorrência de intercorrência durante a coleta da amostra, como: não ter veia acessível, perder a veia durante a coleta e não concordância com os termos do consentimento livre e esclarecido. Neste grupo participaram 47 pacientes com infecção crônica pelo HCV e 232 profissionais de saúde. Todos os indivíduos participantes foram informados sobre o projeto e concordaram com a participação na pesquisa, tendo assinado o TCLE (Anexo 8.9), conforme resolução nº 01, de 13 de junho de 1988 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

3.3- Coleta e preparo das amostras biológicas

De todos os participantes do estudo foi coletada uma amostra de sangue venoso (8 mL) por punção venosa periférica. Para evitar expor o voluntário a duas ou mais punções consecutivas (McCarron et al. 1999), quatro gotas de sangue (aproximadamente 75 μ L) foram transferidas para o papel de filtro (Whatman 903) até o preenchimento total de quatro círculos de 12,5 mm de diâmetro, o equivalente a aproximadamente 24 μ L de soro (Steger et al. 1990; McDade et al. 2007; Melgaço et al. 2011). Alternativamente, foi realizada punção capilar para coleta do sangue em papel de filtro.

As amostras de sangue coletado em papel de filtro foram mantidas a temperatura ambiente por 4 horas, e depois foram armazenadas em freezer à temperatura de -20°C , acondicionadas em saco plástico resistente e hermeticamente fechado com um envelope dessecante até o momento da extração do eluato (Melgaço et al. 2011).

As amostras de sangue coletado por punção venosa periférica foram centrifugadas a $1701,28 \times g$ em centrífuga Biofuge[®] Primo, Thermo Scientific, EUA (3500 rpm, raio médio 124 mm) à temperatura de 25°C durante 10 minutos. O soro (sobrenadante) obtido foi acondicionado em microtubo de 1,5 mL previamente identificado e armazenado à temperatura de -20°C até a realização das análises (Figura 3.1).

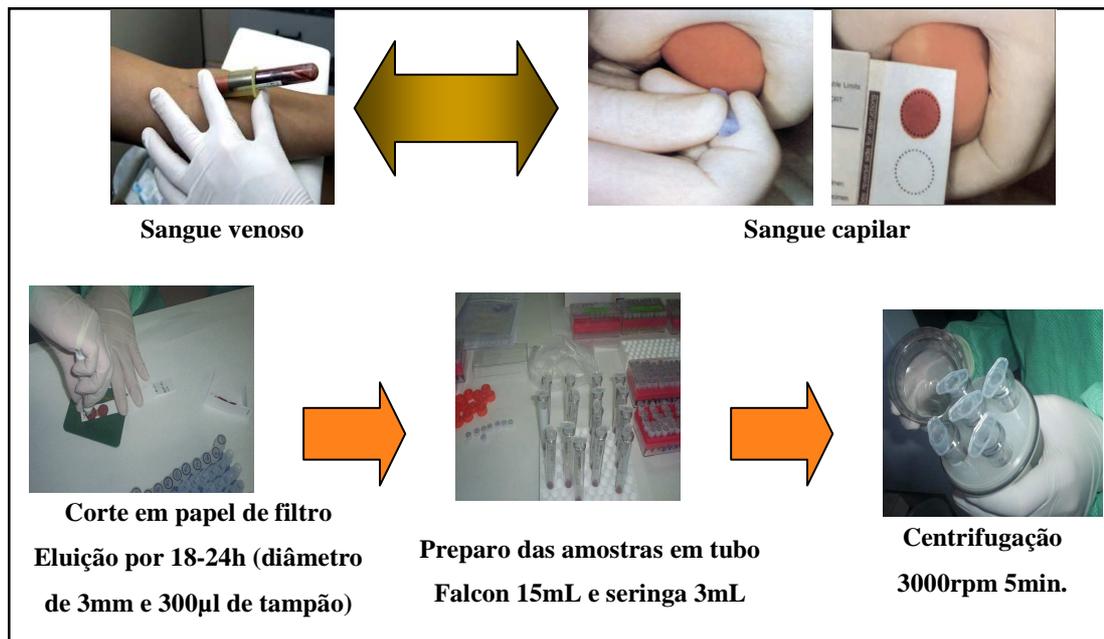


Figura 3.1- Coleta e preparo das amostras (Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais - LRNHV)

Para preparar o eluato, um disco de 3 mm de papel de filtro foi recortado, transferido para um microtubo e incubado por 18 a 24 horas com 300 µL do tampão de eluição à temperatura de 2-8°C (McCarron et al. 1999). Após incubação, uma ponteira de pipeta foi utilizada para transferir o disco e o tampão de eluição para o sistema de centrifugação correspondente. O sistema consistiu em um tubo de centrífuga de 15 mL de capacidade para conter um microtubo e uma seringa de 3 mL sem o êmbolo. As amostras foram centrifugadas a 1249,92 x g em centrífuga Biofuge® Primo, Thermo Scientific, EUA (3000 rpm, raio médio 124 mm) à temperatura ambiente de 25°C por 5 minutos. Os microtubos contendo os eluatos foram removidos do interior do tubo da centrífuga utilizando uma ponteira de pipeta e estocados a -20°C até o momento de uso (Figura 3.2) (Mercader et al. 2006).



Figura 3.2- Procedimento de eluição do SCPF (Fonte: Laboratório de Referência Nacional de Hepatites Virais - LRNHV)

3.4- Ensaio imunoenzimáticos

As amostras de soro foram submetidas a dois ensaios imunoenzimáticos comerciais para detecção de anticorpos anti-HCV: **HCV Ab** (Radim, Itália) e **ETI-AB-HCVK-4** (DiaSorin, Itália); e a dois ensaios imunoenzimáticos comerciais para detecção simultânea de antígeno e anticorpos anti-HCV: **Monalisa™ HCV Ag-Ab ULTRA** (Bio-Rad, França) e **Murex HCV Ag/Ab Combination**(Abbott, África do Sul).

3.5- Testes de detecção de anticorpos anti-HCV

3.5.1- Princípio dos testes de detecção de anticorpos anti-HCV

O teste de detecção de anticorpos anti-HCV HCV Ab baseia-se na ligação de anticorpos anti-HCV da amostra aos antígenos específicos do HCV, correspondente às regiões *core* e NS que codificam determinantes antigênicos mais conservados e imunodominantes (peptídeo *core* e peptídeos NS3, NS4 e NS5 recombinantes) que estão capturados na microplaca. Estes anticorpos se ligam aos anticorpos humanos policlonais (cabra), anti-imunoglobulinas G e M (IgG e IgM), conjugados com a enzima peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase* ou HRP) e em seguida, a peroxidase reage com o cromógeno (tetrametilbenzidina) / substrato (peróxido de hidrogênio), gerando um sinal óptico que é proporcional à quantidade de anticorpos anti-HCV presentes na amostra. O resultado final das amostras é dado em D.O. após leitura em espectrofotômetro.

No teste de detecção de anticorpos anti-HCV ETI-AB-HCVK-4, as microplacas são revestidas com polipeptídios recombinantes das regiões estrutural e não-estrutural do HCV (não discriminado na bula do teste) que se ligam aos anticorpos presentes na amostra. Estes se ligam ao conjugado enzimático composto de anticorpos IgG monoclonal murinos anti-IgG humana conjugada com peroxidase de rábano (HRP). A peroxidase reduz quimicamente o substrato peróxido de hidrogênio que, por sua vez, oxida o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), gerando cor. A intensidade da coloração amarela é proporcional a quantidade de anticorpos presentes e medida por um espectrofotômetro.

3.5.2- Procedimento dos testes de detecção de anticorpos anti-HCV

3.5.2.1- Teste HCV Ab

Para o teste de detecção de anticorpos anti-HCV (Radim), a primeira microcavidade (A1) permanece vazia para ser o branco. Nas outras cavidades, adiciona-se 200 µl de controle negativo em triplicata (B1-D1), 200 µl do calibrador em duplicata (E1-F1) e 200 µl de controle positivo em uniplicata (G1). Nas demais microcavidades (colunas 2-12), adiciona-se 20 µl do diluente de amostra e 10 µl da amostra de soro (Figura 3.3).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | BLK | S2 | | | | | | | | | | |
| B | NC | S3 | | | | | | | | | | |
| C | NC | S4 | | | | | | | | | | |
| D | NC | S5 | | | | | | | | | | |
| E | CAL | S6 | | | | | | | | | | |
| F | CAL | S7 | | | | | | | | | | |
| G | PC | S8 | | | | | | | | | | |
| H | S1 | S9 | | | | | | | | | | |

Legenda:**BLK = branco****NC = Controle Negativo****CAL = Calibrador****PC = Controle Positivo****S = Amostras**

Figura 3.3- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático HCV Ab (Radim, Itália)

Em seguida, acrescenta-se 50 µl do diluente de ensaio em todas as microcavidades e procede-se a incubação por 45 minutos a 37°C. Após a incubação, cada cavidade da microplaca é lavada 5 vezes com 350 µl de solução de lavagem (tampão de fosfato 10 mM a pH 7,0 +/-0,2, Tween 20 a 0,05% e Kathon GC a 0,05%). Em seguida, são adicionados 100 µl de conjugado enzimático em todas as microcavidades, exceto no branco, e realiza-se mais uma incubação por 45 minutos a 37°C.

Após a incubação, repete-se o procedimento de lavagem e adiciona-se 100 µl do cromógeno/substrato em cada microcavidade, incluindo o branco. A microplaca é incubada por 15 minutos a 18 a 24°C, protegida da luz. Em seguida, a reação é interrompida com 100 µl de ácido sulfúrico em cada microcavidade e a intensidade de cor da solução (amarelo) é medida em um espectrofotômetro com um filtro de 450nm com referência de 620-630nm (Figura 3.4).

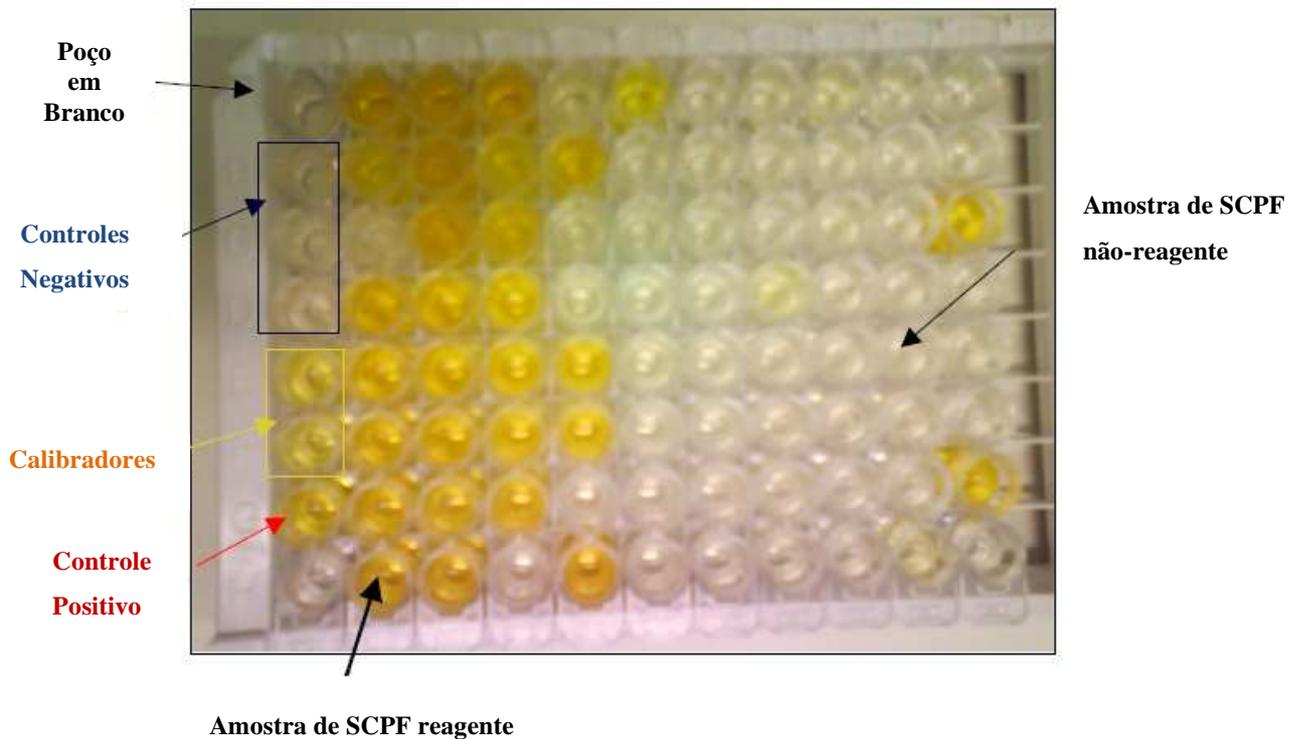


Figura 3.4- Placa de teste imunoenzimático para detecção de anticorpo anti-HCV HCV Ab (Radim, Itália)

3.5.2.1.a- Interpretação dos resultados:

Um valor de ponto de corte (PC) permite que as densidades ópticas sejam interpretadas como resultado da presença ou ausência de anticorpos anti-HCV. Este valor é calculado usando a seguinte fórmula: $CNX + 0,350$, onde CNX é a média das D.O.s dos controles negativos. Uma amostra é considerada positiva se a absorbância da amostra é maior do que o valor do ponto de corte; e negativa se a absorbância da amostra é menor que o valor do ponto de corte. Uma amostra é considerada inconclusiva quando apresenta valores de absorbância compreendidos na faixa de $\pm 10\%$ acima ou abaixo do ponto de corte.

3.5.2.2- Teste ETI-AB-HCVK-4

Para o teste de detecção de anticorpos anti-HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin), adiciona-se 200 μ L de diluente da amostra em todas as microcavidades. Em seguida, adiciona-se 20 μ L de controle negativo em três microcavidades (B1-D1), 20 μ L de controle positivo em duas

microcavidades (E1-F1) e 20 μ L da amostra em cada uma das demais microcavidades (Figura 3.5).

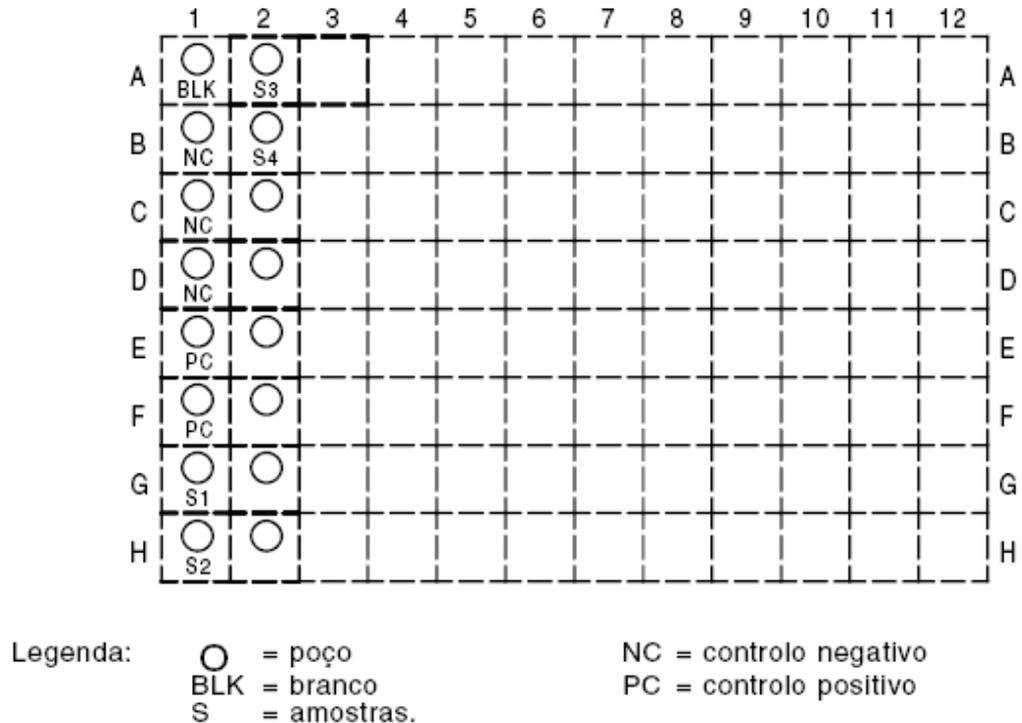


Figura 3.5- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália)

Na etapa seguinte, procede-se a incubação por 60 minutos a 37°C. Após incubação, cada microcavidade da microplaca é lavada 5 vezes com 350 μ L de solução de lavagem (a base de tampão PBS e Tween® 20 e conservantes). Segue-se a adição de 100 μ L de conjugado enzimático em todas as microcavidades e incuba-se por 60 minutos a 37°C. Após incubação, repete-se o procedimento de lavagem e adiciona-se 100 μ L do cromógeno/substrato em cada microcavidade, incluindo o branco. A microplaca é incubada por 30 minutos a 18 a 24°C, protegida da luz. Em seguida, a reação é interrompida com 100 μ L de ácido sulfúrico em cada microcavidade e a intensidade de cor (amarelo) da solução é medida a 450 nm em espectrofotômetro, com filtro de referência de 620-630 nm (Figura 3.6).

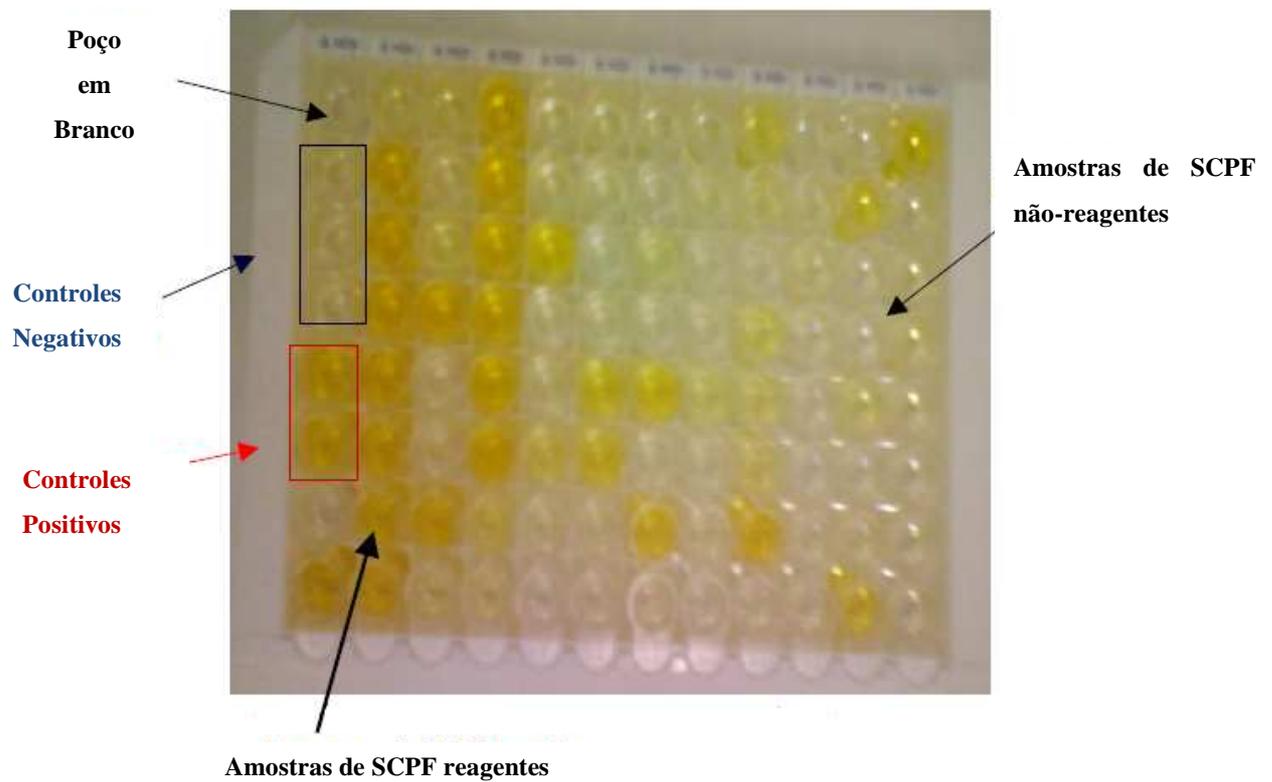


Figura 3.6- Placa de teste imunoenzimático para detecção de Ac. Anti-HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália)

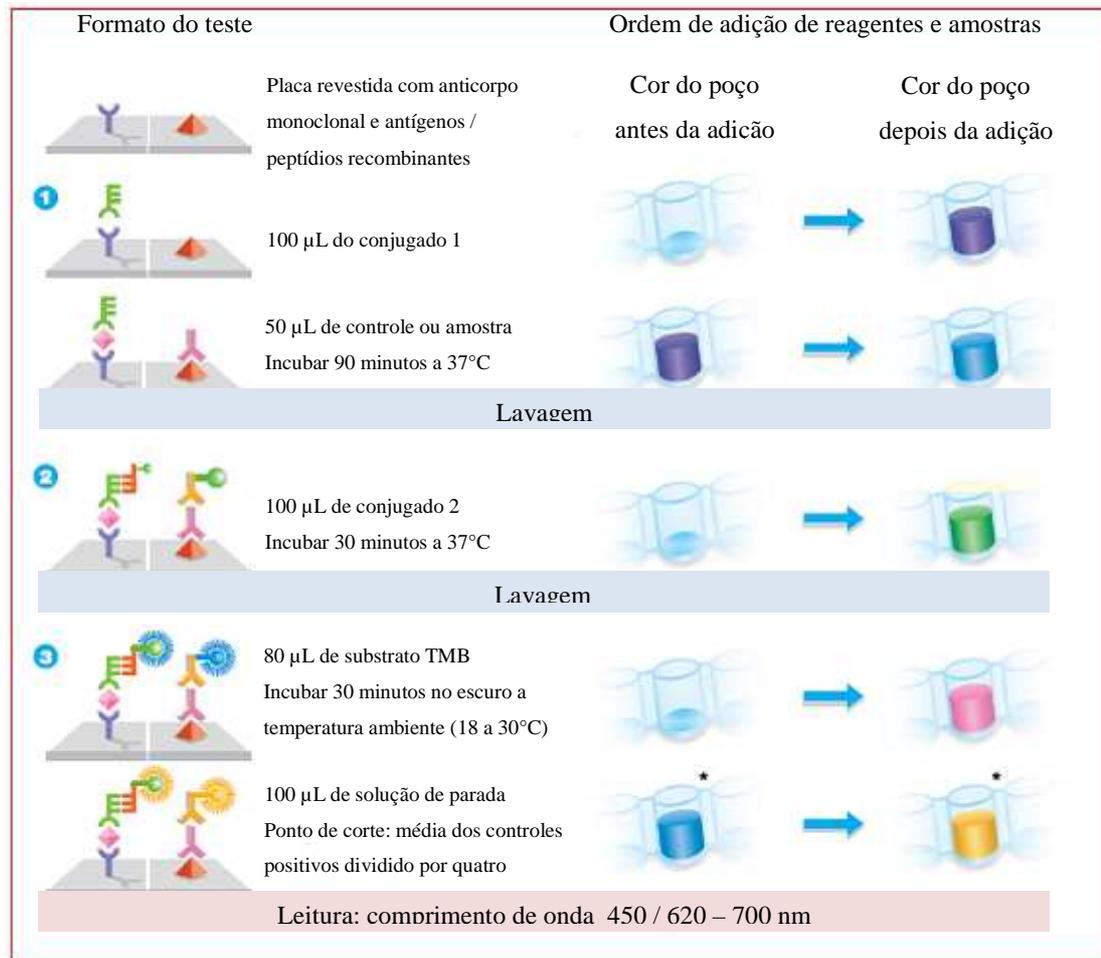
3.5.2.2.a- Interpretação dos resultados:

Um valor do ponto de corte permite que as densidades ópticas sejam interpretadas como resultado da presença ou ausência de anticorpos anti-HCV. Este valor é calculado usando a seguinte fórmula: $CNX + 0,500$, onde CNX é a média das D.O.s dos controles negativos. Uma amostra é considerada positiva se a absorbância da amostra é maior do que o valor do PC; e negativa se a absorbância da amostra é menor que o valor do PC. Uma amostra é considerada inconclusiva quando apresenta valores de absorbância situados na faixa de $\pm 10\%$ acima ou abaixo do PC.

3.6- Teste de detecção simultânea de anticorpos anti-HCV e antígeno do HCV

3.6.1- Princípio dos testes de detecção simultânea de anticorpos anti-HCV e antígeno do HCV

O teste de detecção de antígenos e anticorpos anti-HCV Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) baseia-se na ligação de anticorpos anti-HCV e antígenos presentes na amostra aos alvos presentes na microplaca (Figura 3.7). Os anticorpos da amostra se ligam às proteínas recombinantes correspondentes a região NS3 (genótipos 1 e 3a) e NS4, e a um peptídeo de mutação correspondente a região do capsídeo. Os antígenos do HCV da amostra se ligam aos anticorpos monoclonais específicos para o capsídeo do HCV fixado na microplaca, assim como ao conjugado 1 constituído de anticorpos monoclonais murinos específicos para o capsídeo viral marcados com biotina. O conjugado 1 não reage com os antígenos imobilizados na microplaca. Após a primeira incubação é adicionado o conjugado 2, constituído de anticorpos murinos anti-IgG humana marcados com peroxidase e estreptavidina marcada com peroxidase. Os anticorpos anti-HCV presentes na amostra se ligam aos anticorpos anti-IgG marcados com peroxidase. O conjugado peroxidase/estreptavidina se liga a biotina do conjugado 1, em caso de presença do antígeno viral na amostra. A ocorrência dos complexos antígeno/ anticorpo / peroxidase é revelada pela adição e oxidação do cromógeno tetrametilbenzidina. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de anticorpos e antígenos presentes e a leitura da densidade ótica de cada amostra é medida em um espectrofotômetro a 450/620 nm.



-  Anticorpo monoclonal anti-capsídeo do HCV
-  Peptídeo mutado do capsídeo, proteína recombinante NS3 (genótipos 1 e 3) e proteína NS4 recombinante
-  Anticorpo monoclonal anti-capsídeo do HCV biotilado
-  Streptavidina ligada a peroxidase
-  Anticorpo anti-IgG humana ligado a peroxidase
- * Amostras reativas após 30 minutos de incubação

Figura 3.7- Desenho esquemático do teste Monalisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (adaptado de Bio-Rad, França)

No teste de detecção de anticorpos anti-HCV e antígenos do HCV Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott), as microplacas são revestidas com anticorpos monoclonais anti-*core*, antígenos e peptídeos recombinantes representando regiões imunodominantes dos antígenos *core* e NS3 do HCV. Os antígenos do *core* viral e/ou anticorpos estão fixados a fase sólida da

microplaca. Em seguida, o conjugado constituído por epítomos antigênicos das regiões NS3 e core e anticorpos monoclonais anti-*core* ligados a peroxidase se ligam a qualquer antígeno do *core* ou anticorpos anti-HCV presentes na amostra. O complexo formado reage com o substrato tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio alterando a cor (Figura 3.8). A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de anticorpos e antígenos presentes e é medida em um espectrofotômetro.

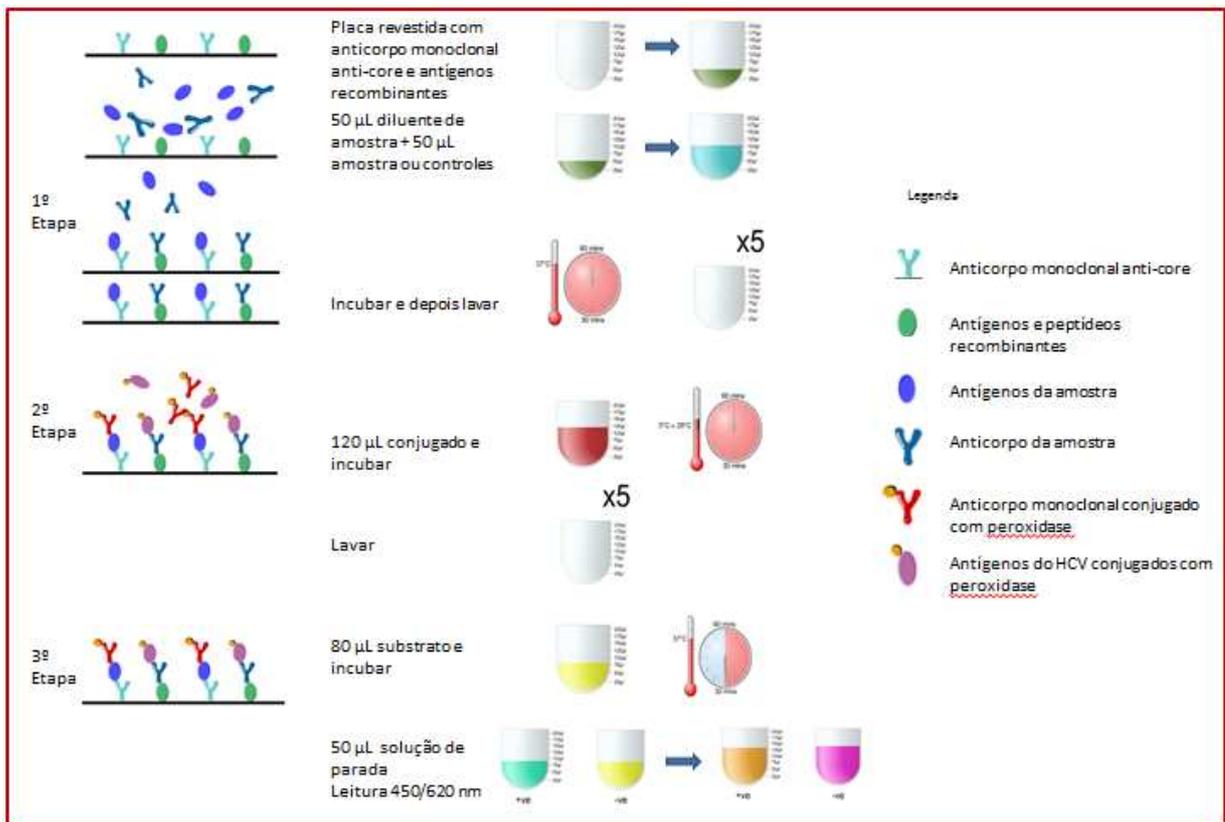


Figura 3.8- Desenho esquemático do teste Murex HCV Ag/Ab Combination (adaptado de Abbott, África do Sul)

3.6.2- Procedimento dos testes de detecção simultânea de anticorpos anti-HCV e antígenos do HCV

3.6.2.1- Teste Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA

No teste de detecção simultânea de antígenos e anticorpos anti-HCV Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad), adiciona-se 100 µL do conjugado 1 em todas as cavidades, e 50 µL de

amostra e 50 μL de controles nas respectivas cavidades. Para cada corrida, é utilizado controle negativo em uniplicata, controle positivo de anticorpos em triplicata e controle positivo de antígeno em uniplicata (Figura 3.9).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | CN | S4 | | | | | | | | | | |
| B | CP | S5 | | | | | | | | | | |
| C | CP | S6 | | | | | | | | | | |
| D | CP | S7 | | | | | | | | | | |
| E | SACP | S8 | | | | | | | | | | |
| F | S1 | S9 | | | | | | | | | | |
| G | S2 | S10 | | | | | | | | | | |
| H | S3 | S11 | | | | | | | | | | |

Legenda:

CN = Controle negativo

CP = Controle positivo

SACP = Solução de trabalho do antígeno de controle positivo

S = Amostras

Figura 3.9- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, França)

Em seguida, realiza-se incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 90 ± 5 minutos e procede-se a lavagem cinco vezes com um mínimo de 370 μL de solução de lavagem [tampão Tris (hidroximetilaminometano) / NaCl pH 7,4 com o conservante Proclin™ 300 (0,04%)]. Logo após, adiciona-se 100 μL de conjugado 2 e incuba-se por 30 ± 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Realiza-se nova lavagem como descrito anteriormente e adiciona-se 80 μL de substrato / cromógeno. Após 30 ± 5 minutos de incubação à temperatura ambiente (18 a 30°C), a reação é interrompida com 100 μL de ácido sulfúrico 1N e a leitura é feita por espectrofotometria a 450 com filtro de referência de 620 a 700nm. A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de anticorpos e /ou antígenos ligados na fase sólida (Figura 3.10).

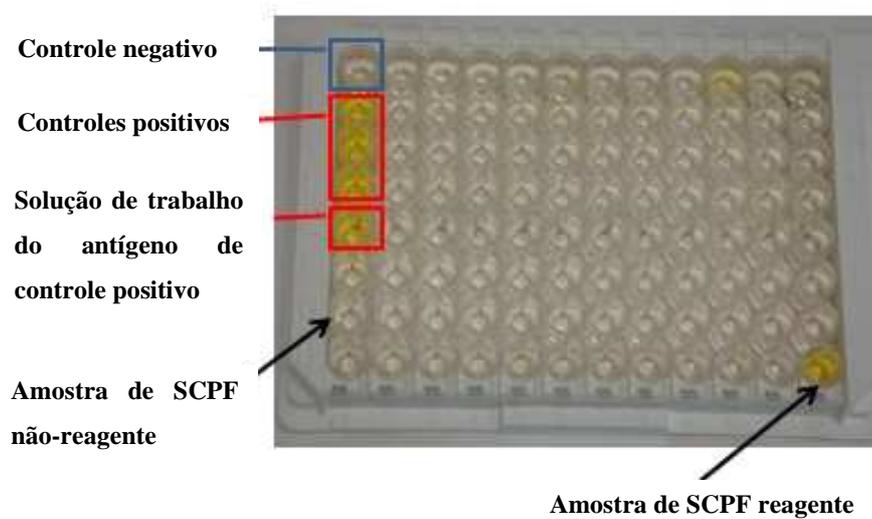


Figura 3.10- Placa de teste imunoenzimático para detecção de Ag/Ac. Anti-HCV Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, Itália)

3.6.2.1.a- Interpretação dos resultados:

Um valor de ponto de corte permite que as densidades ópticas sejam interpretadas como resultado da presença ou ausência de antígenos e anticorpos anti-HCV. Este valor é calculado usando a seguinte fórmula: $CPX \div 4$, onde CPX é a média das D.O.s dos controles positivos. Uma amostra é considerada positiva se a absorvância da amostra é maior do que o PC; e negativa se a absorvância da amostra é menor que o PC. No entanto, valores de absorvância compreendidos da faixa de $\pm 10\%$ do PC são classificados como inconclusivos.

3.6.2.2- Teste Murex HCV Ag/Ac Combination

No teste de detecção simultânea de antígenos e anticorpos anti-HCV Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott), adiciona-se 50 μ L do diluente de amostra em todas as cavidades, e 50 μ L de amostra e 50 μ L de controles nas respectivas cavidades. Para cada corrida, são utilizados: controle negativo em duplicata, controle positivo de anticorpos em uniplicata e controle positivo de antígeno em uniplicata (Figura 3.11).

Em seguida, a reação é incubada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Realiza-se a lavagem por cinco vezes com 500 μL de tampão de lavagem (tampão Tween® 20/NaCl e conservante Bronidox® 0,2%).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | CN | S4 | | | | | | | | | | |
| B | CN | S5 | | | | | | | | | | |
| C | CP | | | | | | | | | | | |
| | Ac | S6 | | | | | | | | | | |
| D | CP | | | | | | | | | | | |
| | Ag | S7 | | | | | | | | | | |
| E | B | S8 | | | | | | | | | | |
| F | S1 | S9 | | | | | | | | | | |
| G | S2 | S10 | | | | | | | | | | |
| H | S3 | S11 | | | | | | | | | | |

Legenda:

CN = Controle negativo

CP Ac = Controle positivo de anticorpo

CP Ag = Controle positivo de antígeno

B = Branco

S = Amostras

Figura 3.11- Representação esquemática de microplaca do ensaio imunoenzimático Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)

Depois, adiciona-se 120 μL de conjugado e procede-se nova incubação a 15 a 28°C por 60 minutos. Realiza-se nova lavagem e adiciona-se 80 μL da solução de substrato diluída. Após incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos protegido da luz, a reação é interrompida com 50 μL de solução de parada (ácido sulfúrico 1N). A leitura da reação é feita em espectrofotômetro na absorbância de 450 nm usando filtro de referência de 620 a 690 nm (Figura 3.12).

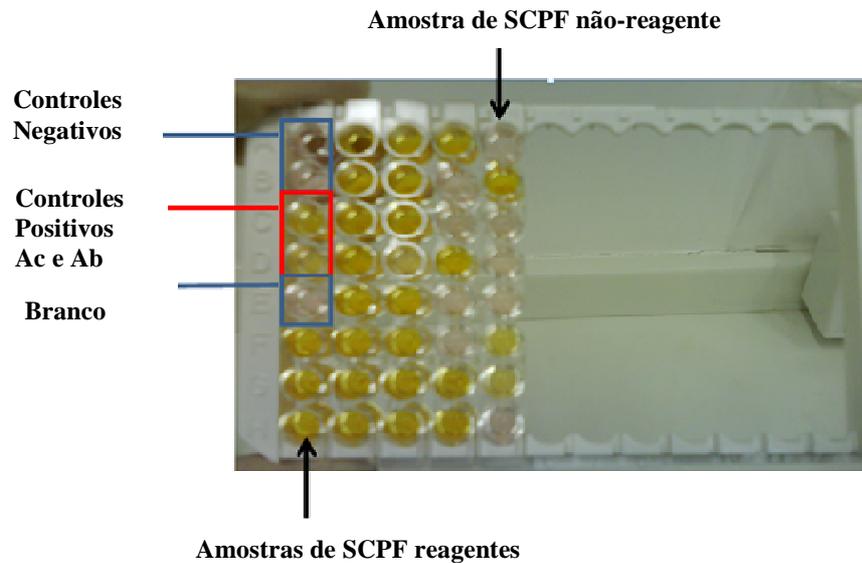


Figura 3.12- Placa de teste imunoenzimático para detecção de Ag/Ac. Anti-HCV Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)

3.6.2.2.a- Interpretação dos resultados:

O ponto de corte permite que as densidades ópticas sejam interpretadas como resultado da presença ou ausência de anticorpos anti-HCV e antígenos HCV. O PC é calculado usando a seguinte fórmula: $CNX + 0,200$, onde CNX é a média das D.O.s dos controles negativos. Uma amostra é considerada positiva se a absorvância da amostra é maior do que o PC; e negativa se a absorvância da amostra é menor que o PC. No entanto, valores de absorvância compreendidos da faixa de $\pm 10\%$ do PC são classificados como inconclusivos.

3.7- Parâmetros avaliados para os testes de diagnóstico da infecção pelo HCV em SCPF

Para esta avaliação, foi utilizado um painel de 10 amostras de SCPF, onde cinco apresentavam resultados reagentes para anti-HCV na amostra pareada de soro e as outras cinco eram não-reagentes em amostras pareadas de soro. Todos os ensaios realizados nas amostras de soro foram feitos de acordo com as instruções dos fabricantes.

Inicialmente, foram avaliados os seguintes parâmetros dos ensaios: tipo de tampão de eluição, volume de amostra utilizado no teste, tempo de incubação da amostra, volume de conjugado e valor de ponto de corte.

3.7.1- Padronização do tampão de eluição da amostra

Para a definição do tampão de eluição das amostras de SCPF a ser empregado nos ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos anti-HCV, e detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV foram empregados cinco diferentes tipos de tampão no volume de 300 µl, sendo eles: Tampão 1 (PBS pH 7,2) Tampão 2 (PBS/ Tween[®] 20 0,05%); Tampão 3 (PBS/ Tween[®] 20 0,05%/ Azida Sódica 0,005%); Tampão 4 (PBS/ Tween[®]20 0,2%/ BSA 5%) e Tampão 5 (PBS/ BSA 0,5%). Os volumes de amostras de SCPF e diluentes utilizados nos testes de padronização foram, respectivamente 110 µl e 100 µl para Radim e 200 µl e 20 µl para DiaSorin. Para os experimentos de padronização do teste de detecção do antígeno do HCV e anticorpos anti- HCV dos fabricantes Bio-Rad e Abbott, o volume de amostra de SCPF foi de 100 µL sem diluente de amostra.

3.7.2- Padronização do volume de amostra empregado no teste

Para a definição do volume de amostra de SCPF a ser empregado nos ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos anti-HCV, foram usadas diferentes concentrações de amostra tal como descrito nas tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1- Volumes de amostra de SCPF e de diluente da amostra usados no teste de detecção de anticorpos anti-HCV HCV Ab (Radim).

| | Volume de amostra (µL) | Volume de diluente (µL) | Fator de diluição |
|-------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Radim | 10 | 200 | 1:20 |
| | 60 | 150 | 1:2,5 |
| | 110 | 100 | 1,1:1 |
| | 160 | 50 | 3,2:1 |
| | 200 | 10 | 20:1 |

Os volumes especificados pelo fabricante para as amostras de soro e diluente em teste são, respectivamente, 10 µL e 200 µL.

Tabela 3.2- Volumes de amostra de SCPF e de diluente da amostra usados no teste de detecção de anticorpos anti-HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin).

| | Volume de amostra (μL) | Volume de diluente | Fator de diluição |
|----------|-------------------------------------|--------------------|-------------------|
| DiaSorin | 176 | 44 | 4:1 |
| | 198 | 22 | 9:1 |
| | 200 | 20 | 10:1 |
| | 250 | 5 | 50:1 |

Os volumes especificados pelo fabricante para as amostras de soro e diluente em teste são, respectivamente, 20 μL e 200 μL .

Para o teste de detecção simultânea do antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV do fabricante Bio-Rad foram usados os seguintes volumes: 50 μL , 100 μL , 150 μL e 200 μL , todos sem o uso de diluente de amostra. Esses volumes correspondem a um aumento de 2x, 3x e 4x em relação ao volume de soro em teste padronizado (50 μL) pelo fabricante.

Para a detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV do fabricante Abbott, foram usados os seguintes volumes: 50 μL , 100 μL , 150 μL e 200 μL , todos sem uso de diluente de amostra. Os volumes especificados pelo fabricante para as amostras de soro e diluente em teste são, respectivamente, 50 μL e 50 μL . Os volumes das amostras de SCPF correspondem a um aumento de 2x, 3x e 4x em relação ao volume soro em teste padronizado pelo fabricante.

3.7.3- Padronização do tempo de incubação da amostra

Após a determinação do tampão de eluição da amostra e do volume de amostra em teste, foi avaliado o tempo de incubação da amostra nos ensaios imunoenzimáticos. Em todos os ensaios, foi avaliado o tempo de incubação recomendado pelo fabricante, assim como o tempo duplicado e 18 a 24 horas de incubação.

Deste modo, os tempos avaliados para os diferentes ensaios foram:

- no teste anti-HCV Radim - 45 minutos, 90 minutos e 18 a 24 horas;
- no teste anti-HCV DiaSorin - 60 minutos, 120 minutos e 18 a 24 horas;
- no teste de detecção de antígeno e anticorpos anti-HCV da Bio-Rad - 90 minutos, 180 minutos e 18 a 24h;
- no teste de detecção de antígeno e anticorpos anti-HCV da Abbott - 60 minutos, 120 minutos e 18 a 24h.

3.7.4- Padronização do volume de conjugado empregado no teste

Com o intuito de observar se a variação do volume do conjugado aplicado no teste após a primeira incubação ocasionaria melhores resultados finais de densidade óptica ou que fossem mais concordantes com os valores de soro, foram testados nos EIE comerciais dos fabricantes Radim, DiaSorin, Bio-Rad e Abbott diferentes volumes de conjugado. O protocolo aplicado para realização desse teste foi modificado apenas na quantidade de volume de amostra de SCPF e diluente de acordo com os volumes estabelecidos na padronização de volume de amostra, que foram, respectivamente, 110 μL e 100 μL (Radim), 200 μL e 20 μL (DiaSorin) e 200 μL sem diluente (Bio-Rad e Abbott). Os volumes de conjugado foram aumentados em 50%, 100%, 150% e 200% em relação aos preconizados pelos fabricantes, e estão representados na tabela 3.3:

Tabela 3.3- Volumes de conjugado usados nos testes de padronização para amostras de SCPF eluídas.

| Amostras | Volume de Conjugado (μL) | | | | Abbott |
|-------------|---------------------------------------|----------|------------------------|------------------------|--------|
| | Radim | DiaSorin | Bio-Rad Conjugado 1 | Bio-Rad Conjugado 2 | |
| Soro | 100 | 100 | 100 | 100 | 120 |
| SCPF | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |

3.7.5- Cálculo do valor de ponto de corte do ensaio

Para a avaliação do ponto de corte (PC) do teste, foram comparados os resultados obtidos entre as amostras pareadas de soro e SCPF do estudo. Para o cálculo do valor do ponto de corte foram avaliados três métodos:

- PC1, onde as recomendações do fabricante foram utilizadas para o cálculo do ponto de corte;
- PC2, no qual três desvios padrões foram somados ao valor da média da densidade óptica das amostras de SCPF, correspondentes às amostras de soro negativas para o marcador em teste (média + 3 desvios padrões - DP) conforme Parker et al. (1999); e

- PC3, em que a análise da curva característica recebida pelo operador (curva ROC) foi utilizada tal como descrito por Jekel et al. (1999) e Crowther et al. (2001). Trata-se de uma ferramenta para medir e especificar problemas no desempenho do teste diagnóstico por permitir estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte. É um gráfico de sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos *versus* taxa de falsos positivos) onde a linha diagonal corresponde a um teste positivo ou negativo, aleatoriamente (Figura 3.13). A curva permite evidenciar valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade, isto é, o ponto em que está mais próxima do canto superior esquerdo do diagrama, uma vez que o índice de verdadeiros positivos é 1 e o de falsos positivos é zero (Margotto 2011). O PC selecionado será o que fornecer melhores valores de sensibilidade e especificidade.

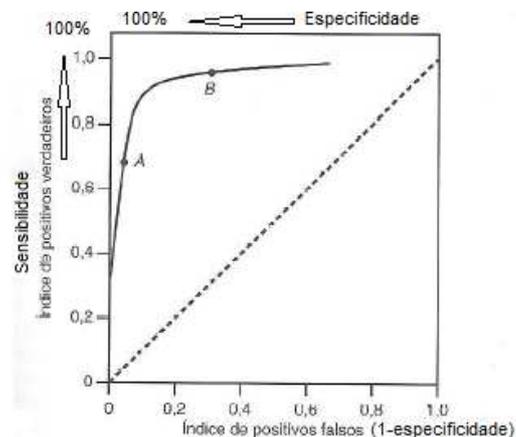


Figura 3.13- Curva característica recebida pelo operador – ROC (Adaptado de Margotto 2011)

3.8- Avaliação do desempenho do teste

Após o estabelecimento do ponto de corte, foram avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade, concordância, limite de detecção e precisão intraensaio (repetitividade) e interensaio (reprodutibilidade).

Para a avaliação da sensibilidade, especificidade e concordância, foram utilizadas amostras pareadas de soro e SCPF obtidas da amostra populacional estudada, provenientes de indivíduos reagentes e não-reagentes cujas amostras de soro foram confirmadas pelos quatro testes de diagnóstico empregados para detecção de anticorpos anti-HCV e detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV. As amostras reagentes nos testes imunoenzimáticos

foram submetidas ao teste de detecção qualitativa de RNA do HCV (Amplicor HCV 2.0, Roche Diagnostics) para satisfazer o critério de caso confirmado do Ministério da Saúde. Os resultados obtidos no SCPF foram comparados com os resultados das respectivas amostras de soro.

3.8.1- Limite de detecção da amostra de SCPF

O limite de detecção (LD), segundo a Resolução nº 899/03, corresponde a menor concentração de um analito que o procedimento analítico consiga diferenciar confiavelmente.

Para avaliar o limite de detecção do teste, amostras de sangue total reagentes para anti-HCV e para detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV foram diluídas no fator 10 em sangue total não-reagente.

Para essa análise, o SCPF foi obtido de duas formas distintas: sangue capilar por punção digital coletado diretamente em papel de filtro e sangue venoso obtido em tubo *vacutainer* sem anticoagulante. Para a coleta do sangue capilar, foram aplicadas três gotas de sangue em cada círculo e para o sangue obtido por punção venosa, foram aplicados 75 µl de sangue em cada círculo de 12,5 mm do papel com auxílio de micropipeta.

As duas amostras de SCPF foram cortadas e eluídas conforme o protocolo padronizado e, em seguida, foram artificialmente infectadas com uma amostra de soro reagente para anti-HCV definida como controle de qualidade interno do LRNHV. Esta amostra apresenta valor de D.O. para anti-HCV acima de 3,0 e foi diluída em concentrações que variaram de 10^1 a 10^{10} . Cada uma das amostras foi testada com o método otimizado para SCPF nos ensaios imunoenzimáticos comerciais para detecção do anti-HCV dos fabricantes Radim e DiaSorin e para detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV da Bio-Rad e Abbott.

3.8.2- Precisão da amostra de SCPF

O Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) desenvolveu o documento EP5-A2 que define precisão como uma concordância entre os resultados de medidas independentes sob condições estipuladas. A precisão intraensaio ou repetitividade de resultados corresponde à concordância entre resultados de sucessivas medidas do mesmo analito, obtidos sob as mesmas condições de medida. A precisão interensaio ou reprodutibilidade de resultados consiste na concordância entre os resultados de sucessivas

medidas do mesmo analito sob condições de medidas alteradas (ex. tempo, operador, calibrador, reagentes e laboratório).

Para avaliar a precisão, a amostra de SCPF foi preparada da mesma forma como descrita para o estudo do limite de detecção, mas usando apenas sangue venoso.

O CLSI EP05-A2 recomenda um estudo de precisão preliminar com os materiais em ao menos duas concentrações em uma única corrida com 20 replicatas. As medidas de variabilidade (variância - V, desvio-padrão - DP e coeficiente de variação - CV) podem indicar alguma discrepância frente ao esperado e necessidades de ajustes antes de prosseguir o estudo. O DP calculado, multiplicado por um fator de significância - FS (5,5 para 99,9 % de nível de confiança) fornece um valor que determina a diferença máxima entre as replicatas de cada corrida. Quando a diferença entre um par de dados for superior a este valor, estes são excluídos do experimento, tendo o cuidado para não rejeitar mais de 5% das corridas.

Para o estudo preliminar foram preparadas duas amostras reagentes para anti-HCV com concentrações distintas, sendo 10^1 a positiva forte e 10^3 a positiva fraca. Em uma única corrida foram realizadas 8 repetições para cada teste. Com os resultados de densidade óptica obtidos foram calculados: média, desvio-padrão, coeficiente de variação e a diferença máxima entre as replicatas de cada corrida através da multiplicação do desvio-padrão e o fator de significância de 5,5 para 99,9 % de nível de significância.

Para o estudo de precisão intraensaio ou repetitividade foram preparadas duas amostras reagentes para anti-HCV com concentrações distintas, sendo 10^1 a positiva forte e 10^3 a positiva fraca. Em uma única corrida foram realizadas 20 repetições para cada teste. Os testes foram realizados de maneira idêntica, no mesmo equipamento, com os mesmos reagentes, mesmo lote e pelo mesmo operador.

Para o estudo de precisão interensaio ou reprodutividade foram preparadas duas amostras reagentes para anti-HCV com concentrações distintas, sendo 10^1 a positiva forte e 10^3 a positiva fraca. A cada dia foram realizadas 10 análises totalizando 20 repetições para cada teste. Os testes foram realizados de maneira idêntica, no mesmo equipamento, com os mesmos reagentes e mesmo lote, porém, com operador e em dias diferentes.

Os resultados foram comparados aos pares, o primeiro com o segundo, o terceiro com o quarto, e assim sucessivamente até o último par. O par que obteve diferença superior à diferença máxima estabelecida no estudo preliminar através da multiplicação do DP e FS foi rejeitado até o limite de 5% do total de amostras, ou seja, 1 par em 20 amostras.

3.9- Estabilidade da amostra de sangue coletado em papel de filtro

A fim de avaliar a estabilidade do SCPF para a detecção dos marcadores sorológicos para o HCV, as amostras de SCPF previamente selecionadas, analisadas e com valores de D.O.s conhecidos foram armazenadas em temperatura ambiente (22°C a 26°C), geladeira (2°C a 8°C) e câmara fria (-20°C).

Para este estudo, foram obtidas três amostras de SCPF reativas e três amostras de SCPF não reativas para cada marcador avaliado (Oliveira e Mendes, 2010). As amostras estocadas foram testadas em duplicata em períodos de 7, 14, 28, 60 e 117 dias, e os resultados médios foram analisados frente à perda percentual da concentração obtida no tempo um.

3.10- Análise dos dados

Os dados demográficos e os dados obtidos dos resultados dos ensaios imunoenzimáticos foram codificados e digitados em um banco de dados criado no programa Microsoft Excel XP. A análise estatística descritiva foi realizada com cálculo de médias, frequências e intervalos de confiança (IC) de 95%.

Para a comparação de prevalências utilizou-se o teste qui-quadrado para amostras independentes com correção de Yates e, quando apropriado, o teste exato de Fisher. As variáveis quantitativas com distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) foram analisadas através do teste t de Student (bicaudal). A correlação entre variáveis foi analisada através do coeficiente de Spearman.

Nos testes de padronização utilizou-se a análise da variância de fator único para os valores que tinham distribuição normal e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. Quando os testes não apresentavam distribuição normal, utilizou-se o pós-teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o teste de comparação múltipla de Dunn.

Toda a análise estatística, incluindo os cálculos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e concordância dos testes diagnósticos, foram realizados usando-se os programas GraphPad InStat® 3.01(GraphPad software, San Diego, CA) e MedCalc (version 9.2.1.0, MedCalc Software, Bélgica). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo).

4- RESULTADOS

4.1-Amostra populacional

Durante o período de janeiro de 2009 a março de 2010 foram coletadas 411 amostras pareadas de soro e SCPF, obtidas de forma consecutiva, de indivíduos procedentes do Serviço de Hemoterapia / HFSE, de um hospital privado de Petrópolis (RJ), do Ambulatório de Hepatites Virais do LAHEP (IOC/Fiocruz) e do Ambulatório de Gastroenterologia do HUCFF / UFRJ, como demonstra a figura 4.1.

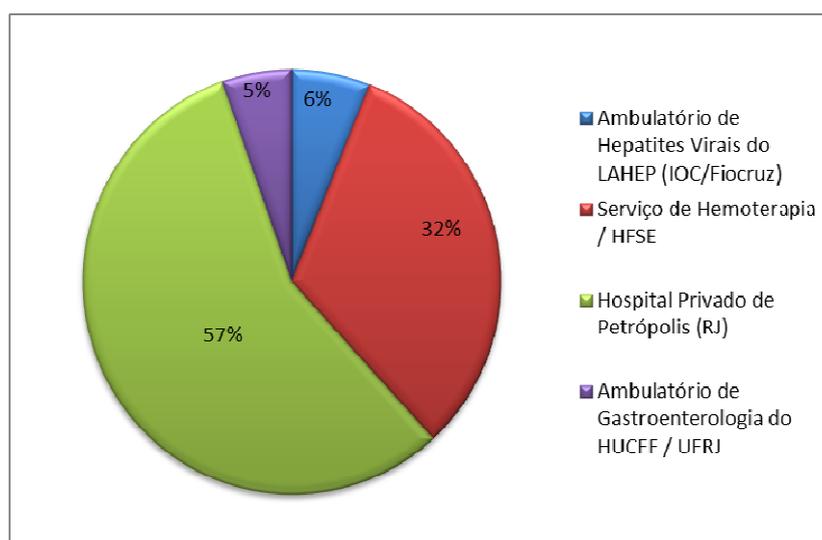


Figura 4.1- Distribuição dos locais de captação de voluntários para de coleta de amostra de soro e SCPF.

O percentual dos indivíduos incluídos no estudo correspondeu a 56,2% do sexo feminino e 43,8% do sexo masculino. Grande parte dos participantes apresenta idade entre 21 e 60 anos (359/411), sendo esta distribuição pouco variável nas faixas etárias de 21 a 30 anos, 31 a 40 anos, 41 a 50 anos e 51 a 60 anos (Tabela 4.1). A média de idade dos participantes foi de 40 anos (± 14 anos).

Tabela 4.1- Distribuição da amostra populacional estudada de acordo com faixa etária e sexo.

| Faixa etária (anos) | Sexo feminino n(%) | Sexo masculino n(%) | Total n(%) |
|---------------------|--------------------|---------------------|------------|
| 18 —20 | 11 (2,7) | 11 (2,7) | 22 (5,4) |
| 21 —30 | 62 (15,1) | 45 (11,0) | 107 (26,1) |
| 31 —40 | 49 (11,9) | 40 (9,7) | 89 (21,6) |
| 41 —50 | 52 (12,6) | 37 (9,0) | 89 (21,6) |
| 51 —60 | 43 (10,5) | 31 (7,5) | 74 (18,0) |
| ≥61 | 14 (3,4) | 16 (3,9) | 30 (7,3) |
| Total n (%) | 231 (56,2) | 180 (43,8) | 411 (100) |

n: número de pessoas

4.2- Padronização do tampão de eluição

Para análise do tampão de eluição foram avaliadas 10 amostras de SCPF, sendo que 5 eram reagentes e 5 não-reagentes para todos os marcadores para HCV nas amostras de soro. As amostras de SCPF foram testadas em cinco diferentes tampões de eluição (T1, T2, T3, T4 e T5). A média das densidades ópticas fornecidas pelo espectrômetro de leitura vertical (450 nm e 620-630 nm) foi usada para a comparação ao fim do teste.

Ao analisar o fator obtido através da razão entre a média da D.O. das amostras reagentes e não-reagentes no teste do fabricante Radim observou-se que o tampão T5 apresentou maior discrepância (fator 31), ou seja, maior afastamento entre os valores das amostras reagentes e não-reagentes, favorecendo uma caracterização melhor do resultado. Esta diferença não foi estatisticamente significativa quando as amostras reagentes ($p = 0,8802$) foram avaliadas isoladamente, porém, foi extremamente significativa para as amostras não-reagentes ($p < 0,0001$). Estabeleceu-se, então, o T5 como tampão de eluição do teste (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE HCV Ab (Radim) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes.

| Tipo de amostra | D.O. Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|---|--------------------------------------|---|
| Soro | 0,036 | 3,000 | 83 |
| SCPF: | | | |
| T1 | 0,206 | 2,570 | 12 |
| T2 | 0,165 | 2,657 | 16 |
| T3 | 0,124 | 2,610 | 21 |
| T4 | 0,111 | 2,869 | 26 |
| T5 | 0,086 | 2,697 | 31 |

Tampão 1 (PBS pH 7.2); Tampão 2 (PBS/ Tween@20 0,05%); Tampão 3 (PBS/ Tween@20 0,05%/ Azida Sódica 0,005%); Tampão 4 (PBS/ Tween@20 0,2%/BSA 5%) e Tampão 5 (PBS/ BSA 0,5%). D.O., densidade óptica. *p*-valor: <0,0001(SCPF não-reagente); 0,8802 (SCPF reagente). SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Para o ensaio DiaSorin a análise do fator obtido através da razão entre a média da D.O. das amostras reagentes e não-reagentes revelou que o tampão T1 apresentou melhor desempenho (fator 49) em relação aos demais tampões, um fator mais próximo ao fator obtido com o soro quando comparado ao Radim (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes.

| Tipo de amostra | D.O. Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|---|--------------------------------------|---|
| Soro | 0,040 | 3,000 | 75 |
| SCPF: | | | |
| T1 | 0,038 | 1,848 | 49 |
| T2 | 0,049 | 1,758 | 36 |
| T3 | 0,046 | 2,054 | 45 |
| T4 | 0,059 | 1,814 | 31 |
| T5 | 0,048 | 1,648 | 35 |

Tampão 1 (PBS pH 7.2); Tampão 2 (PBS/ Tween@20 0,05%); Tampão 3 (PBS/ Tween@20 0,05%/ Azida Sódica 0,005%); Tampão 4 (PBS/ Tween@20 0,2%/BSA 5%) e Tampão 5 (PBS/ BSA 0,5%). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Após a análise do fator obtido através da razão entre a média de D.O. das amostras reagentes e não-reagentes no teste do fabricante Bio-Rad, o tampão T4 apresentou maior discrepância (fator 21) entre os resultados. Esta diferença foi estatisticamente significativa para as amostras reagentes ($p = 0,0002$). Para as amostras não-reagentes não houve diferença significativa entre os tampões analisados ($p = 0,275$). Neste caso, o T4 apresentou melhor desempenho entre os tampões de eluição (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-rad) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes.

| Tipo de amostra | D.O. Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O. Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O. Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|---|---------------------------------------|--|
| Soro | 0,040 | 1,932 | 48 |
| SCPF: | | | |
| T1 | 0,045 | 0,726 | 16 |
| T2 | 0,048 | 0,729 | 15 |
| T3 | 0,043 | 0,678 | 16 |
| T4 | 0,041 | 0,871 | 21 |
| T5 | 0,048 | 0,712 | 15 |

Tampão 1 (PBS pH 7.2); Tampão 2 (PBS/ Tween@20 0,05%); Tampão 3 (PBS/ Tween@20 0,05%/ Azida Sódica 0,005%); Tampão 4 (PBS/ Tween@20 0,2%/BSA 5%) e Tampão 5 (PBS/ BSA 0,5%).

p -valor: 0,275 (SCPF não-reagente); 0,0002 (SCPF reagente). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Com base na análise do fator obtido através da razão entre a média de D.O. das amostras reagentes e não-reagentes no teste do fabricante Abbott, os tampões T4 e T5 apresentaram o mesmo valor (fator 13) com a maior discrepância em relação aos demais tampões. Na análise estatística, tanto as amostras reagentes quanto as não-reagentes apresentaram diferença estatística significativa, sendo, respectivamente $p = 0,0003$ e $p < 0,0001$ (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Médias de densidades ópticas obtidas pelo EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) nas amostras de sangue coletado em papel de filtro eluídas com diferentes tampões e as amostras de soro correspondentes.

| Tipo de amostra | D.O. Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|---|--------------------------------------|---|
| Soro | 0,132 | 2,879 | 22 |
| SCPF: | | | |
| T1 | 0,225 | 1,533 | 7 |
| T2 | 0,948 | 2,081 | 2 |
| T3 | 0,160 | 1,449 | 9 |
| T4 | 0,119 | 1,525 | 13 |
| T5 | 0,115 | 1,453 | 13 |

Tampão 1 (PBS pH 7.2); Tampão 2 (PBS/ Tween@20 0,05%); Tampão 3 (PBS/ Tween@20 0,05%/ Azida Sódica 0,005%); Tampão 4 (PBS/ Tween@20 0,2%/BSA 5%) e Tampão 5 (PBS/ BSA 0,5%).

p-valor: <0,0001 (SCPF não-reagente); 0,0003 (SCPF reagente). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Visto que não foi observado um consenso entre os diferentes tampões e, T4 e T5 apresentaram um melhor desempenho em dois do total de quatro ensaios, foi implementado um protocolo único de eluição com a padronização do tampão T5 (PBS/BSA 0,5%), pois este tampão já era utilizado em nosso laboratório para eluição de amostras de SCPF no diagnóstico de marcadores para hepatite B.

4.3-Padronização do volume de amostra (eluato)

Para as análises do volume de amostra (eluato) e diluente foram considerados os resultados de densidade óptica fornecidos pelo espectrômetro de leitura vertical (450 nm e 620-630 nm) ao fim do teste. Tais resultados foram avaliados no pós-teste de comparação múltiplo de Bonferroni para obtenção dos valores de *p*.

As tabelas 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 relacionam os valores médios de densidade óptica obtidos no painel de 10 amostras de SCPF avaliadas, de acordo com o volume de eluato usado.

Após a realização do teste HCV Ab (Radim) verificou-se que o volume de 10 µL de SCPF e 200 µL de diluente apresentou maior discrepância entre as médias das D.O.s reagentes e não-reagentes. No entanto, a média de D.O. das amostras reagentes foi 2,9 vezes menor em relação a média das D.O.s obtidas com o soro. Neste caso, as amostras fracamente reativas

poderiam não ser detectadas. O protocolo que forneceu resultados mais eficientes foi aquele em que o volume de 110 μL de eluato foi usado no teste. O volume de eluato foi aumentado 11 vezes em relação ao padrão estipulado pelo fabricante, o que corresponde aproximadamente a um volume efetivo de soro de 2,1 μl (Tabela 4.6). O p -valor foi significativo para amostras reagentes (0,0235) e não houve diferença significativa entre as amostras não-reagentes (0,0770) através do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Tabela 4.6 Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de eluato e diluente usados no EIE HCV Ab (Radim, Itália).

| Volume de amostra (μL) | Volume de diluente (μL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | | | | |
| 10 | 200 | 0,035 | 2,950 | 84,3 |
| SCPF: | | | | |
| 10 | 200 | 0,035 | 1,141 | 32,6 |
| 60 | 150 | 0,645 | 2,230 | 3,4 |
| 110 | 100 | 0,350 | 2,622 | 7,5 |
| 160 | 50 | 0,438 | 2,779 | 6,3 |
| 200 | 10 | 0,859 | 2,918 | 3,4 |

p -valor: 0,0770 (SCPF não-reagente); 0,0235 (SCPF reagente). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Com base na análise da discrepância entre as médias das D.O.s das amostras reagentes e não-reagentes do fabricante DiaSorin, a amostra de 176 μL seria selecionado. No entanto, o protocolo que forneceu resultados mais concordantes (Tabela 4.7), além de apresentar uma boa discrepância entre as amostras reagentes e não-reagentes, foi de 200 μL (volume aumentado em 10 vezes em comparação ao volume de soro).

Através do pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foi visto que os valores de p foram significantes na comparação de médias das D.O.s das amostras não-reagentes (0,0068). Para as amostras reagentes não houve significância estatística entre os resultados (0,9753).

Tabela 4.7- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de eluato e diluente usados no EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália).

| Volume de amostra (µL) | Volume de diluente (µL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|------------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | | | | |
| 20 | 200 | 0,058 | 2,212 | 38,1 |
| SCPF: | | | | |
| 176 | 44 | 0,025 | 2,343 | 93,7 |
| 198 | 22 | 0,078 | 2,518 | 32,3 |
| 200 | 20 | 0,052 | 2,309 | 44,4 |
| 250 | 5 | 0,130 | 2,213 | 17,0 |

p-valor: 0,0068 (SCPF não-reagente); 0,9753 (SCPF reagente). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

A análise da discrepância entre as médias das D.O.s das amostras reagentes e não-reagentes do fabricante Bio-Rad apresentou valores próximos entre si (Tabela 4.8). O protocolo que forneceu resultados 100% concordantes foi o de 200 µL de amostra. O volume foi aumentado em 4 vezes em comparação ao volume de soro, o que corresponde a um volume de soro efetivo de 3,8 µL.

Tabela 4.8- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de amostra e diluente usados no EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, França).

| Volume de amostra (µL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | | | |
| 50 | 0,044 | 1,842 | 41,9 |
| SCPF | | | |
| 50 | 0,052 | 0,634 | 12,2 |
| 100 | 0,066 | 0,685 | 10,4 |
| 150 | 0,080 | 0,735 | 9,2 |
| 200 | 0,082 | 0,892 | 10,9 |

p-valor: 0,0378 (SCPF não-reagente); 0,7906 (SCPF reagente). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Através do pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni foi visto que os valores de p foram significantes para as amostras não-reagentes (0,0378). Já para as amostras reagentes não houve significância estatística entre os resultados (0,7906).

Para o teste da Abbott, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de D.O.s reagentes e não-reagentes para os volumes de amostra propostos ($p = 0,9990$ e $p = 0,1354$). Os volumes de 100 μL e 200 μL de amostra apresentaram discrepâncias entre as médias de D.O.s das amostras reagentes e não-reagentes muito próximas (fator: 15,3 e 14,2 respectivamente). No entanto, o protocolo de teste com uso de 200 μL foi selecionado por apresentar menos interferentes nas amostras não-reagentes com a média de absorvância mais baixa. O volume de amostra foi aumentado em 4 vezes em comparação ao volume de soro (Tabela 4.9).

Tabela 4.9- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com os volumes de amostra e diluente usados no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul)

| Volume de amostra (μL) | Volume de diluente (μL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | | | | |
| 50 | 50 | 0,133 | 2,781 | 20,9 |
| SCPF | | | | |
| 50 | - | 0,105 | 1,282 | 12,2 |
| 100 | - | 0,089 | 1,359 | 15,3 |
| 150 | - | 0,105 | 1,271 | 12,1 |
| 200 | - | 0,086 | 1,224 | 14,2 |

p -valor: 0,1354 (SCPF não-reagente); 0,9990 (SCPF reagente). D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

4.4-Padronização do tempo de incubação

Nos quatro EIE comerciais foi avaliado o intervalo de tempo de incubação recomendado pelo fabricante, assim como o dobro desse período de tempo e 18 a 24 horas de incubação. Deste modo, os tempos avaliados foram:

-HCV Ab (Radim): 45 minutos, 90 minutos e 18 a 24 horas (Tabela 4.10);

-ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin): 60 minutos, 120 minutos e 18 a 24 horas (Tabela 4.11);

-Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad): 90 minutos, 180 minutos e 18 a 24 horas (Tabela 4.12);

-Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott): 60 minutos, 120 minutos e 18 a 24 horas (Tabela 4.13).

Tabela 4.10- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE HCV Ab (Radim, Itália).

| Amostra | Tempo de incubação | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-------------|--------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 45 minutos | 0,036 | 3,000 | 83,3 |
| SCPF | 45 minutos | 0,125 | 2,467 | 19,7 |
| SCPF | 90 minutos | 0,156 | 2,478 | 15,6 |
| SCPF | 18-24 horas | 0,155 | 2,736 | 17,6 |

D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Tabela 4.11- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin Itália).

| Amostra | Tempo de incubação | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-------------|--------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 60 minutos | 0,058 | 2,212 | 38,1 |
| SCPF | 60 minutos | 0,052 | 2,309 | 44,4 |
| SCPF | 120 minutos | 0,091 | 2,504 | 27,5 |
| SCPF | 18-24 horas | NR* | NR* | - |

*NR – Não realizado. D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Tabela 4.12- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad, França).

| Amostra | Tempo de incubação | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-------------|--------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 90 minutos | 0,044 | 1,842 | 41,9 |
| SCPF | 90 minutos | 0,082 | 0,892 | 10,9 |
| SCPF | 180 minutos | 0,129 | 1,192 | 9,2 |
| SCPF | 18-24 horas | NR* | NR* | - |

*NR – Não realizado. D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Tabela 4.13- Médias de densidades ópticas das amostras das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o tempo de incubação da amostra no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul).

| Amostra | Tempo de incubação | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-------------|--------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 60 minutos | 0,133 | 2,781 | 20,9 |
| SCPF | 60 minutos | 0,105 | 1,271 | 12,1 |
| SCPF | 120 minutos | 0,142 | 1,462 | 10,3 |
| SCPF | 18-24 horas | 0,160 | 1,035 | 6,5 |

D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Como se pode observar não houve influência nos resultados finais das amostras analisadas a partir do aumento do tempo de incubação, independente do teste imunoenzimático usado, tendo o tempo indicado pelo fabricante escolhido como padrão para o ensaio com amostras de SCPF.

O aumento do tempo de incubação representou um aumento proporcional de interferentes, resultando em falsos positivos. Por esse motivo, os testes com incubação de 18 a 24 horas foram realizados apenas para os dois primeiros ensaios dos quatro presentes no estudo.

4.5- Padronização do volume de conjugado

A análise comparativa dos resultados dos testes realizados para os EIE comerciais usados com diferentes volumes de conjugado demonstrou não haver diferenças consideráveis nos valores médios de densidade óptica. Já para o teste da Bio-Rad não foi realizada a análise porque o volume de reagente presente no EIE era insuficiente para o estudo.

Neste caso, foi descartada a hipótese da necessidade de variação desse componente do teste. As tabelas 4.14, 4.15 e 4.16 demonstram os valores médios e as concentrações analisadas em cada teste comercial estudado.

Tabela 4.14- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o volume de conjugado usado no EIE HCV Ab (Radim, Itália).

| Tipo de amostra | Volume de conjugado (µL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|--------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 100 | 0,036 | 2,950 | 81,9 |
| SCPF | 100 | 0,207 | 2,205 | 10,6 |
| SCPF | 150 | 0,189 | 2,189 | 11,6 |
| SCPF | 200 | 0,125 | 2,230 | 17,8 |
| SCPF | 250 | 0,117 | 2,316 | 19,8 |

p-valor das amostras não-reagentes: 0,0008; *p*-valor das amostras reagentes: 0,9972. D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Tabela 4.15- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o volume de conjugado usado no EIE HCV ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Itália).

| Tipo de amostra | Volume de conjugado (µL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|--------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 100 | 0,058 | 2,212 | 38,1 |
| SCPF | 100 | 0,116 | 2,300 | 19,8 |
| SCPF | 150 | 0,118 | 2,372 | 20,1 |
| SCPF | 200 | 0,085 | 2,167 | 25,5 |
| SCPF | 250 | 0,082 | 2,310 | 28,2 |

p-valor das amostras não-reagentes: 0,313; *p*-valor das amostras reagentes: 0,9921. D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

Tabela 4.16- Médias de densidades ópticas das amostras de soro e sangue coletado em papel de filtro de acordo com o volume de conjugado usado no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott, África do Sul).

| Tipo de amostra | Volume de conjugado (µL) | D.O.Média (nm) de amostras não-reagentes | D.O.Média (nm) de amostras reagentes | Razão entre D.O.Média reagentes/não-reagentes |
|-----------------|--------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Soro | 120 | 0,133 | 2,781 | 20,9 |
| SCPF | 120 | 0,195 | 1,647 | 8,4 |
| SCPF | 150 | 0,387 | 1,581 | 4,1 |
| SCPF | 200 | 0,119 | 1,330 | 11,2 |
| SCPF | 250 | 0,147 | 1,385 | 9,4 |

p-valor das amostras não-reagentes: 0,0241; *p*-valor das amostras reagentes: 0,9768. D.O., densidade óptica. SCPF, sangue coletado em papel de filtro.

4.6- Cálculo do ponto de corte

Para esta análise, foram incluídas quantidades diferentes de amostras reagentes e não-reagentes para os marcadores avaliados em virtude da necessidade de exclusão dos resultados inconclusivos para este tipo de análise. A quantidade de amostras reagentes/não-reagentes para soro foram, respectivamente, 40/371 para o EIE comercial da Radim, 45/360 para o da DiaSorin, 40/353 para o da Bio-Rad e 38/345 para o da Abbott. O número de testes para cada marcador variou devido à necessidade de excluir os resultados inconclusivos nas amostras de soro para o cálculo do PC.

No teste imunoenzimático do fabricante Radim (Itália) foi obtido um valor médio de ponto de corte (PC1) de 0,347 fornecido através do cálculo indicado pelo fabricante, que consiste na média dos controles negativos acrescido de 0,350 ($x_{CN} + 0,350$). O valor calculado a partir da média dos valores de D.O. das amostras de SCPF correspondentes às amostras de soro negativas no teste acrescido de três desvios padrão (PC2) foi de 0,351. O cálculo da curva ROC (PC3) forneceu um valor de 0,284 (Tabela 4.17).

No EIE do fabricante DiaSorin (Itália) o PC1 foi calculado considerando o ponto de corte do fabricante como a média dos controles negativos acrescido de 0,500 ($x_{CN} + 0,500$), cujo valor obtido foi de 0,592. Os cálculos de PC2 e PC3 foram, respectivamente, 0,648 e 1,345 (Tabela 4.17).

No EIE do fabricante Bio-Rad, o PC1 foi calculado considerando o ponto de corte do fabricante como a média dos controles positivos dividido por quatro ($x_{CP} \div 4$), cujo valor obtido foi de 0,362. Os cálculos de PC2 e PC3 foram, respectivamente, 0,503 e 0,287 (Tabela 4.17).

No EIE do fabricante Abbott, o PC1 foi calculado considerando o ponto de corte do fabricante como a média dos controles negativos acrescido de 0,200 ($x_{CN} + 0,200$), cujo valor obtido foi de 0,424. Os cálculos de PC2 e PC3 foram, respectivamente, 0,524 e 0,239 (Tabela 4.17).

Tabela 4.17- Resultados dos valores de ponto de corte obtidos nos ensaios imunoenzimáticos comerciais anti-HCV dos fabricantes Radim e DiaSorin e HCVAg-Ac dos fabricantes Bio-Rad e Abbott.

| EIE | PC1 | PC2 | PC3 |
|----------|-------|-------|-------|
| Radim | 0,347 | 0,351 | 0,284 |
| DiaSorin | 0,592 | 0,648 | 1,345 |
| Bio-Rad | 0,362 | 0,503 | 0,287 |
| Abbott | 0,424 | 0,524 | 0,239 |

PC1: um valor médio de ponto de corte fornecido através do cálculo indicado pelo fabricante, sendo Radim ($x_{CN} + 0,350$), DiaSorin ($x_{CN} + 0,500$) ($x_{CN} + 0,500$), Bio-Rad ($x_{CP} \div 4$) e Abbott ($x_{CN} + 0,200$).

PC2: média dos valores de DO das amostras de SCPF correspondentes às amostras de soro negativas no teste acrescido de três desvios padrão.

PC3: cálculo da curva ROC.

PC, ponto de corte; EIE, ensaios imunoenzimáticos.

A partir das análises estatísticas foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e o valor de *kappa* como parâmetros para análise do ponto de corte e do desempenho do teste demonstrados nas tabelas 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21.

Para o fabricante Radim (Tabela 4.18), PC1, PC2 e PC3 apresentaram os mesmos valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, no entanto, a concordância foi maior em PC1 e PC2. Como a diferença entre PC1 e PC2 não foi representativa, o PC1 (0,347) foi adotado como padrão para o teste.

Tabela 4.18- Valores padrões da qualidade do teste anti-HCV em SCPF pelo EIE HCV Ab (Radim) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados.

| Método | Valor de corte (nm) | Sensibilidade (95% IC) | Especificidade (95% IC) | VPP* (95% IC) | VPN* (95% IC) | Concordância (<i>kappa</i>) |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| PC1 | 0,347 | 97,50% (86,84-99,94) | 99,46% (98,07-99,93) | 95,12% (83,47-99,40) | 99,73% (98,50-99,99) | 0,959 (0,913-1) |
| PC2 | 0,351 | 97,50% (86,84-99,94) | 99,46% (98,07-99,93) | 95,12% (83,47-99,40) | 99,73% (98,50-99,99) | 0,959 (0,913-1) |
| PC3 | 0,284 | 97,50% (86,8-99,9) | 99,46% (98,1-99,9) | 95,12% (83,47-99,40) | 99,73% (98,50-99,99) | 0,946 (0,893-0,999) |

PC1: um valor médio de ponto de corte fornecido através do cálculo indicado pelo fabricante, sendo Radim (xCN + 0,350), DiaSorin (xCN + 0,500), Bio-Rad (xCP ÷ 4) e Abbott (xCN + 0,200); PC2: média dos valores de DO das amostras de SCPF correspondentes às amostras de soro negativas no teste acrescido de três desvios padrão; PC3: cálculo da curva ROC.

*Prevalência: 9,73% (7,04-13,02); quando prevalência: 1%; PC1, PC2 e PC3 - VPP: 64,59%; VPN: 99,97%.

Para o fabricante DiaSorin (Tabela 4.19), PC1, PC2 e PC3 apresentaram os mesmos valores de sensibilidade, no entanto, valores de especificidade, os valores preditivos e concordância foram maiores em PC3 (com o cálculo da curva *ROC*) (Figura 4.2).

Tabela 4.19- Valores padrões da qualidade do teste anti-HCV em SCPF pelo EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados.

| Método | Valor de corte (nm) | Sensibilidade (95% IC) | Especificidade (95% IC) | VPP* (95% IC) | VPN* (95% IC) | Concordância (<i>kappa</i>) |
|------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| PC1 | 0,592 | 88,89% (75,95-96,29) | 96,12% (93,58-97,86) | 74,07% (60,35-85,04) | 98,58% (96,72-99,54) | 0,782 (0,687-0,876) |
| PC2 | 0,648 | 88,89% (75,95-96,29) | 96,40% (93,92-98,07) | 75,47% (61,72-86,24) | 98,58% (96,73-99,54) | 0,791 (0,698-0,884) |
| PC3 | 1,345 | 88,89% (75,9-96,3) | 98,89% (97,2-99,7) | 90,89% - | 98,61% - | 0,875 (0,799-0,951) |

PC1: um valor médio de ponto de corte fornecido através do cálculo indicado pelo fabricante, sendo Radim (xCN + 0,350), DiaSorin (xCN + 0,500), Bio-Rad (xCP ÷ 4) e Abbott (xCN + 0,200); PC2: média dos valores de DO das amostras de SCPF correspondentes às amostras de soro negativas no teste acrescido de três desvios padrão; PC3: **cálculo da curva ROC.**

*Prevalência: 11,08% (8,20-14,55); quando prevalência: 1%; PC1 - VPP: 18,79%; VPN: 99,88%; PC2 - VPP: 19,96%; VPN: 99,88%; PC3 - VPP: 44,71%; VPN: 99,89%.

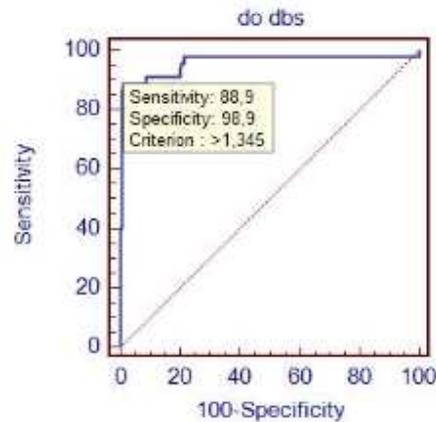


Figura 4.2- Gráfico obtido pela curva ROC para o teste anti-HCV (DiaSorin, Itália)

Comparação de valores de densidade óptica das amostras de sangue coletado em papel de filtro e seus resultados correspondentes com as de soro. O valor de ponto de corte obtido por esse critério foi de 1,345 nm, e sensibilidade e especificidade de 88,9% e 98,9%, respectivamente.

Para o fabricante Bio-Rad (Tabela 4.20), o PC3 (através do cálculo da curva ROC) apresentou os melhores valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e concordância (Figura 4.3).

Tabela 4.20- Valores padrões da qualidade do teste HCVAg-Ac em SCPF pelo EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados.

| Método | Valor de corte (nm) | Sensibilidade (95% IC) | Especificidade (95% IC) | VPP* (95% IC) | VPN* (95% IC) | Concordância (<i>kappa</i>) |
|------------|---------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| PC1 | 0,362 | 92,68% (80,08-98,46) | 100% (98,96-100) | 100% (90,75-100) | 99,16% (97,56-99,83) | 0,958 (0,910-1) |
| PC2 | 0,503 | 87,80% (73,80-95,92) | 100% (98,96-100) | 100% (90,26-100) | 98,60% (96,77-99,54) | 0,928 (0,866-0,991) |
| PC3 | 0,287 | 95,12% (83,5-99,4) | 100% (99,0-100) | 100% (90,75-100) | 99,95% - | 0,959 (0,912-1) |

PC1: um valor médio de ponto de corte fornecido através do cálculo indicado pelo fabricante, sendo Radim (x_{CN} + 0,350), DiaSorin (x_{CN} + 0,500), Bio-Rad (x_{CP} ÷ 4) e Abbott (x_{CN} + 0,200); PC2: média dos valores de DO das amostras de SCPF correspondentes às amostras de soro negativas no teste acrescido de três desvios padrão; **PC3: cálculo da curva ROC.**

*Prevalência: 10,41% (7,57-13,85); quando prevalência: 1%; PC1 - VPP: 100%; VPN: 99,93%; PC2 - VPP: 100%; VPN: 99,88%; PC3 - VPP: 100%; VPN: 99,95%.

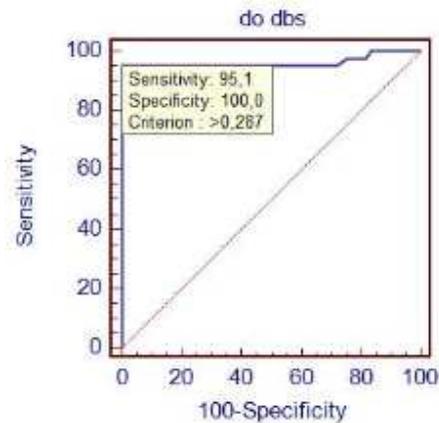


Figura 4.3- Gráfico obtido pela curva ROC para o teste HCV AgAc (Bio-Rad, França)

Comparação de valores de densidade óptica das amostras de sangue coletado em papel de filtro e seus resultados correspondentes com as de soro. O valor de ponto de corte obtido por esse critério foi de 0,287 nm, e sensibilidade e especificidade de 95,1% e 100%, respectivamente.

Para o fabricante Abbott (Tabela 4.21), o PC2 foi escolhido por ter maior concordância entre os resultados (0,838), maior especificidade e valores preditivos, contudo, observou-se uma redução na taxa de sensibilidade (78,05%).

Tabela 4.21- Valores padrões da qualidade do teste HCV Ag-Ac em SCPF pelo EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) de acordo com os diferentes pontos de corte calculados.

| Método | Valor de corte (nm) | Sensibilidade (95% IC) | Especificidade (95% IC) | VPP* (95% IC) | VPN* (95% IC) | Concordância (<i>kappa</i>) |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| PC1 | 0,424 | 80,49% (65,13-91,18) | 98,85% (97,09-99,69) | 89,19% (74,58-96,97) | 97,73% (95,58-99,02) | 0,829 (0,735-0,923) |
| PC2 | 0,524 | 78,05% (62,39-89,44) | 99,43% (97,95-99,93) | 94,12% (80,32-99,28) | 97,47% (95,26-98,84) | 0,838 (0,744-0,931) |
| PC3 | 0,239 | 95,12% (83,5-99,4) | 95,99% (93,4-97,8) | 73,58% - | 99,41% - | 0,797 (0,704-0,890) |

PC1: um valor médio de ponto de corte fornecido através do cálculo indicado pelo fabricante, sendo Radim ($x_{CN} + 0,350$), DiaSorin ($x_{CN} + 0,500$), Bio-Rad ($x_{CP} \div 4$) e Abbott ($x_{CN} + 0,200$); **PC2: média dos valores de DO das amostras de SCPF correspondentes às amostras de soro negativas no teste acrescido de três desvios padrão;** PC3: cálculo da curva ROC.

*Prevalência: 10,51% (7,57-13,85); quando prevalência: 1%; PC1 - VPP: 41,42%; VPN: 99,80%; PC2 - VPP: 58,04%; VPN: 99,78%; PC3 - VPP: 19,33%; VPN: 99,95%.

4.7- Desempenho do teste

Após análise do ponto de corte, os melhores resultados do desempenho de cada teste foram compilados na tabela 4.22.

Tabela 4.22- Valores dos padrões de qualidade obtidos nos testes anti-HCV e HCV Ag-Ac em amostras de SCPF

| EIE | Radim | DiaSorin | Bio-Rad | Abbott |
|------------------------------------|--------------|-----------------|----------------|---------------|
| Sensibilidade | 97,50% | 88,89% | 95,12% | 78,05% |
| Especificidade | 99,46% | 98,89% | 100% | 99,43% |
| Concordância <i>kappa</i> | 0,959 | 0,875 | 0,959 | 0,838 |
| Número de amostras falso positivas | 2 | 5 | 1 | 2 |
| Número de amostras falso negativas | 1 | 5 | 2 | 9 |

No EIE HCV Ab (Radim) foi detectado como reagente um total de 41 amostras de SCPF e nas demais 370 foram obtidos resultados não-reagentes para anticorpos anti-HCV. No EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin), o total de amostras reagentes de SCPF é de 45, enquanto as 361 amostras restantes foram não-reagentes. No EIE MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) foram consideradas como reagentes 40 amostras de SCPF e nas 354 restantes foram obtidos resultados não-reagentes para o antígeno e o anticorpo anti-HCV. No EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott), as amostras reagentes de SCPF foram 34, enquanto as 356 amostras restantes foram não-reagentes. Na figura 4.4 estão demonstrados os resultados comparativos das amostras pareadas de soro e SCPF.

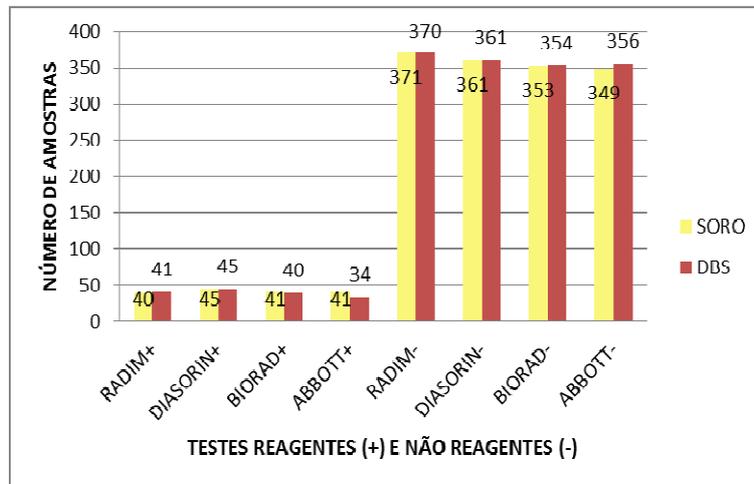


Figura 4.4- Comparativo dos resultados obtidos entre as amostras de soro e SCPF nos testes EIE HCV Ab (Radim) e EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) para o marcador anti-HCV, e EIE Monalisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) e EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) para o marcador antígeno e anticorpo anti-HCV.

4.8- Avaliação do limite de detecção

Na avaliação do limite de detecção, verificamos que foi possível obter reatividade para o anti-HCV até a diluição de $1:10^4$ nos dois testes avaliados (Radim e DiaSorin), e para o HCV Ag-Ac até a diluição de $1:10^3$ conforme pode ser observado nas figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8. Além disso, não houve diferença para detecção de anticorpos anti-HCV e antígeno e anticorpos anti-HCV em relação ao tipo de coleta [sangue capilar por punção digital coletado diretamente em papel de filtro (SCPF) e sangue venoso obtido em tubo *vacutainer* sem anticoagulante].

O resultado dos valores do ponto de corte foi obtido pelo cálculo indicado na bula de cada fabricante dos testes.

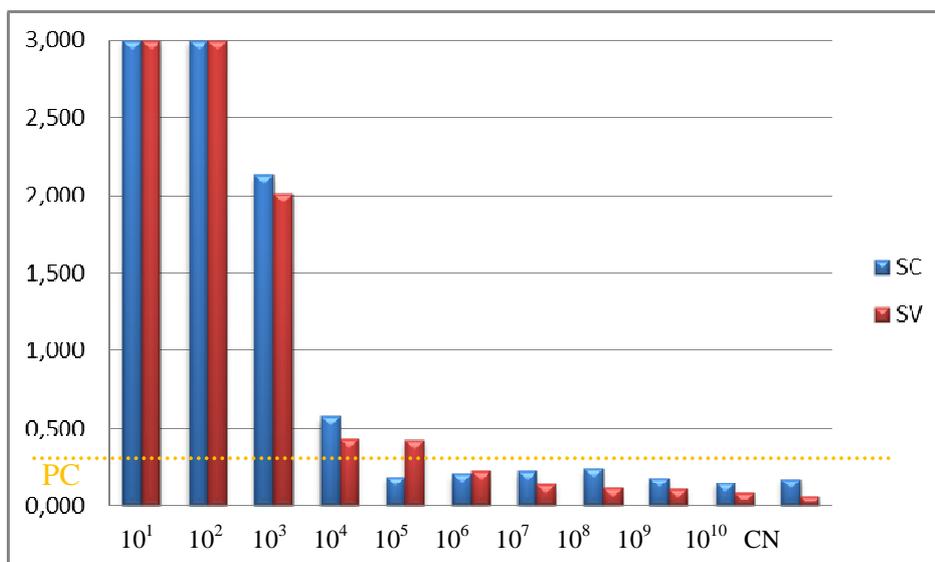


Figura 4.5- Resultado do teste de limite de detecção no EIE HCV Ab (Radim)
Valores de densidade óptica para cada diluição em amostras de sangue capilar (SC) e sangue venoso (SV) coletadas em papel de filtro. Ponto de corte (PC) obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,367nm.

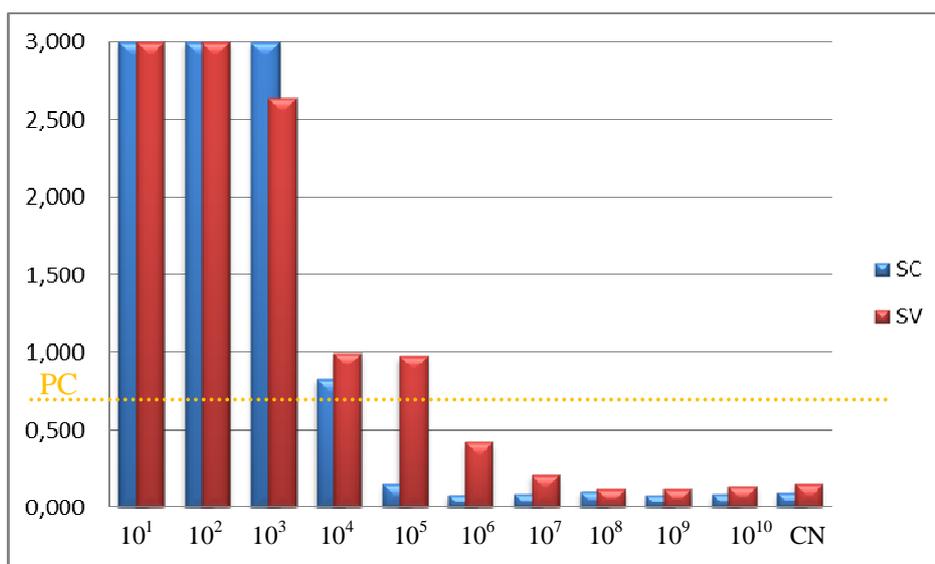


Figura 4.6- Resultado do teste de limite de detecção no EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin)
Valores de densidade óptica para cada diluição em amostras de sangue capilar (SC) e sangue venoso (SV) coletadas em papel de filtro. Ponto de corte (PC) obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,667nm.

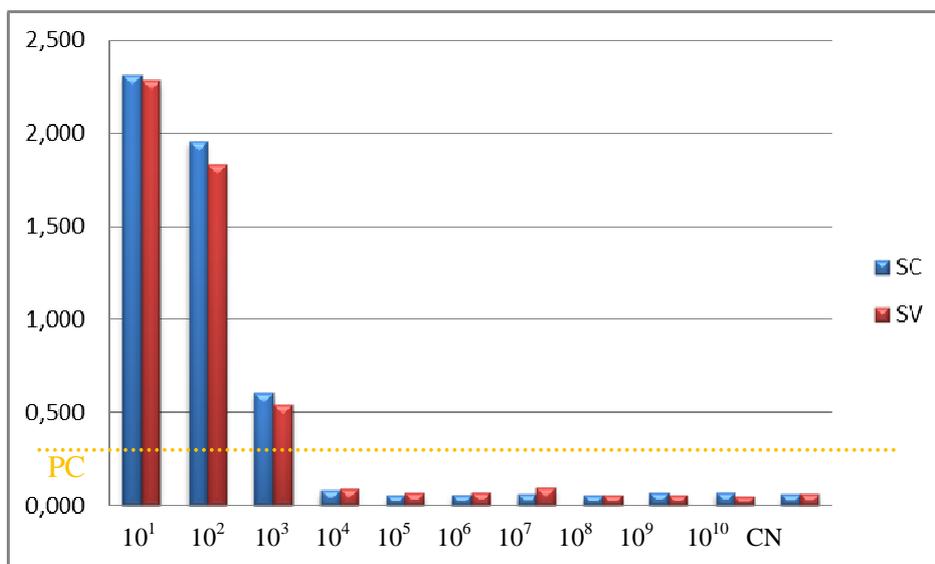


Figura 4.7- Resultado do teste de limite de detecção no EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) Valores de densidade óptica para cada diluição em amostras de sangue capilar (SC) e sangue venoso (SV) coletadas em papel de filtro. Ponto de corte (PC) obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,325nm.

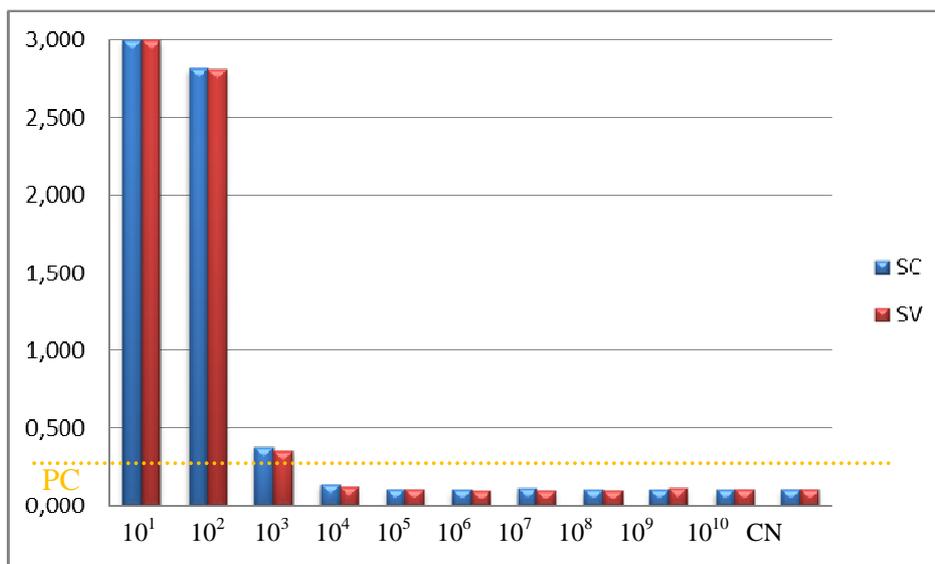


Figura 4.8- Resultado do teste de limite de detecção no EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) Valores de densidade óptica para cada diluição em amostras de sangue capilar (SC) e sangue venoso (SV) coletadas em papel de filtro. Ponto de corte (PC) obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,327nm.

4.9- Avaliação da precisão da amostra de SCPF

Para o estudo preliminar foram preparadas duas amostras reagentes para HCV com concentrações distintas, sendo 10¹ a positiva forte e 10³ a positiva fraca. Em uma única corrida

foram realizadas 8 repetições para cada teste. Com os resultados de densidade óptica obtidos foram calculados: média, desvio-padrão, coeficiente de variação e diferença máxima entre as replicatas de cada corrida através da multiplicação do desvio-padrão e o fator de significância de 5,5 para 99,9 % de nível de significância conforme exposto nas tabelas 4.23 e 4.24.

Tabela 4.23: Valores de precisão do estudo preliminar com 8 replicatas da amostra de concentração 10^1 (positivo forte).

| Teste Estimativas do parâmetro | Anti-HCV Radim | Anti-HCV DiaSorin | HCV Ag-Ac Bio-Rad | HCV Ag-Ac Abbott |
|--------------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | Média | 3,000 | 3,000 | 2,417 |
| DP | 0,000 | 0,000 | 0,100 | 0,335 |
| CV | 0,000 | 0,000 | 0,041 | 0,118 |
| DP x FS | 0,000 | 0,000 | 0,550 | 1,843 |

DP – desvio-padrão; CV – coeficiente de variação; FS – fator de significância (5,5 para 99,9 % de nível de confiança).

Tabela 4.24: Valores de precisão do estudo preliminar com 8 replicatas da amostra de concentração 10^3 (positivo fraco).

| Teste Estimativas do parâmetro | Anti-HCV Radim | Anti-HCV DiaSorin | HCV Ag-Ac Bio-Rad | HCV Ag-Ac Abbott |
|--------------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | Média | 1,061 | 2,750 | 0,633 |
| DP | 0,054 | 0,132 | 0,049 | 0,038 |
| CV | 0,051 | 0,048 | 0,077 | 0,074 |
| DP x FS | 0,297 | 0,726 | 0,269 | 0,209 |

DP – desvio-padrão; CV – coeficiente de variação; FS – fator de significância (5,5 para 99,9 % de nível de confiança).

O estudo de precisão intraensaio (repetitividade simples) foi realizado com vinte repetições no mesmo dia e pelo mesmo operador. Os resultados foram comparados aos pares, o primeiro com o segundo, o terceiro e o quarto, e assim sucessivamente até o último par. O par que obteve diferença superior à diferença máxima estabelecida no estudo preliminar através da

multiplicação do DP e FS foi rejeitado até o limite de 5 % do total de amostras, ou seja, 1 par em 20 amostras. Para as amostras de concentração 10^1 , o teste anti-HCV DiaSorin teve cinco pares com diferença superior a zero, mas apenas um par com a maior diferença foi excluído (5% do total). Os outros testes não tiveram amostras excluídas. Para as amostras de concentração 10^3 , houve a necessidade de rejeição de apenas um par com diferença superior a 0,209 para o teste HCV Ag-Ac da Abbott, os demais não se enquadrando neste critério. Posteriormente, foram calculados: a média, desvio-padrão e coeficiente de variação do estudo (Tabelas 4.25 e 4.26). Conforme o modelo descrito no EP05-A2 para critério clínico, o nível de imprecisão aceitável determinado frente ao erro total é de até 25%, ou, seguindo a recomendação da ANVISA, deve ser menor que 15 % na mesma corrida analítica. Todos os testes analisados apresentaram erro total inferior a 25% para as amostras de concentração 10^1 e 10^3 , mas o teste anti-HCV da DiaSorin obteve variação superior a 15% (16,7%) para amostra positiva forte.

Tabela 4.25: Avaliação do estudo de precisão intraensaio com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^1 (positivo forte).

| Teste | Anti-HCV Radim | Anti-HCV DiaSorin | HCVAgAb Bio-Rad | HCVAgAb Abbott |
|-----------------------------|----------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| Estimativas do parâmetro | | | | |
| Média D.O. | 3,000 | 2,692 | 2,136 | 3,000 |
| DP | 0,000 | 0,448 | 0,059 | 0,000 |
| CV% | 0 | 16,7 | 2,8 | 0 |

DP – desvio-padrão; CV – coeficiente de variação.

Tabela 4.26: Avaliação do estudo de precisão intraensaio com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^3 (positivo fraco).

| Teste | Anti-HCV Radim | Anti-HCV DiaSorin | HCVAgAb Bio-Rad | HCVAgAb Abbott |
|-----------------------------|----------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| Estimativas do parâmetro | | | | |
| Média | 1,176 | 1,637 | 0,453 | 0,466 |
| DP | 0,075 | 0,116 | 0,023 | 0,016 |
| CV% | 6,4 | 7,1 | 5,0 | 3,5 |

DP – desvio-padrão; CV – coeficiente de variação.

O estudo de precisão interensaio (reprodutibilidade simples) foi realizado com vinte repetições divididas em dois dias com diferentes operadores. A análise foi realizada de forma igual à repetitividade simples. Para as amostras de concentração 10^1 , o teste anti-HCV da DiaSorin e o HCV Ag-Ac da Abbott tiveram um par de resultados excluídos com diferença maior que zero e 1,843, respectivamente. Os outros testes não tiveram amostras excluídas. Para as amostras de concentração 10^3 , houve a necessidade de rejeição de resultados. Posteriormente, foram calculados: média, desvio-padrão e coeficiente de variação do estudo (Tabelas 4.27 e 4.28). Conforme o modelo descrito no EP05-A2 para critério clínico, o nível de imprecisão aceitável determinado frente ao erro total é de até 25 %, ou, seguindo a recomendação da ANVISA, deve ser menor que 15 % na mesma corrida analítica. Todos os testes analisados apresentaram erro total inferior a 25% e 15% para as amostras de concentração 10^1 e 10^3 , respectivamente.

Tabela 4.27: Avaliação do estudo de precisão interensaio com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^1 (positivo forte).

| Teste Estimativas do parâmetro | Anti-HCV Radim | Anti-HCV DiaSorin | HCVAgAb Bio-Rad | HCVAgAb Abbott |
|--------------------------------------|----------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| | Média D.O. | 3,000 | 2,208 | 2,259 |
| DP | 0,000 | 0,082 | 0,090 | 0,189 |
| CV% | 0 | 3,7 | 4,0 | 6,7 |

DP – desvio-padrão; CV – coeficiente de variação.

Tabela 4.28: Avaliação do estudo de precisão interensaio -reprodutibilidade- com 20 replicatas da amostra de SCPF com concentração de 10^3 (positivo fraco).

| Teste Estimativas do parâmetro | Anti-HCV Radim | Anti-HCV DiaSorin | HCVAgAb Bio-Rad | HCVAgAb Abbott |
|--------------------------------------|----------------|----------------------|--------------------|-------------------|
| | Média | 0,913 | 1,353 | 0,507 |
| DP | 0,063 | 0,104 | 0,070 | 0,020 |
| CV% | 6,9 | 7,6 | 13,8 | 4,7 |

DP – desvio-padrão; CV – coeficiente de variação.

4.10- Estabilidade da amostra de SCPF

A análise comparativa dos resultados dos testes realizados para os EIE comerciais submetidos a diferentes intervalos de tempo (7, 14, 28, 60, 117 dias) e temperaturas de armazenamento (T1: 2-8°C; T2: 22-26°C; T3: -20°C) demonstrou não haver diferenças consideráveis nos valores de D.O. obtidos nas condições avaliadas.

As amostras reagentes representadas nas figuras 4.9, 4.11, 4.13 e 4.15 mantiveram-se estáveis à temperatura de -20°C e a 2-8°C. No entanto, houve um pequeno declínio estatisticamente não significativo de D.O. à temperatura ambiente (T2) para os testes Bio-Rad e Abbott.

Para as amostras não-reagentes cada fabricante apresentou um desempenho diferente. No teste da Radim (Figura 4.10), os valores de D.O. não apresentaram alterações significativas. No teste da DiaSorin (Figura 4.12), os resultados de D.O. foram heterogêneos, com elevação nos 14° e 117° dias para todas as temperaturas de armazenamento ($p < 0,0001$). No teste da Bio-Rad (Figura 4.14), houve aumento dos valores de D.O. em T1 (2-8°C) a partir do 60° dia, mas as amostras mantiveram-se estáveis nas demais condições. No teste da Abbott (Figura 4.16), houve aumento dos valores de D.O. para T1 e T3 a partir do 117° ($p < 0,0001$). No entanto, para T2 (temperatura ambiente), os resultados apresentaram uma elevação constante ao passar dos dias.

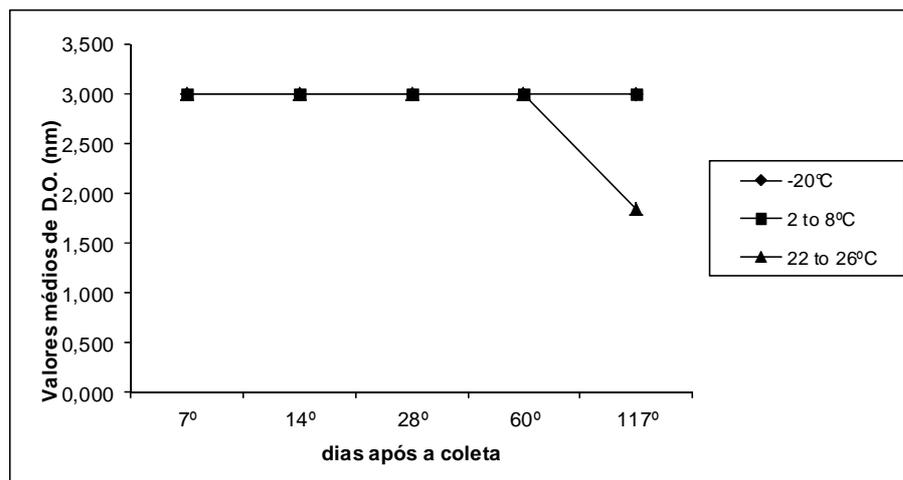


Figura 4.9- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Radim (Itália).

Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,354nm.

p -valor: 0,5513

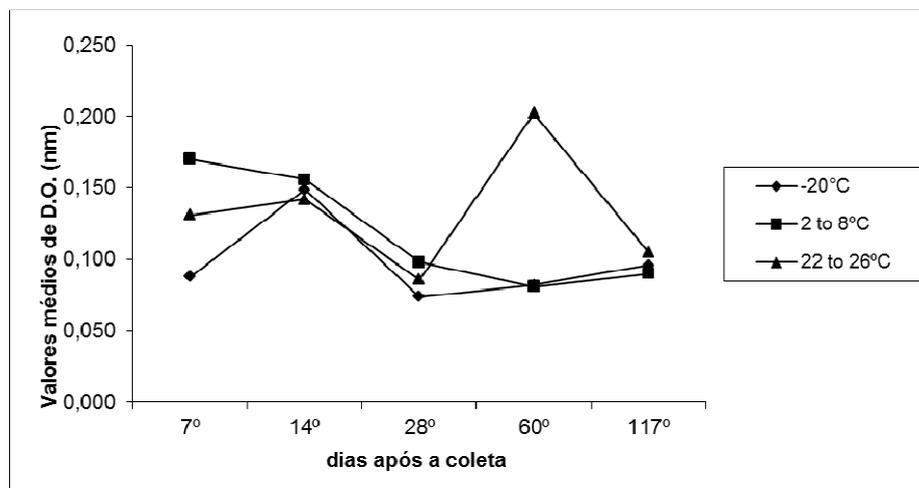


Figura 4.10- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Radim (Itália).
 Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,354nm.
 p -valor: 0,2830

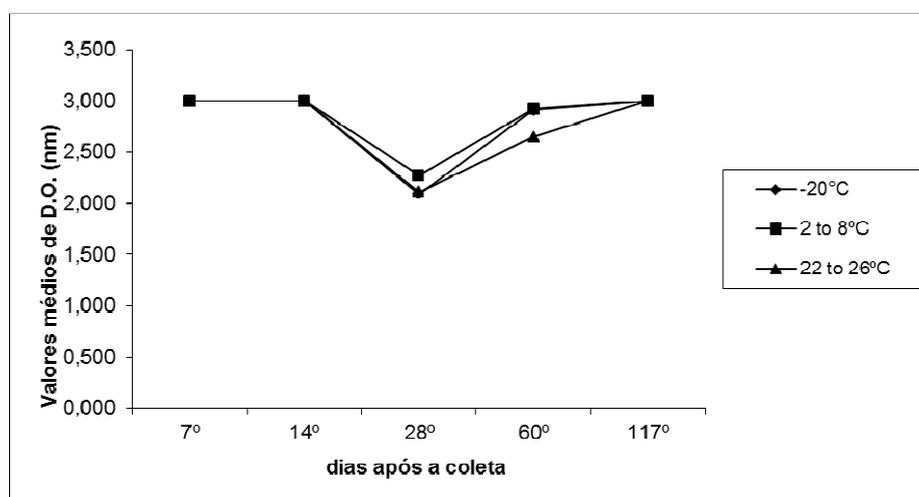


Figura 4.11- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante DiaSorin (Itália).
 Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,646nm.
 p -valor < 0,0001

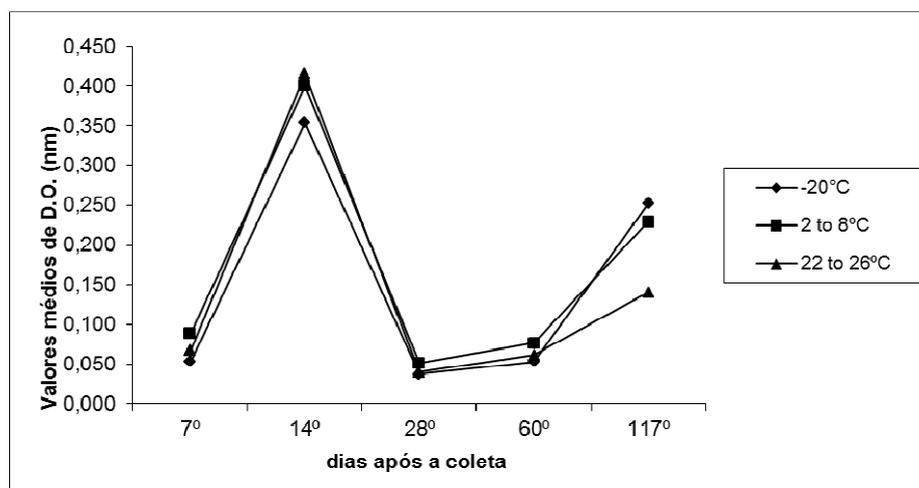


Figura 4.12- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante DiaSorin (Itália).

Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,646nm.

p -valor < 0,0001

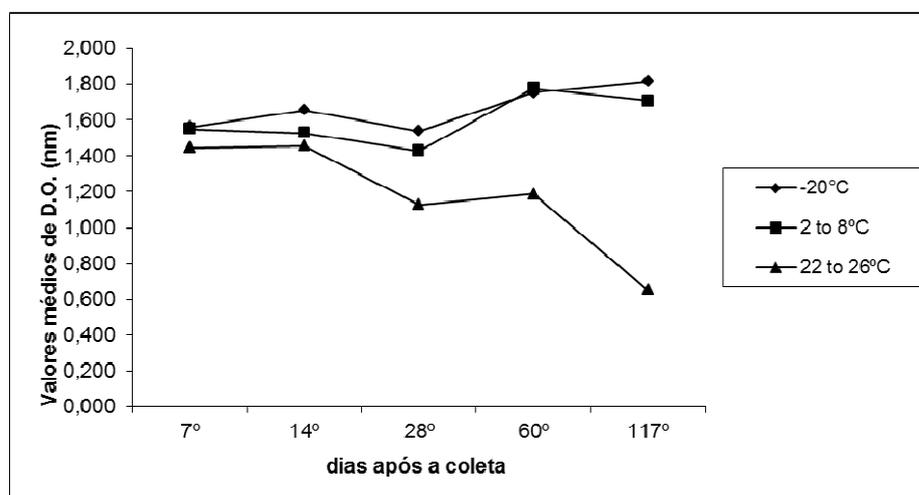


Figura 4.13- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Bio-Rad (França).

Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,340nm.

p -valor: 0,9818

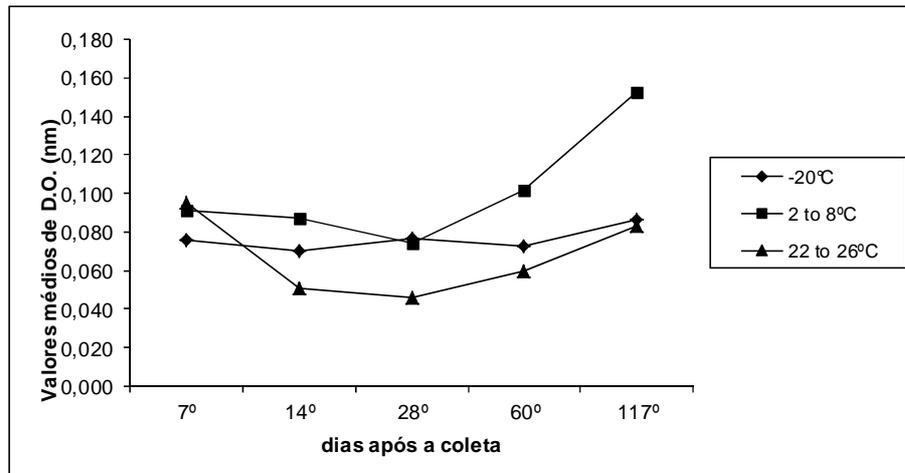


Figura 4.14- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Bio-Rad (França).
 Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,340nm.
 p -valor: 0,2977

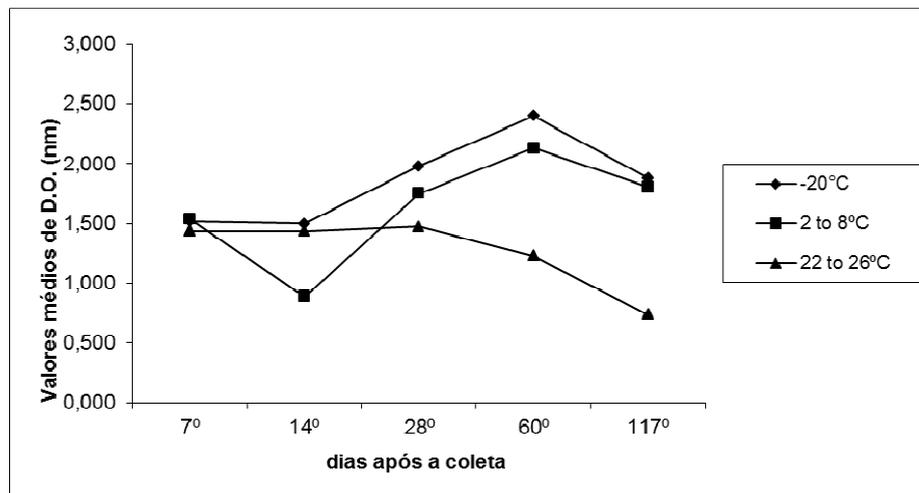


Figura 4.15- Resultado do teste de estabilidade de amostras reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Abbott (África do Sul).
 Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,375nm.
 p -valor: 0,9820

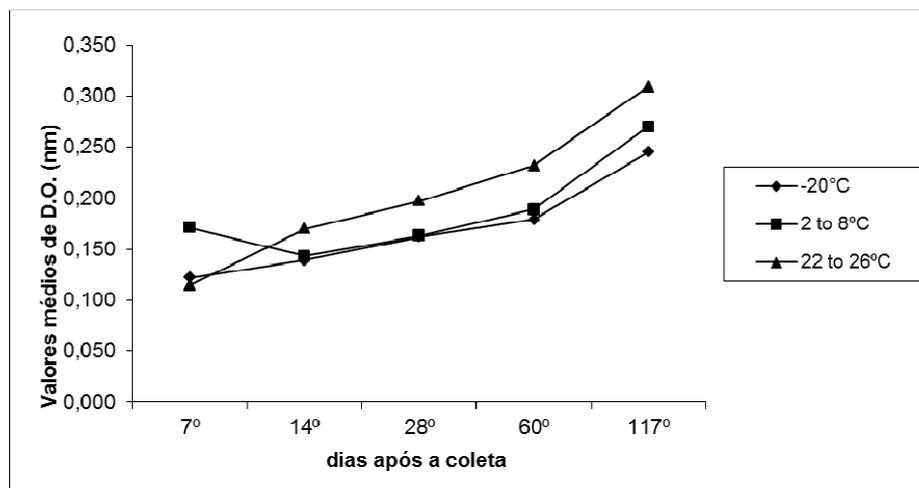


Figura 4.16- Resultado do teste de estabilidade de amostras não-reagentes de SCPF submetidas a períodos e temperaturas de armazenamento diversas no EIE do fabricante Abbott (África do Sul).
Ponto de corte (PC) médio obtido pelo cálculo indicado na bula do fabricante igual a 0,375nm.
 p -valor < 0,0001

5- DISCUSSÃO

Os estudos com SCPF iniciaram-se na década de 60 em recém-natos para detecção de fenilcetonúria (Guthrie e Suzi 1963) Posteriormente, o uso de amostras de sangue coletado em papel de filtro (SCPF) como espécime alternativo para detecção de marcadores de diversas doenças infecciosas já foi demonstrado em vários estudos (Villa et al. 1981; Gil et al. 1997; Tappin et al. 1998; Abe e Konomi 1998; Parker e Cubitt 1999; De Almeida et al. 1999; McCarron et al. 1999; Mercarder et al. 2006; Castro et al. 2008; Fachiroh et al. 2008; Desbois et al. 2009; Villar et al. 2011). Esse método de coleta se apresenta como uma alternativa a coleta de sangue, pois é menos oneroso, não necessita de equipe especializada, é mais seguro e a amostra é mais facilmente de ser transportada e armazenada, principalmente quando são estudos realizados em populações distantes de laboratório (Mei et al. 2001).

No presente estudo, o sangue coletado por punção capilar ou, alternativamente, por punção venosa, foi dispensado em papel de filtro Whatman 903 (*Protein Saver Card*) na quantidade aproximada de 75 µl por círculo de 12 mm de diâmetro e a secagem feita a temperatura ambiente por aproximadamente 3 a 4 horas (Andreotti et al. 2010). O uso desse papel de filtro foi descrito em diversos trabalhos científicos para utilização em teste diagnósticos para doenças como a infecção pelo HIV/Aids, rubéola, toxoplasmose, dentre outras (Patton et al. 2008; Madi, et al. 2010). No estudo realizado por Fachiroh et al. (2008), dois tipos de papel de filtro (“Guthrie card” [S&S] n° 903 e Whatman n° 1) foram comparados para a detecção de anticorpos IgG contra o vírus *Epstein Barr*, tem sido observados valores superiores de sensibilidade e especificidade do teste com o uso do papel de filtro S&S em comparação ao papel Whatman n° 1. Em nosso estudo, não foi realizada a comparação entre os diferentes papéis de filtro, o que poderia explicar, em parte, diferenças encontradas nas taxas de sensibilidade e especificidade.

É possível detectar anticorpos (IgM e IgG) contra o HCV em amostras de SCPF, conforme verificamos, porém, são necessárias modificações em alguns parâmetros de realização dos ensaios. Também foi possível detectar antígeno/ anticorpo contra o HCV

usando testes de detecção simultânea em amostras de SCPF, após adaptação do protocolo estabelecido pelo fabricante para testagem em amostras de soro ou plasma. Inicialmente, o tamanho do papel e o tampão de eluição foram determinados, onde círculos de 3 mm de diâmetro (McCarron et al. 1999; Costa et al. 2000) foram eluídos por 18 a 24 horas em tampão PBS/BSA 0,5%. Com o uso deste tampão foram obtidos valores de DO/CO mais próximos daqueles obtidos com as amostras de soro. Neto et al. (2004), Lima et al. (2007) e Villar et al. (2011) também utilizaram o tampão PBS/BSA 0,5% para eluição de amostras de SCPF em testes para detecção de doenças infecciosas congênicas em recém-natos, dengue e hepatite B, respectivamente. Neto et al. (2004) obtiveram 100% de sensibilidade ao empregar o tampão PBS/BSA 0,5%. Provavelmente, os valores obtidos nestes estudos se deve à ação da albumina bovina que bloqueia ligações inespecíficas na reação imunoenzimática, resultando em melhores resultados como os obtidos em nosso estudo em relação à escolha desse tampão (Bellisario et al. 2001).

Croom et al. (2006) realizaram estudos com SCPF (S&S 903) de indivíduos de grupos de alto risco e usuários de drogas injetáveis, utilizando o EIE Monolisa anti-HCV plus V.2 (Bio-Rad, França) e avaliaram 3 diferentes tipos de tampão de eluição. Os autores observaram diferenças significativas na detecção de anti-HCV em SCPF eluído em diferentes tampões quando foram usadas somente amostras cujos soros correspondentes apresentavam baixos títulos de anticorpos anti-HCV. Esta avaliação, contudo, não foi realizada no presente estudo.

Os volumes de amostra e diluente empregados nos testes foram analisados, e foi possível verificarmos melhores resultados na detecção de anticorpos anti-HCV e de antígeno e anticorpos anti-HCV nos quatro EIEs quando o volume de SCPF foi aumentado e o diluente foi diminuído ou retirado. A mesma observação foi relatada por McCarron et al. (1999) e Croom et al. (2006) para a detecção de anti-HCV e, provavelmente, se deve a menor quantidade de anticorpos presentes em SCPF (Bazzigaluppi et al. 1999), visto que estas amostras contêm sangue total e este é ainda diluído no tampão de eluição. O círculo de 12,5 mm de diâmetro de papel de filtro comporta, em média, 80 μ L de sangue total, o que equivale a aproximadamente 26 μ L de soro (Steger et al. 1990; McDade et al. 2007; Melgaço et al. 2011). Assim, o aumento de volume de SCPF no teste tem de gerar maior equivalência entre os níveis de anticorpos em SCPF e na amostra de soro correspondente. No entanto, não há consenso do número de vezes que o volume de amostrade SCPF deve ser aumentado em relação ao soro (Parker et al. 1997; Montebugnoli et.al., 1999; McCarron et al.1999; Croom et al. 2006).

Quando o volume de conjugado e o tempo de incubação de amostra foram avaliados, nenhum dos dois fatores se mostrou significativo para o aumento da sensibilidade dos testes usados no estudo, diferentemente de outros estudos cujos resultados mostraram que um ou ambos os parâmetros necessitaram ser alterados (Neto et al. 2004; Medina 2008).

A avaliação do ponto de corte também foi feita para a detecção de anticorpos anti-HCV e antígenos e anticorpo anti-HCV nos quatro EIEs usados no estudo, onde verificamos que a alteração do ponto de corte foi necessária para o aumento da sensibilidade e especificidade dos testes. Este tipo de alteração é bastante eficiente para aumentar a sensibilidade dos testes otimizados, tal como foi observado por Villar et al. (2011) para detecção de marcadores de hepatite B em SCPF, por Cruz et al. (2011) para a detecção de HBsAg em saliva e Tourinho et al. (2011) para a detecção de anti-HAV em saliva.

Para os EIE dos fabricantes DiaSorin e Bio-Rad, foi empregada a análise da curva ROC. Villar et al. (2011) obtiveram um aumento da acurácia de EIE para os marcadores da hepatite B em amostras de SCPF quando os valores de ponto de corte foram recalculados com base no método da curva ROC. Da mesma forma, Tourinho et al. (2011) e Cruz et al. (2011) observaram aumento da sensibilidade e da especificidade com a análise do ponto de corte segundo a curva ROC, em EIE para a detecção de anticorpos anti-HAV e marcadores de hepatite B, respectivamente, em amostra de saliva. No Murex HCV Ag/Ac Combination, o ponto de corte foi determinado pela média de valores de D.O. das amostras não-reagentes acrescido de três DP. Este último método foi descrito por Parker et al. (1999) para a detecção de anti-HCV utilizando um EIE *in house* e papel de filtro Whatman nº 3 em uma população de mães e crianças atendidas em dois hospitais do Paquistão. Com relação ao teste HCV Ab, foi empregado o ponto de corte calculado de acordo com a recomendação do fabricante do teste (Radim).

Utilizando o EIE HCV Ab para detecção de anti-HCV em SCPF foi possível obter taxas de sensibilidade de 97,50% e especificidade de 99,46% com o teste otimizado. Já para o EIE ETI-AB-HCVK-4, a sensibilidade do teste foi de 88,89% e a especificidade foi de 98,89%. McCarron et al. (1999) observaram em estudo para detecção de anti-HCV em SCPF pelo EIE Monolisa anti-HCV (Sanofi Pasteur, Marne-la-Coquette, França), em pacientes sabidamente infectados pelo o HCV e doadores de sangue valores de sensibilidade de 100% e especificidade de 87,5%. No presente estudo, foi observada maior especificidade, porém, a sensibilidade foi inferior. Uma possível explicação para esta menor sensibilidade pode ter sido o tipo de amostra usada em nosso

estudo ou o tampão de eluição empregado, já que McCarron et al. (1999) eluíram um círculo de 3 mm de SCPF em tampão PBS/Tween + azida sódica.

Outro achado de nosso estudo foi a maior sensibilidade obtida com o EIE HCV Ab.(Radim). Devido à falta de outros estudos baseados na realização de testes anti-HCV em SCPF pelos EIEs usados no presente estudo, não foi possível fazer comparação dos resultados obtidos em SCPF. Entretanto, em estudo realizado recentemente em nosso laboratório (LAHEP) para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de soro, utilizando três diferentes fabricantes (Radim, BioMerieux e DiaSorin), foi observado que o EIE HCV Ab (Radim) foi o mais sensível para a detecção de anti-HCV (Silva et al. 2010).

Usando o EIE MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) para detecção de antígeno e anticorpo anti-HCV em SCPF foi possível obter sensibilidade de 95,12% e especificidade de 100% com o teste otimizado. Já para o EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott), a sensibilidade do teste foi de 78,05% e a especificidade foi de 99,43%. Os dois testes apresentaram excelente especificidade, no entanto, o EIE da Bio-Rad obteve maior sensibilidade com as adaptações realizadas no protocolo do ensaio. Não foi possível comparar esses resultados com a literatura, pois não existem estudos publicados até o momento usando EIE para detecção combinada de antígeno e anticorpo anti-HCV em amostras de SCPF. Nos estudos de Lambert (2007), o EIE usado (Bio-Rad) obteve 99,86% de especificidade e detecção de 71% de amostras HCV RNA positiva/anti-HCV negativa (janela imunológica) para amostras de sangue coletadas de indivíduos de ambiente hospitalar e banco de sangue. Yang et al. (2011) avaliaram o desempenho de diferentes grupos de pacientes usando o EIE da Abbott obtiveram 100% de sensibilidade e 95,4% de especificidade para amostras de soro.

Uma explicação para a diferença de sensibilidade observada entre os diferentes EIEs é a carga viral em cada indivíduo. Garrido et al. (2009) verificaram que a determinação do HIV-1 RNA em SCPF foi correlacionada a carga viral da amostra de plasma correspondente. Logo, com baixos níveis de viremia juntamente com a diminuição gerada pelo tipo de espécime coletado, é possível que essas amostras apresentem resultados indeterminados ou falsos negativos. Os EIEs da DiaSorin e Abbott obtiveram o maior número de amostras falso negativas, sendo 5 e 9, respectivamente. Outra possibilidade de interferência é o papel de filtro que pode influenciar as ligações inespecíficas dos antígenos e anticorpos, mesmo usando como tampão de eluição o BSA que minimiza este efeito. Tais possibilidades devem ser avaliadas em estudos futuros.

No presente estudo, também foi possível estabelecer o limite de detecção dos dois EIEs para a detecção de anti-HCV em amostras de SCPF artificialmente contaminadas. E foi possível verificar um limite de 1/10.000 em ambos os testes. Com relação aos dois EIEs para detecção de antígeno e anticorpo anti-HCV foi possível verificar um limite de detecção de 1/1.000 em ambos os testes. Tuaille et al. (2010) também realizaram diluições seriadas para determinação do limite mínimo de detecção de anticorpos anti-HCV e verificaram que este limite em amostras de SCPF foi uma média de 1/512 de títulos de diluição (entre variações de 1/64 a 1/4.096), enquanto para o soro o resultado médio foi de 1/1.024 (variando de 1/512 a 1/65.336). Estes resultados confirmam que o teste em amostras de soro é mais sensível do que o teste em SCPF. Contudo, em nosso estudo o limite de detecção dos dois EIEs para detecção de anti-HCV em SCPF foram superiores ao relatado por Tuaille et al. (2010). Entretanto, nos EIEs para detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV o título de diluição em amostra de SCPF foi semelhante ao encontrado por Tuaille et al. (2010) para detecção de anti-HCV em amostra de soro.

Com relação à precisão dos quatro EIEs, todos apresentaram boa concordância entre os resultados intraensaio e interensaio nas amostras de SCPF com reatividade fraca e forte. A precisão dos testes se manteve dentro dos limites recomendados pelo documento EP5-A2 publicado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute* ou CLSI), que estabelece um erro total aceitável de 25%. O teste ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) apresentou a maior variação em comparação com os outros EIE, excedendo o limite de 15% para uma análise mais criteriosa, considerando-se recomendações da ANVISA.

O último parâmetro avaliado foi a estabilidade das amostras de SCPF submetidas a diferentes períodos e temperaturas de armazenamento. As amostras reagentes e não-reagentes permaneceram estáveis durante 117 dias acondicionadas a temperatura ambiente, 2 a 8°C e -20°C. Porém, o EIE ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin) apresentou oscilações significativas de D.O. ($p < 0,0001$) com um aumento isolado de D.O. em todas as condições de armazenamento no 28º dia para amostras reagentes e no 14º dia para amostras não-reagentes, mantendo-se a estabilidade até 60º dia. O EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) também apresentou variação de D.O. estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) nas amostras não-reagentes, mas manteve-se estável até 60º dia em todas as condições de armazenamento. As amostras reagentes e não-reagentes para o EIE HCV Ab (Radim) e EIE MonolisaTM HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) e as amostras reagentes para o EIE Murex HCV Ag/Ab Combination (Abbott) não apresentaram variações de D.O. estatisticamente significativas. As amostras não-reagentes apresentaram as maiores

variações nas diversas condições de armazenamento submetidas, com tendência à elevação dos valores de densidade ótica. No entanto, todos os resultados permaneceram abaixo do ponto de corte, ou seja, não-reagentes até 117º dia. Verificou-se, assim, que as amostras de SCPF poderiam ficar armazenadas nas três condições do estudo durante 60 dias preservando suas características, o armazenamento a -20º minimizaria as flutuações de D.O. Villar et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes, em ensaios para detecção de marcadores de hepatite B em amostras de SCPF até 63 dias, em diversas condições de armazenamento, e verificaram que o valor de D.O. está menos sujeito às variações quando as amostras foram armazenadas a -20ºC. Tuaille et al. (2010) investigaram a estabilidade das amostras de SCPF expostas à temperatura ambiente por 2 a 12 dias antes de serem armazenadas a -20ºC. Para o teste anti-HCV, após o sexto dia, os valores de absorbância foram maiores do que o ponto de corte em quatro das cinco amostras de pacientes anti-HCV negativos, mas nas amostras positivas não houve variação significativa. Para o HCV RNA, Tuaille *et al.* (2010), assim como Abe e Konomi (1998) observaram títulos dez vezes menores de HCV RNA em amostras armazenadas durante quatro semanas à temperatura ambiente, porém, as amostras congeladas foram preservadas.

Amostras de SCPF podem ser utilizadas para detecção de anticorpos anti-HCV e para detecção combinada de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV desde que adaptações aos EIE comerciais sejam feitas para adequá-los a esse tipo de amostra biológica. Neste estudo, as principais modificações em relação às recomendações dos fabricantes para amostras de soro foram: tipo de tampão de eluição, o volume da amostra e a utilização de cálculos de pontos de corte alternativos para melhorar a taxa de concordância entre os resultados das amostras pareadas de soro e SCPF.

Nossos resultados revelam-se promissores visto que os EIE possuem baixo custo e podem ser adaptados com sucesso para o uso de SCPF, apresentando como vantagens: volume reduzido de amostra, pouco espaço físico para armazenamento, e estabilidade suficiente para suportar o transporte por longas distâncias em temperatura ambiente, sem causar danos a amostra, possibilitando estabelecer o diagnóstico da infecção pelo HCV em locais de difícil acesso e com condições laboratoriais sub-ótimas.

6- CONCLUSÕES

- O uso do tampão PBS/BSA 0,5% para eluição de amostras de SCPF resultou em melhor desempenho dos testes de detecção de anticorpos anti-HCV e detecção simultânea de antígeno e anticorpo anti-HCV quando comparado às amostras de soro;

- O aumento do volume de amostra de SCPF para a detecção de anti-HCV e HCV Ag-Ac pelos EIE avaliados e a utilização de cálculos de pontos de corte alternativos foi necessária para melhorar a taxa de concordância entre os resultados das amostras pareadas de SCPF e soro;

- O tempo de incubação da amostra e o volume de conjugado usado nos EIE não influenciou significativamente os valores médios de D.O. nas amostras de SCPF, podendo, assim, serem utilizadas as recomendações dos fabricantes;

- O EIE HCV Ab (Radim) foi o teste de detecção de anticorpos anti-HCV com melhor desempenho em amostras de SCPF por ter apresentado os maiores valores de sensibilidade, especificidade, concordância e valores preditivos positivo e negativo entre os resultados das amostras pareadas de SCPF e soro;

- O EIE Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) foi o teste de detecção simultânea de antígenos do HCV e anticorpos anti-HCV com melhor desempenho em amostras de SCPF por ter apresentado os maiores valores de sensibilidade, especificidade, concordância e valores preditivos positivo e negativo entre os resultados das amostras pareadas de SCPF e soro;

- Os testes com amostras de SCPF para detecção de anticorpos anti-HCV e detecção simultânea de antígeno do HCV e anticorpos anti-HCV apresentaram repetitividade e reprodutibilidade dentro dos limites recomendados para amostras clínicas;

- As amostras de SCPF apresentaram boa estabilidade em diferentes condições ambientais (22-26°, 2-8°, -20°) durante 60 dias, viabilizando o acesso ao diagnóstico em áreas distantes do laboratório e de grandes centros urbanos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Hollinger FB, Kahn RA, Stevens CE, et al. **Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study.** N Engl J Med 1981; 304: 989-94.

Abe K, Konomi N. **Hepatitis C virus RNA in dried serum spotted onto filter paper is stable at room temperature.** J Clin Microbiol 1998; 36: 3070-3072.

Adler M, Goubau P, Nevens F, Van Vlierberghe H. **Hepatitis C virus: the burden of the disease.** Acta Gastroenterol Belg 2002; 65: 83-86.

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. **Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis.** Lancet 1978; 1: 459-463.

Alter MJ, Gerety RJ, Smallwood LA, Sampliner RE, Tabor E, Deinhardt F, et al. **Sporadic non-A, non-B hepatitis: frequency and epidemiology in an urban U.S. population.** J Infect Dis 1982; 145: 886-93.

Andréo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, et al. **Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection.** Cell Microbiol 2007, 9: 2445-2456.

Andreotti M, Pirillo M, Guidotti G, Ceffa S, Paturzo G, Germano P, et al. **Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche Cobas Taqman assay.** J Clin Virol 2010; 47: 4-7.

Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. **Steatose in chronic hepatitis C: why does it really matter?** Gut 2006, 55: 123-130.

Barfield M, Spooner N, Lad R, Parry S, Fowles S. **Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008; 870: 32-37.

Bazzigaluppi E, Bonfanti R, Bingley PJ, Bossi E, Bonifacio E. **Capillary whole blood measurement of islet autoantibodies.** Diabetes Care. 1999; 22: 275-279.

Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA. **Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay.** Early Hum Dev. 2001; 64: 21-25.

Berman M, Alter HJ, Ishak KG, Purcell RH, Jones EA. **The chronic sequelae of non-A, non-B hepatitis.** Ann Intern Med 1979; 91: 1-6.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A 'new' antigen in leukemia sera. J Am Med Assoc 1965; 191: 541-546.

Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinler M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al. **Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets.** J Biol Chem 2006, 281: 22236-47.

Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. **Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication.** Hepatology 2002; 36: 211-8.

Bradley DW. **The agents of non-A, non-B viral hepatitis.** J. Virol Methods 1985; 10: 307-319.

Brandão AB, Fuchs SC, Silva MAA, Emer LF. **Diagnóstico da Hepatite C na prática médica: revisão da literatura.** Rev Panam Salud Publica 2001; 9: 161-168.

Brasil, Lei nº 326, de 06 de outubro de 1992. **Dispõe sobre a obrigatoriedade de realização dos exames para diagnóstico precoce da Fenilcetonúria e do Hipotireoidismo Congênito nos hospitais e maternidades do Distrito Federal.** Diário Oficial [da república Federativa do Brasil]. Brasília, 07 out. 1992.

Brasil. Gabinete do Ministro. Ministério da Saúde. Portaria nº 822, de 06 de junho de 2001. **Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal / PNTN.** Diário Oficial [da república Federativa do Brasil]. Brasília, 07 jun.. 2001; Seção 1, col. 2, p.33.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial [da república Federativa do Brasil]. Brasília, 02 jun. 2003 [on line] [consultado em 23 jul. 2011]; Disponível: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.html.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 151, de 16 de outubro de 2009. **Aprova etapas sequenciadas e o fluxograma mínimo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV; determina o uso do teste rápido para o diagnóstico da infecção pelo HIV; define que as amostras podem ser de soro, plasma, sangue total ou sangue seco em papel filtro; e estabelece que todos os reagentes utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HIV devem ter registros vigentes na Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Diário Oficial [da república Federativa do Brasil]. Brasília, 16 out. 2009; Seção 1, n. 198, p.40-4.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais.** Ano I-nº 1, Brasília; 2010a [on line] [consultado em 04 mai. 2011]; Disponível: www.aids.gov.br/publicacao/boletim-epidemiologico-das-hepatites-virais-2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Hepatites Virais: desafios para o período de 2011 a 2012.** Brasília; 2010b [on line] [consultado em 04 mai. 2011]; Disponível: www.aids.gov.br/publicacao/hepatites-virais-desafios-para-o-periodo-de-2011-2012.

- Brass V, Moradpour D, Blum H. **Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update.** *Int. J. Med. Sci.* 2006; 3: 29-34.
- Budkowska A. **Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV) – a new paradigm in virus-cell interaction.** *Pol J Microbiol* 2009, 2: 93-98.
- Burlone ME, Budkowska A. **Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors.** *J Gen Virol* 2009, 90: 1055-1070.
- Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et.al. **A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors.** *Transfusion* 2005; 45: 254-264.
- Cao J, Chen Q, Zhang H, Qi P, Liu C, Yang X, et al. **Novel envolved immunoglobulin (Ig)-binding molecules enhance the detection of IgM against hepatitis C virus.** *PLoS ONE* 2011; 6: e18477.
- Cassol S, Salas T, Gill MJ, Montpetit M, Rudnik J, Sy CT , et al. **Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus DNA by polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3039-3042.
- Castro AC, Borges LGA, Souza RS, Crudzinski M, D'Azevedo PA. **Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (DBS) samples.** *Rev Inst Med Trop* 2008; 50: 151-156.
- Chevaliez S. **Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection.** *Clin Microbiol Infect* 2010; 17: 116-121.
- Choo Q L, Kuo G, Weiner A, Overby L R , Bradley D W, Houghton M. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.** *Science* 1989; 244: 359–62.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Approved Guideline – EP5-A2: Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods.** Second Edition, Wayne, PA, USA; 2004.
- Costa X, Jardi R, Rodrigues F, Miravittles M, Cotrina M, Gonzales C, et al. **Simple method for alpha1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens.** *Eur Respir J.* 2000; 15: 1111-1115.
- Croom HA, Richards KM, Best SJ, Francis BH, Johnson EI, Dax EM, et al. **Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots.** *J Clin Virol.* 2006; 36: 68-71.
- Crowther J.R. **The ELISA guidebook: Methods in molecular biology.** Volume 149. Totowa, New Jersey. Humana Press, 2001.

Cruz HM, da Silva EF, Villela-Nogueira CA, Nabuco LC, Rodrigues do Ó KM, Lewis-Ximenez LL, et al. **Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen.** J Clin Lab Anal 2011; 25: 134-141.

De Almeida LM, Azevedo RS, Guimarges AAM, Coutinho ESF, Struchiner CJ, Massad E. **Detection of antibodies against hepatitis A virus in eluates of blood spotted on filter-paper: a pilot study in Rio de Janeiro, Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 401-404.

Desbois D, Roque-Afonso AM, Lebraund P, Dussaix E. **Use of dried plasma spots for serological and molecular detection of hepatitis A virus.** J Clin Microbiol 2009; 47: 1536-1542.

Di Bisceglie AM, Order SE, Klein JL, Waggoner JG, Sjogren MH, Kuo G, et al. **The role of chronic viral hepatitis in hepatocellular carcinoma in the United States.** Am J Gastroenterol 1991; 86: 335-338.

Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV. **Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century.** Vox Sang 2011; 100: 92-98.

Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LM. **Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls.** Ther Drug Monit 2009; 31: 327-336.

ETI-AB-HCVK-4 [Bula]. Vercelli, Itália: DiaSorin; 2004.

Fachiroh J, Prasetyanti PR, Paramita DK, Prasetyawati AT, Anggrahini DW, Haryana SM, et al. **Dried-blood sampling for Epstein-Barr virus immunoglobulin G (IgG) and IgA serology in nasopharyngeal carcinoma screening.** J Clin Microbiol 2008; 46: 1374-1380.

Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. **Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients.** Gastroenterology 1997; 112: 463-472.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. **Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness.** Science 1973; 182: 1026-1028.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. **Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A ou B.** N Engl J Med 1975; 292: 767-770.

Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. **Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform.** Infect Immun 1983; 41: 816-821.

Ferrari E, He Z, Palermo RE, Huang HC. **Hepatitis C virus NS5B polymerase exhibits distinct nucleotide requirements for initiation and elongation.** J Biol Chem 2008; 283: 33893-901.

Garrido C, Zahonero N, Corral A, Arredondo M., Soriano V, de Mendoza C. **Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests.** J Clin Microbiol. 2009; 47: 1031-1036.

The Global Burden of Hepatitis C Working Group. **Global burden of disease (GBD) for hepatitis C.** J Clin Pharmacol 2004; 44: 20-29.

Gil A, Gonzalez A, Dal-Ré R, Dominguez V, Astasio P, Aguilar L. **Detection of antibodies against hepatitis A in blood spots dried on filter paper. Is this a reliable method for epidemiological studies?** Epidemiol Infect 1997; 118: 189-191.

Guthrie R, Suzi A. **A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants.** Pediatrics 1963; 32: 338-343.

HCV Ab [Bula]. Pomezia, Itália: Radim SPA; 2005.

Helfand RF, Keyserling HL, Williams I, Murray A, Mei J, Moscatiello C, et al. **Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and plasma samples.** J Med Virol 2001; 65: 751-757.

Helfand RF, Cabezas C, Abernathy E, Castillo-Solorzano C, Ortiz AC, Sun H, et al. **Dried blood spots versus sera for detection of rubella virus-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG in samples collected during a rubella outbreak in Peru.** Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 1522-1525.

World Health Organization. **Hepatitis C.** Wkly Epidemiol Rec 1997; 72: 65-69.

World Health Organization. **Hepatitis C-global prevalence (update).** Wkly Epidemiol Rec 2000; 75: 18-19.

Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Stevens CE, et al. **Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group.** Intervirology 1978; 10: 60-68.

Hoofnagle JH, Alter HJ. **Chronic non-A, non-B hepatitis.** Prog Clin Biol Res 1985; 182: 63-9.

Hospital Federal dos Servidores do Estado / MS. **O paciente / cidadão. Serviço de Hemoterapia** [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2008. [capturado 14 dez. 2008] Disponível em: URL: <http://www.hse.rj.saude.gov.br/cidadao/clin/hemote.asp>

Houghton M. **Discovery of the hepatitis C virus.** Liver Int 2009a; 29 (s1): 82-88.

Houghton M. **The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus.** Hepatology 2009b; 51: 939-948.

Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan S-L. **Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication?** Virol 2007; 364: 1-9.

ICTVdB Picture Gallery (2005). **Virosphere 2005.** In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. [consultado em 30 abr. 2011] Disponível: URL: http://www.ictvdb.org/Images/Viroscoop2005_07minPoster.jpg

ICTVdB Management (2006). **00.026.0.03. Hepacivirus**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. [consultado em 30 abr. 2011] Disponível: URL: <http://www.ictvdb.org/Ictv/index.htm>

ICTVdB Management (2011). **Taxonomy browser (Hepacivirus)**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. [consultado em 30 abr. 2011] Disponível: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=11102>

Irshad M, Ansari MA, Singh A, Nag P, Raghvendra L, Singh S, et al. **HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenicity and response to treatment**. Hepatogastroenterology 2010; 54: 1529-38.

Jekel J. F.; Elmore J.G.; Katz D. L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre. Artmed, 1999.

Jinks DC, Minter M, Tarver DA, Vanderford M, Hejtmancik JF, McCabe ER. **Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening**. Hum Genet 1989; 81: 363-366.

Kapur S, Kapur S, Zava D. **Cardiometabolic risk factors assessed by a finger stick dried blood spot method**. J Diabetes Sci Technol 2008; 2: 236-241.

Karapanagiotidis T, Riddell M, Kelly H. **Detection of rubella immunoglobulin M from dried venous blood spots using a commercial enzyme immunoassay**. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53: 107-111.

Kesli R, Osdemir M, Kurtoglu MG, Baykan M, Baysal B. **Evaluation and comparison of three different anti-hepatitis C virus antibody test based on chemiluminescence and enzyme-linked immunosorbent assay methods used in the diagnosis of hepatitis C infections in Turkey**. J Int Med Res 2009; 37: 1420-29.

Khaliq S, Jahan S, Hassan S. **Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target**. Liver Int 2011; 31: 606-617.

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, et al. **Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus**. Hepatology 1990; 12: 671-675.

Koop CE. **Anatomy of the hepatitis C virus**. In: Hepatitis C an epidemic for anyone - The C. Everett Koop Institute, Dartmouth-Hitchcock Medical Center (Ed), Dartmouth College, Lebanon, USA. 2011. [consultado em 30 abr. 2011] Disponível: [URL: http://www.epidemic.org/thefacts/hepatitisc/anatomy/](http://www.epidemic.org/thefacts/hepatitisc/anatomy/).

Krugman S, Ward R, Giles JP. **The natural history of infectious hepatitis**. Am J Med 1962; 32: 717-728.

Lambert N. **Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis**. Dev Biol (Basel) 2007; 127:113-21.

Laperche S, Elghouzzi MH, Morel P, Asso-Bonnet M, Le Marrec N, Girault A, Servant-Delmas A, Bouchardeau F, Deschaseaux M, Piquet Y. **Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing?** Transfusion 2005; 45: 1965-1972.

Lavanchy D. **Envolving epidemiology hepatitis C virus.** Clin Microbiol Infect 2011; 17: 107-115.

Lima VL, Rangel O, Andrade VR, Silveira NY, Oliveira SS, Figueiredo LT. **Dengue: inquérito populacional para pesquisa de anticorpos e vigilância virológica no Município de Campinas, São Paulo, Brasil.** Cad. Saúde Pública. 2007; 23:669-680.

Lin YQ, Khetarpal R, Zhang Y, Song H, Li SS. **Combination of ELISA and dried blood spot technique for the quantification of large molecules using exenatide as a model.** J Pharmacol Toxicol Methods 2011 (no pub).

Madi JM, Souza R da S, Araújo BF, Oliveira Filho PF, Rombaldi RL, Mitchell C, et al. **Prevalence of toxoplasmosis, HIV, syphilis and rubella in a population of puerperal women using Whatman 903 filter paper.** Braz J Infect Dis. 2010; 14: 24-29.

Margotto P. **Curva ROC – Como fazer e interpretar no SPSS.** Curso de medicina da Escola Superior de Ciências da Saúde. SES. DF, Brasília. [consultado em 02 set. 2011] Disponível: URL:paulomargotto.com.br/documentos/Curva_ROC_SPSS.pdf.

Martins T, Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL. **Epidemiology of hepatitis C virus infection.** Rev Assoc Med Bras 2011; 57: 105-110.

McCarron B, Fox R, Wilson K, Cameron S, McMenemy J, McGregor G, et al. **Hepatitis C antibody detection in dried blood spots.** J Viral Hepat. 1999; 6:453-6.

McDade TW, Willians S, Snodgrass JJ. **What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research.** Demography 2007; 44: 889-925.

Medina, H.C. **Padronização da detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B em amostras de saliva.** Universidade Gama Filho. 2008.

Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. **Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens.** J Nutr. 2001; 131: 1631S-1636S.

Melgaço JG, Pinto MA, Rocha AM, Freire M, Gaspar LP, Lima SMB, et al. **The use of dried blood spots for assessing antibody response to hepatitis A virus after natural infection and vaccination.** J Med Virol 2011; 83: 208-217.

Mercader S, Featherstone D, Bellini WJ. **Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology.** J Virol Methods 2006; 137: 140-149.

Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostaing L, Izopet J. **Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients.** J Clin Virol 2010; 48 (1): 18-21.

Monolisa™ HCV Ag - Ab ULTRA [Bula]. Marnes-la-Coquette, França: Bio-Rad; 2006.

Montebugnoli L, Borea G, Miniero R, Sprovieri G. **A rapid test for the visual detection of anti-hepatitis C virus antibodies in whole blood.** Clin Chim Acta. 1999; 288: 91-6.

Moradpour D, Penin F, Rice C. **Replication of hepatitis C virus.** Nat Rev Microbiol 2007, 5: 453-463.

Moscato GA, Giannelli G, Grandi B, Pieri D, Marsi O, Guarducci I, et al. **Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C.** Intervirology 2011; 54: 61-65.

Murex HCV Ag/Ab Combination [Bula]. República da África do Sul: Abbott Murex; 2006.

Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabban S. **Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences.** J Clin Microbiol 2007, 45: 1102-12.

Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R. **Newborn screening for congenital infectious diseases.** Emerg Infect Dis. 2004; 10: 1068-73.

NIH – The National Institutes of Health. **Management of hepatitis C: 2002.** Consensus Conference Statement. 2002; 19 (3): 1-46. [consultado em 30 abr. 2011] Disponível: URL: <http://consensus.nih.gov/2002/2002HepatitisC2002116html.htm>

Oliveira CA, Mendes ME. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática.** 1 ed. Rio de Janeiro: ControlLab; 2010. 144p.

Park Y, Lee JH, Kim BS, Kim do Y, Han KH, Kim HS. **New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification.** J Clin Microbiol 2010; 48: 2253-6.

Parker SP, Taylor MB, Ades AE, Cubitt WD, Peckham C. **Use of dried blood spots for detection and confirmation of HTLV-I specific antibodies for epidemiological purposes.** J Clin Pathol 1995; 48: 904-907.

Parker SP, Cubitt WD, Ades AE. **A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots.** J Virol Methods. 1997; 68: 199-205.

Parker SP, Cubitt WD. **The use of dried blood spot sample in epidemiological studies.** J Clin Pathol 1999; 52: 633-639.

Parker SP, Khan HI, Cubitt WD. **Detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spot samples from mothers and their offspring in Lahore, Pakistan.** J Clin Microbiol. 1999; 37: 2061-2063.

- Patton JC, Coovadia AH, Meyers TM, Sherman GG. **Evaluation of the ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen assay performed on dried blood spots for diagnosis of HIV-1 infection in infants.** *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 388-391.
- Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, et al. **NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional HCV replication complexes.** *J Virol* 2011; 85: 6963-6976.
- Pawlotsky JM. **Use and interpretation of virological test for hepatitis C.** *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1): S565-73.
- Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingard P, Moradpour D, Descamps V, et al. **NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly.** *PLoS Pathog* 2011; 7: 1-20.
- Punnarugsa V, Mungmee V. **Detection of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies in whole blood on whatman paper: comparison with detection in sera.** *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2209-2212.
- Ridell MA, Leydon JA, Catton MG, Kelly HA. **Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme immunoassay.** *J Clin Microbiol* 2002; 40: 5-9.
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. **Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization.** *Arch Virol* 1998; 143: 2493-2503.
- Romano KP, Laine JM, Deveau LM, Cao H, Massi F, Schiffer CA. **Molecular mechanisms of viral and host-cell substrate recognition by HCV NS3/4A protease.** *J Virol* 2011; 377-311.
- Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. **Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification.** *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1161-8.
- Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ, Alter HJ, Iber FL, et al. **Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis.** *N Engl J Med* 1992; 327: 1906-1911.
- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-567.
- Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. **Non-A, non-B hepatitis: Ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees.** *Science* 1979; 205: 197-200.
- Silva EF, Miguel JC, Santana IC, Lampe E, Villar LM. **Avaliação de ensaios imunoenzimáticos comerciais para detecção de anticorpos anti-HCV.** 44º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. 2010.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. **Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes.** *Hepatology* 2005; 42:962-973.

Skogstrand K, Thorsen P, Nørgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sørensen LC, Hougaard DM. **Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology.** *Clin Chem* 2005; 51: 1854-1866.

Solmone M, Girardi E, Costa F, Pucillo L, Ippolito G, Capobianchi MR. **Simple and reliable method for detection and genotyping of hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature.** *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3512-4.

Spooner N, Lad R, Barfield M. **Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method.** *Anal Chem* 2009; 81: 1557-1563.

Steger KA, Craven DE, Shea BF, Fitzgerald BR, Schwerzler M, Seage GR 3rd, et al. **Use of paper-absorbed fingerstick blood samples for studies of antibody to human immunodeficiency virus type 1 in intravenous drug users.** *J Infect Dis.* 1990; 162: 964-967.

Tappin DM, Greer K, Camaron S, Kennedy R, Brown AJ, Girwood RWA. **Maternal antibody to hepatitis B core antigen detected in dried neonatal blood spot samples.** *Epidemiol Infect* 1998; 121: 387-390.

Tourinho RS, Amado LA, Villar LM, Sampaio DV, Moraes AC, Rodrigues do Ó KM, et al. **Importance of the cutoff ratio for detecting antibodies against hepatitis A virus in oral fluids by enzyme immunoassay.** *J Virol Methods* 2011; 173: 169-174.

Tuailon E, Mondain AM, Meroueh F, Ottomani L, Picot MC, Nagot N, et al.. **Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing.** *Hepatology* 2010; 51: 1-7.

Villa E, Cartolari R, Bellentani S, Rivasi P, Casolo G, Manenti F. **Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research.** *J. Clin Pathol* 1981; 34:809-812.

Villar LM, Oliveira JC, Cruz HM, Yoshida CFT, Lampe E, Lewis-Ximenez LL. **Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers.** *J Med Virol* 2011; 83: 1522-1529.

World Health Organization. **World Health Report**, Geneva, Suíça, 1996.

Yang JF, Lin YY, Hsieh MH, Tsai CH, Liu SF, Yu ML, et al. **Performance characteristics of a combined hepatitis C virus core antigen and anti-hepatitis C virus antibody test in different patient groups.** *Kaohsiung J Med Sci* 2011; 27:258-63.

8- ANEXOS

8.1- Casos notificados com anti-HCV ⁽¹⁾ reagente (número e taxa de detecção por 100.000 hab.) segundo UF e região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999-2009 ⁽²⁾

| UF de residência | 1999 | | 2000 | | 2001 | | 2002 | | 2003 | | 2004 | | 2005 | | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2009 ⁽³⁾ | | Total ⁽⁴⁾ 1999-2009 |
|---------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|---------------------|------|-----------------------------------|
| | n ^o | taxa | n ^o | taxa | |
| Brasil | 427 | 0,3 | 994 | 0,6 | 1856 | 1,1 | 5739 | 3,3 | 10310 | 5,8 | 16721 | 9,3 | 19275 | 10,5 | 19460 | 10,5 | 17591 | 9,3 | 19831 | 10,5 | 20546 | 10,7 | 132950 |
| Norte | 23 | 0,2 | 217 | 1,7 | 253 | 1,9 | 403 | 3,0 | 396 | 2,9 | 389 | 2,8 | 430 | 2,9 | 453 | 3,0 | 467 | 3,0 | 607 | 4,0 | 702 | 4,6 | 4340 |
| Roraima | 22 | 1,7 | 24 | 1,7 | 34 | 2,4 | 43 | 3,0 | 57 | 3,9 | 79 | 5,3 | 86 | 5,6 | 127 | 8,1 | 171 | 10,8 | 119 | 8,0 | 68 | 4,5 | 830 |
| Acre | 1 | 0,2 | 128 | 23,0 | 117 | 20,4 | 101 | 17,2 | 152 | 25,3 | 93 | 15,1 | 149 | 22,2 | 141 | 20,5 | 92 | 13,1 | 175 | 25,7 | 241 | 34,9 | 1390 |
| Amapá | 0 | 0,0 | 59 | 2,1 | 69 | 2,4 | 141 | 4,8 | 59 | 1,9 | 86 | 2,8 | 16 | 0,5 | 21 | 0,6 | 28 | 0,8 | 73 | 2,2 | 74 | 2,2 | 626 |
| Roraima | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,6 | 40 | 11,5 | 8 | 2,2 | 12 | 3,3 | 34 | 8,7 | 56 | 13,9 | 40 | 9,6 | 53 | 12,8 | 108 | 25,6 | 353 |
| Pará | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 5 | 0,1 | 40 | 0,6 | 57 | 0,9 | 58 | 0,9 | 69 | 1,0 | 64 | 0,9 | 63 | 0,9 | 96 | 1,3 | 130 | 1,7 | 582 |
| Amapá | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 13 | 2,6 | 12 | 2,3 | 35 | 6,5 | 38 | 6,9 | 32 | 5,4 | 16 | 2,6 | 35 | 5,5 | 45 | 7,3 | 30 | 4,8 | 256 |
| Tocantins | 0 | 0,0 | 6 | 0,5 | 13 | 1,1 | 26 | 2,2 | 28 | 2,3 | 23 | 1,8 | 44 | 3,4 | 28 | 2,1 | 38 | 2,8 | 46 | 3,6 | 51 | 3,9 | 303 |
| Nordeste | 2 | 0,0 | 17 | 0,0 | 44 | 0,1 | 157 | 0,3 | 446 | 0,9 | 719 | 1,4 | 1214 | 2,4 | 1203 | 2,3 | 739 | 1,4 | 1067 | 2,0 | 1282 | 2,4 | 6890 |
| Maranhão | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 3 | 0,1 | 30 | 0,5 | 62 | 1,1 | 59 | 1,0 | 131 | 2,1 | 160 | 2,6 | 78 | 1,2 | 162 | 2,6 | 113 | 1,8 | 799 |
| Piauí | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 8 | 0,3 | 3 | 0,1 | 11 | 0,4 | 8 | 0,3 | 3 | 0,1 | 3 | 0,1 | 7 | 0,2 | 43 |
| Ceará | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 10 | 0,1 | 34 | 0,4 | 42 | 0,5 | 228 | 2,8 | 230 | 2,8 | 52 | 0,6 | 75 | 0,9 | 140 | 1,6 | 811 |
| Rio Grande do Norte | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 6 | 0,2 | 2 | 0,1 | 8 | 0,3 | 41 | 1,4 | 65 | 2,2 | 57 | 1,9 | 52 | 1,7 | 96 | 3,1 | 81 | 2,6 | 408 |
| Paraíba | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 4 | 0,1 | 4 | 0,1 | 16 | 0,5 | 31 | 0,9 | 34 | 0,9 | 59 | 1,6 | 41 | 1,1 | 25 | 0,7 | 46 | 1,2 | 260 |
| Pernambuco | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,0 | 24 | 0,3 | 106 | 1,3 | 214 | 2,6 | 309 | 3,7 | 199 | 2,3 | 146 | 1,7 | 165 | 1,9 | 144 | 1,6 | 1309 |
| Alagoas | 1 | 0,0 | 2 | 0,1 | 8 | 0,3 | 36 | 1,2 | 40 | 1,4 | 101 | 3,4 | 88 | 2,9 | 54 | 1,8 | 59 | 1,9 | 63 | 2,0 | 127 | 4,0 | 579 |
| Sergipe | 1 | 0,1 | 1 | 0,1 | 3 | 0,2 | 8 | 0,4 | 57 | 3,0 | 60 | 3,2 | 66 | 3,4 | 93 | 4,6 | 73 | 3,6 | 70 | 3,5 | 90 | 4,5 | 522 |
| Bahia | 0 | 0,0 | 13 | 0,1 | 18 | 0,1 | 43 | 0,3 | 115 | 0,9 | 168 | 1,2 | 282 | 2,0 | 343 | 2,5 | 235 | 1,7 | 408 | 2,8 | 534 | 3,6 | 2159 |
| Sudeste | 262 | 0,4 | 349 | 0,5 | 834 | 1,1 | 3120 | 4,2 | 5920 | 7,9 | 10394 | 13,6 | 11578 | 14,8 | 12198 | 15,3 | 11022 | 13,7 | 11841 | 14,8 | 12514 | 15,5 | 80032 |
| Minas Gerais | 8 | 0,0 | 9 | 0,1 | 26 | 0,1 | 177 | 1,0 | 281 | 1,5 | 556 | 3,0 | 874 | 4,5 | 789 | 4,1 | 794 | 4,0 | 764 | 3,8 | 943 | 4,7 | 5221 |
| Espírito Santo | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 8 | 0,3 | 51 | 1,6 | 212 | 6,5 | 370 | 11,2 | 273 | 8,0 | 281 | 8,1 | 224 | 6,4 | 210 | 6,1 | 209 | 6,0 | 1840 |
| Rio de Janeiro | 3 | 0,0 | 20 | 0,1 | 70 | 0,5 | 375 | 2,5 | 1237 | 8,3 | 1446 | 9,6 | 1243 | 8,1 | 1422 | 9,1 | 904 | 5,7 | 977 | 6,2 | 644 | 4,0 | 8341 |
| São Paulo | 251 | 0,7 | 318 | 0,9 | 730 | 1,9 | 2517 | 6,6 | 4190 | 10,8 | 8022 | 20,4 | 9188 | 22,7 | 9706 | 23,6 | 9100 | 21,8 | 9890 | 24,1 | 10718 | 25,9 | 64630 |
| Sul | 124 | 0,5 | 209 | 0,8 | 579 | 2,3 | 1419 | 5,5 | 2897 | 11,1 | 4426 | 16,8 | 4806 | 17,8 | 4886 | 17,9 | 4420 | 16,0 | 5402 | 19,6 | 4948 | 17,9 | 34116 |
| Paraná | 1 | 0,0 | 8 | 0,1 | 76 | 0,8 | 109 | 1,1 | 602 | 6,1 | 877 | 8,8 | 836 | 8,1 | 959 | 9,2 | 754 | 7,2 | 843 | 8,0 | 816 | 7,6 | 5881 |
| Santa Catarina | 34 | 0,7 | 48 | 0,9 | 100 | 1,8 | 366 | 6,6 | 464 | 8,3 | 944 | 16,6 | 1202 | 20,5 | 1069 | 17,9 | 999 | 16,5 | 936 | 15,5 | 892 | 14,6 | 7054 |
| Rio Grande do Sul | 89 | 0,9 | 153 | 1,5 | 403 | 3,9 | 944 | 9,1 | 1831 | 17,4 | 2605 | 24,5 | 2768 | 25,5 | 2858 | 26,1 | 2667 | 24,1 | 3623 | 33,4 | 3240 | 29,7 | 21181 |
| Centro-Oeste | 16 | 0,1 | 202 | 1,7 | 145 | 1,2 | 640 | 5,3 | 648 | 5,3 | 785 | 6,3 | 1240 | 9,5 | 910 | 6,9 | 941 | 7,0 | 912 | 6,7 | 1098 | 7,9 | 7537 |
| Mato Grosso do Sul | 16 | 0,8 | 6 | 0,3 | 16 | 0,8 | 146 | 6,8 | 184 | 8,5 | 225 | 10,2 | 348 | 15,4 | 265 | 11,5 | 188 | 8,1 | 236 | 10,1 | 310 | 13,1 | 1940 |
| Mato Grosso | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | 0,1 | 25 | 1,0 | 41 | 1,5 | 26 | 1,0 | 64 | 2,3 | 67 | 2,3 | 106 | 3,6 | 131 | 4,4 | 178 | 5,9 | 641 |
| Goiás | 0 | 0,0 | 16 | 0,3 | 62 | 1,2 | 367 | 7,0 | 334 | 6,3 | 431 | 8,0 | 524 | 9,3 | 401 | 7,0 | 458 | 7,8 | 371 | 6,3 | 353 | 6,0 | 3317 |
| Distrito Federal | 0 | 0,0 | 180 | 8,8 | 64 | 3,1 | 102 | 4,8 | 89 | 4,1 | 103 | 4,6 | 304 | 13,0 | 177 | 7,4 | 189 | 7,8 | 174 | 6,8 | 257 | 9,9 | 1639 |

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Notas: (1) Marcador sorológico de contato com vírus da hepatite C; (2) Casos notificados no SINAN até dezembro de 2009; (3) Dados preliminares para 2009; (4) 11 casos ignorados quanto à UF de residência. Não foram retiradas as duplicidades de notificação. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

8.2- Casos confirmados de hepatite C⁽¹⁾ (número e taxa de detecção por 100.000 hab.) segundo UF e região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999-2009⁽²⁾

| UF de residência | 1999 | | 2000 | | 2001 | | 2002 | | 2003 | | 2004 | | 2005 | | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2009 ⁽³⁾ | | Tot ⁽⁴⁾ 1999-2009 |
|---------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|---------------------|------|---------------------------------|
| | n ^o | taxa | n ^o | taxa | n ^o |
| Brasil | 178 | 0,1 | 298 | 0,2 | 596 | 0,3 | 1886 | 1,1 | 3806 | 2,2 | 6860 | 3,8 | 8370 | 4,5 | 9098 | 4,9 | 10115 | 5,3 | 9954 | 5,2 | 9747 | 5,1 | 60908 |
| Norte | 2 | 0,0 | 27 | 0,2 | 12 | 0,1 | 23 | 0,2 | 52 | 0,4 | 65 | 0,5 | 120 | 0,8 | 99 | 0,7 | 240 | 1,6 | 270 | 1,8 | 255 | 1,7 | 1165 |
| Roraima | 2 | 0,2 | 1 | 0,1 | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 1 | 0,1 | 9 | 0,6 | 6 | 0,4 | 10 | 0,6 | 76 | 4,8 | 23 | 1,5 | 17 | 1,1 | 147 |
| Acre | 0 | 0,0 | 26 | 4,7 | 9 | 1,6 | 18 | 3,1 | 32 | 5,3 | 35 | 5,7 | 69 | 10,3 | 55 | 8,0 | 69 | 9,8 | 150 | 22,1 | 157 | 22,7 | 620 |
| Amazonas | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 6 | 0,2 | 19 | 0,6 | 1 | 0,0 | 31 |
| Roraima | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,3 | 1 | 0,3 | 0 | 0,0 | 2 | 0,5 | 4 | 1,0 | 7 | 1,7 | 6 | 1,4 | 3 | 0,7 | 8 | 1,9 | 32 |
| Pará | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 4 | 0,1 | 4 | 0,1 | 26 | 0,4 | 19 | 0,3 | 38 | 0,5 | 31 | 0,4 | 45 | 0,6 | 167 |
| Amapá | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 12 | 2,2 | 13 | 2,4 | 14 | 2,4 | 6 | 1,0 | 22 | 3,5 | 37 | 6,0 | 22 | 3,5 | 126 |
| Tocantins | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,1 | 3 | 0,2 | 1 | 0,1 | 1 | 0,1 | 1 | 0,1 | 23 | 1,7 | 7 | 0,5 | 5 | 0,4 | 42 |
| Nordeste | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 2 | 0,0 | 33 | 0,1 | 100 | 0,2 | 192 | 0,4 | 395 | 0,8 | 428 | 0,8 | 399 | 0,8 | 531 | 1,0 | 639 | 1,2 | 2721 |
| Maranhão | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 5 | 0,1 | 2 | 0,0 | 2 | 0,0 | 6 | 0,1 | 18 | 0,3 | 25 | 0,4 | 67 | 1,1 | 17 | 0,3 | 142 |
| Piauí | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 2 |
| Ceará | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 5 | 0,1 | 13 | 0,2 | 11 | 0,1 | 65 | 0,8 | 89 | 1,1 | 29 | 0,3 | 35 | 0,4 | 83 | 1,0 | 330 |
| Rio Grande do Norte | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 1 | 0,0 | 9 | 0,3 | 41 | 1,4 | 35 | 1,1 | 43 | 1,4 | 65 | 2,1 | 52 | 1,7 | 248 |
| Paraná | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 2 | 0,1 | 10 | 0,3 | 22 | 0,6 | 19 | 0,5 | 5 | 0,1 | 7 | 0,2 | 67 |
| Pernambuco | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 4 | 0,0 | 14 | 0,2 | 56 | 0,7 | 96 | 1,1 | 46 | 0,5 | 64 | 0,7 | 31 | 0,4 | 10 | 0,1 | 321 |
| Alagoas | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 2 | 0,1 | 11 | 0,4 | 9 | 0,3 | 26 | 0,9 | 25 | 0,8 | 28 | 0,9 | 25 | 0,8 | 30 | 1,0 | 76 | 2,4 | 233 |
| Sergipe | 1 | 0,1 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,1 | 40 | 2,1 | 40 | 2,1 | 31 | 1,6 | 48 | 2,4 | 42 | 2,1 | 41 | 2,1 | 44 | 2,2 | 289 |
| Bahia | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 4 | 0,0 | 19 | 0,1 | 46 | 0,3 | 121 | 0,9 | 142 | 1,0 | 152 | 1,1 | 257 | 1,8 | 348 | 2,4 | 1089 |
| Sudeste | 101 | 0,1 | 161 | 0,2 | 348 | 0,5 | 1339 | 1,8 | 2672 | 3,5 | 4970 | 6,5 | 5978 | 7,6 | 6528 | 8,2 | 6882 | 8,5 | 6622 | 8,3 | 6620 | 8,2 | 42221 |
| Minas Gerais | 2 | 0,0 | 7 | 0,0 | 5 | 0,0 | 36 | 0,2 | 63 | 0,3 | 161 | 0,9 | 323 | 1,7 | 333 | 1,7 | 443 | 2,2 | 327 | 1,6 | 467 | 2,3 | 2167 |
| Espírito Santo | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 11 | 0,3 | 31 | 1,0 | 73 | 2,2 | 53 | 1,6 | 88 | 2,5 | 99 | 2,8 | 87 | 2,5 | 88 | 2,5 | 531 |
| Rio de Janeiro | 1 | 0,0 | 7 | 0,0 | 13 | 0,1 | 96 | 0,7 | 301 | 2,0 | 400 | 2,7 | 334 | 2,2 | 451 | 2,9 | 355 | 2,3 | 253 | 1,6 | 205 | 1,3 | 2416 |
| São Paulo | 98 | 0,3 | 146 | 0,4 | 330 | 0,9 | 1194 | 3,1 | 2277 | 5,9 | 4336 | 11,1 | 5268 | 13,0 | 5656 | 13,8 | 5985 | 14,4 | 5955 | 14,5 | 5860 | 14,2 | 37107 |
| Sul | 71 | 0,3 | 109 | 0,4 | 217 | 0,9 | 358 | 1,4 | 852 | 3,3 | 1447 | 5,5 | 1656 | 6,1 | 1819 | 6,7 | 2176 | 7,9 | 2210 | 8,0 | 1852 | 6,7 | 12767 |
| Paraná | 0 | 0,0 | 2 | 0,0 | 23 | 0,2 | 17 | 0,2 | 104 | 1,0 | 165 | 1,6 | 145 | 1,4 | 244 | 2,3 | 334 | 3,2 | 289 | 2,7 | 182 | 1,7 | 1505 |
| Santa Catarina | 13 | 0,3 | 15 | 0,3 | 31 | 0,6 | 68 | 1,2 | 108 | 1,9 | 394 | 6,9 | 538 | 9,2 | 473 | 7,9 | 661 | 10,9 | 592 | 9,8 | 530 | 8,7 | 3423 |
| Rio Grande do Sul | 58 | 0,6 | 92 | 0,9 | 163 | 1,6 | 273 | 2,6 | 640 | 6,1 | 888 | 8,4 | 973 | 9,0 | 1102 | 10,1 | 1181 | 10,7 | 1329 | 12,2 | 1140 | 10,4 | 7839 |
| Centro-Oeste | 3 | 0,0 | 0 | 0,0 | 17 | 0,1 | 133 | 1,1 | 128 | 1,0 | 184 | 1,5 | 216 | 1,7 | 222 | 1,7 | 418 | 3,1 | 321 | 2,3 | 381 | 2,7 | 2023 |
| Mato Grosso do Sul | 3 | 0,1 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 8 | 0,4 | 20 | 0,9 | 21 | 1,0 | 65 | 2,9 | 54 | 2,3 | 68 | 2,9 | 58 | 2,5 | 91 | 3,9 | 389 |
| Mato Grosso | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 2 | 0,1 | 4 | 0,2 | 0 | 0,0 | 14 | 0,5 | 31 | 1,1 | 55 | 1,9 | 36 | 1,2 | 48 | 1,6 | 191 |
| Goiás | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 15 | 0,3 | 123 | 2,4 | 101 | 1,9 | 159 | 2,9 | 126 | 2,2 | 117 | 2,0 | 189 | 3,2 | 139 | 2,4 | 87 | 1,5 | 1056 |
| Distrito Federal | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | 0,1 | 4 | 0,2 | 11 | 0,5 | 20 | 0,8 | 106 | 4,4 | 88 | 3,4 | 155 | 5,9 | 387 |

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Notas: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os seguintes marcadores sorológicos reagentes: Anti-HCV e HCV-RNA; (2) Casos notificados no SINAN até dezembro de 2009; (3) Dados preliminares para 2009; (4) 11 casos ignorados quanto à UF de residência. Não foram retiradas as duplicidades de notificação. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

8.3- Casos confirmados de hepatite C⁽¹⁾ (número e taxa de detecção por 100.000 hab.) e razão de sexos segundo ano de notificação. Brasil, 1999-2009

| Ano de notificação | Número de casos | | | Razão M:F | Taxa de detecção | | |
|---------------------|-----------------|----------|----------------------|-----------|------------------|----------|-------|
| | Masculino | Feminino | Total ⁽³⁾ | | Masculino | Feminino | Total |
| 1999 | 123 | 55 | 178 | 2,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| 2000 | 198 | 100 | 298 | 2,0 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| 2001 | 405 | 191 | 596 | 2,1 | 0,5 | 0,2 | 0,3 |
| 2002 | 1271 | 615 | 1886 | 2,1 | 1,5 | 0,7 | 1,1 |
| 2003 | 2369 | 1428 | 3806 | 1,7 | 2,7 | 1,6 | 2,2 |
| 2004 | 4268 | 2592 | 6860 | 1,6 | 4,8 | 2,9 | 3,8 |
| 2005 | 5260 | 3110 | 8370 | 1,7 | 5,8 | 3,3 | 4,5 |
| 2006 | 5550 | 3545 | 9098 | 1,6 | 6,0 | 3,7 | 4,9 |
| 2007 | 6073 | 4041 | 10115 | 1,5 | 6,5 | 4,2 | 5,3 |
| 2008 | 5850 | 4104 | 9954 | 1,4 | 6,3 | 4,3 | 5,2 |
| 2009 ⁽⁴⁾ | 5780 | 3967 | 9747 | 1,5 | 6,1 | 4,1 | 5,1 |
| Total | 37147 | 23748 | 60908 | - | - | - | - |

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Notas: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os seguintes marcadores sorológicos reagentes: Anti-HCV e HCV-RNA; (2) Casos notificados no SINAN até dezembro de 2009; (3) 13 casos ignorados quanto ao sexo; (4) Dados preliminares para 2009. Não foram retiradas as duplicidades de notificação. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

8.4- Casos confirmados de hepatite C⁽¹⁾ (número e taxa de detecção por 100.000 hab.) segundo sexo e faixa etária por ano de notificação. Brasil, 1999-2009

| Sexo/Faixa etária | 1999 | | 2000 | | 2001 | | 2002 | | 2003 | | 2004 | | 2005 | | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2009 ⁽²⁾ | | Total 1999-2009 |
|----------------------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|---------------------|------------|--------------------|
| | n ^o | taxa | n ^o | taxa | |
| Masculino | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 5 anos | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 5 | 0,1 | 13 | 0,1 | 22 | 0,2 | 18 | 0,2 | 23 | 0,2 | 39 | 0,5 | 38 | 0,5 | 34 | 0,4 | 192 |
| 05 a 12 | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 6 | 0,0 | 9 | 0,1 | 17 | 0,1 | 10 | 0,1 | 25 | 0,2 | 19 | 0,1 | 15 | 0,1 | 18 | 0,1 | 121 |
| 13 a 19 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 4 | 0,0 | 17 | 0,1 | 40 | 0,3 | 55 | 0,4 | 45 | 0,3 | 55 | 0,4 | 49 | 0,4 | 32 | 0,3 | 49 | 0,4 | 348 |
| 20 a 24 | 7 | 0,1 | 11 | 0,1 | 18 | 0,2 | 42 | 0,5 | 78 | 0,9 | 154 | 1,8 | 155 | 1,8 | 147 | 1,7 | 112 | 1,2 | 86 | 1,0 | 99 | 1,1 | 909 |
| 25 a 29 | 10 | 0,2 | 12 | 0,2 | 31 | 0,4 | 96 | 1,4 | 175 | 2,5 | 282 | 3,9 | 351 | 4,7 | 340 | 4,5 | 317 | 3,7 | 240 | 2,8 | 247 | 2,8 | 2101 |
| 30 a 34 | 24 | 0,4 | 37 | 0,6 | 66 | 1,0 | 190 | 2,9 | 303 | 4,6 | 549 | 8,2 | 614 | 8,9 | 598 | 8,5 | 496 | 6,8 | 502 | 6,7 | 482 | 6,2 | 3861 |
| 35 a 39 | 26 | 0,5 | 47 | 0,8 | 89 | 1,5 | 266 | 4,3 | 448 | 7,2 | 752 | 12,0 | 914 | 14,1 | 883 | 13,5 | 795 | 12,3 | 755 | 11,7 | 648 | 9,9 | 5623 |
| 40 a 49 | 34 | 0,4 | 59 | 0,6 | 122 | 1,3 | 437 | 4,6 | 783 | 8,1 | 1453 | 14,8 | 1794 | 17,7 | 1950 | 19,0 | 2263 | 19,9 | 2025 | 17,6 | 2039 | 17,5 | 12959 |
| 50 a 59 | 18 | 0,3 | 26 | 0,4 | 56 | 0,9 | 147 | 2,4 | 364 | 5,8 | 731 | 11,6 | 992 | 15,3 | 1100 | 16,8 | 1375 | 17,5 | 1458 | 18,1 | 1469 | 17,6 | 7736 |
| 60 e mais | 2 | 0,0 | 5 | 0,1 | 18 | 0,3 | 65 | 1,0 | 155 | 2,3 | 252 | 3,7 | 365 | 5,2 | 424 | 6,0 | 607 | 7,5 | 699 | 8,4 | 694 | 8,0 | 3286 |
| Total⁽³⁾ | 123 | 0,2 | 198 | 0,2 | 405 | 0,5 | 1271 | 1,5 | 2369 | 2,7 | 4268 | 4,8 | 5260 | 5,8 | 5550 | 6,0 | 6073 | 6,5 | 5850 | 6,3 | 5780 | 6,1 | 37147 |
| Feminino | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 5 anos | 3 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | 0,0 | 5 | 0,1 | 12 | 0,1 | 9 | 0,1 | 15 | 0,2 | 20 | 0,2 | 23 | 0,3 | 20 | 0,3 | 19 | 0,2 | 129 |
| 05 a 12 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 4 | 0,0 | 17 | 0,1 | 13 | 0,1 | 16 | 0,1 | 31 | 0,2 | 6 | 0,0 | 18 | 0,1 | 105 |
| 13 a 19 | 1 | 0,0 | 2 | 0,0 | 1 | 0,0 | 7 | 0,1 | 22 | 0,2 | 35 | 0,3 | 40 | 0,3 | 45 | 0,3 | 68 | 0,6 | 38 | 0,3 | 41 | 0,4 | 300 |
| 20 a 24 | 3 | 0,0 | 6 | 0,1 | 9 | 0,1 | 31 | 0,4 | 70 | 0,8 | 127 | 1,5 | 128 | 1,5 | 147 | 1,6 | 149 | 1,7 | 107 | 1,2 | 135 | 1,6 | 912 |
| 25 a 29 | 3 | 0,0 | 9 | 0,1 | 27 | 0,4 | 43 | 0,6 | 92 | 1,3 | 217 | 2,9 | 255 | 3,3 | 285 | 3,7 | 308 | 3,6 | 277 | 3,2 | 259 | 2,9 | 1775 |
| 30 a 34 | 6 | 0,1 | 8 | 0,1 | 21 | 0,3 | 71 | 1,0 | 132 | 1,9 | 258 | 3,7 | 285 | 3,9 | 310 | 4,2 | 365 | 4,8 | 361 | 4,7 | 385 | 4,9 | 2202 |
| 35 a 39 | 8 | 0,1 | 15 | 0,2 | 17 | 0,3 | 85 | 1,3 | 189 | 2,9 | 280 | 4,2 | 318 | 4,6 | 389 | 5,6 | 378 | 5,5 | 322 | 4,7 | 315 | 4,6 | 2316 |
| 40 a 49 | 17 | 0,2 | 31 | 0,3 | 50 | 0,5 | 167 | 1,6 | 356 | 3,4 | 685 | 6,5 | 827 | 7,7 | 951 | 8,7 | 962 | 7,8 | 971 | 7,8 | 850 | 6,7 | 5867 |
| 50 a 59 | 9 | 0,2 | 19 | 0,3 | 42 | 0,6 | 137 | 2,1 | 317 | 4,7 | 584 | 8,5 | 756 | 10,8 | 833 | 11,7 | 1029 | 11,9 | 1136 | 12,7 | 1083 | 11,7 | 5945 |
| 60 e mais | 5 | 0,1 | 10 | 0,1 | 21 | 0,3 | 69 | 0,8 | 232 | 2,8 | 377 | 4,5 | 471 | 5,5 | 548 | 6,3 | 728 | 7,2 | 866 | 8,3 | 862 | 8,0 | 4189 |
| Total⁽³⁾ | 55 | 0,1 | 100 | 0,1 | 191 | 0,2 | 615 | 0,7 | 1428 | 1,6 | 2592 | 2,9 | 3110 | 3,3 | 3545 | 3,7 | 4041 | 4,2 | 4104 | 4,3 | 3967 | 4,1 | 23748 |
| Total | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 5 anos | 3 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | 0,0 | 10 | 0,1 | 25 | 0,1 | 31 | 0,2 | 33 | 0,2 | 43 | 0,2 | 62 | 0,4 | 58 | 0,4 | 53 | 0,3 | 321 |
| 05 a 12 | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,0 | 6 | 0,0 | 13 | 0,0 | 34 | 0,1 | 23 | 0,1 | 41 | 0,1 | 50 | 0,2 | 21 | 0,1 | 36 | 0,1 | 226 |
| 13 a 19 | 2 | 0,0 | 3 | 0,0 | 5 | 0,0 | 24 | 0,1 | 62 | 0,2 | 90 | 0,3 | 85 | 0,3 | 100 | 0,4 | 117 | 0,5 | 70 | 0,3 | 90 | 0,4 | 648 |
| 20 a 24 | 10 | 0,1 | 17 | 0,1 | 27 | 0,2 | 73 | 0,4 | 148 | 0,9 | 281 | 1,6 | 283 | 1,6 | 295 | 1,7 | 261 | 1,4 | 193 | 1,1 | 234 | 1,3 | 1822 |
| 25 a 29 | 13 | 0,1 | 21 | 0,2 | 58 | 0,4 | 139 | 1,0 | 268 | 1,9 | 499 | 3,4 | 606 | 4,0 | 625 | 4,1 | 625 | 3,6 | 517 | 3,0 | 506 | 2,9 | 3877 |
| 30 a 34 | 30 | 0,2 | 45 | 0,3 | 87 | 0,7 | 261 | 1,9 | 436 | 3,2 | 807 | 5,9 | 899 | 6,3 | 908 | 6,3 | 861 | 5,8 | 863 | 5,7 | 867 | 5,5 | 6064 |
| 35 a 39 | 34 | 0,3 | 62 | 0,5 | 106 | 0,9 | 351 | 2,8 | 638 | 5,0 | 1032 | 8,0 | 1232 | 9,3 | 1272 | 9,4 | 1173 | 8,8 | 1077 | 8,1 | 963 | 7,2 | 7940 |
| 40 a 49 | 51 | 0,3 | 90 | 0,5 | 172 | 0,9 | 604 | 3,0 | 1142 | 5,7 | 2138 | 10,5 | 2621 | 12,6 | 2902 | 13,7 | 3225 | 13,6 | 2996 | 12,5 | 2889 | 11,9 | 18830 |
| 50 a 59 | 27 | 0,2 | 45 | 0,4 | 98 | 0,8 | 284 | 2,2 | 683 | 5,3 | 1315 | 10,0 | 1748 | 13,0 | 1934 | 14,2 | 2405 | 14,5 | 2594 | 15,3 | 2552 | 14,5 | 13685 |
| 60 e mais | 7 | 0,1 | 15 | 0,1 | 39 | 0,3 | 134 | 0,9 | 388 | 2,6 | 629 | 4,1 | 836 | 5,4 | 972 | 6,2 | 1335 | 7,3 | 1565 | 8,3 | 1556 | 8,0 | 7476 |
| Total⁽⁵⁾ | 178 | 0,1 | 298 | 0,2 | 596 | 0,3 | 1886 | 1,1 | 3806 | 2,2 | 6860 | 3,8 | 8370 | 4,5 | 9098 | 4,9 | 10115 | 5,3 | 9954 | 5,2 | 9747 | 5,1 | 60908 |

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS; População: Estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009). Notas: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os seguintes marcadores sorológicos reagentes: Anti-HCV e HCV-RNA; (2) Casos notificados no SINAN até dezembro de 2009; (3) 13 casos ignorados quanto ao sexo; (4) Dados preliminares para 2009; (5) 19 casos ignorados quanto à faixa etária. Não foram retiradas as duplicidades de notificação. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

8.5- Casos confirmados de hepatite C⁽¹⁾ (número e taxa de detecção por 100.000 hab.) segundo forma clínica por faixa etária. Brasil, 1999-2009

| Forma clínica | Aguda | | Crônica | | Fulminante | | Subtotal | | Inclusivo | | Ignorado/Em banco | | Total | |
|--------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|-----|----------------|------|----------------|-----|-------------------|-----|----------------|-------|
| | n ¹ | % | n ² | % | n ³ | % | n ¹ | % | n ¹ | % | n ³ | % | n ¹ | % |
| < 5 anos | 30 | 9,8 | 276 | 90,2 | 0 | 0,0 | 306 | 95,3 | 5 | 1,6 | 10 | 3,1 | 321 | 100,0 |
| 05 a 12 | 40 | 18,3 | 178 | 81,7 | 0 | 0,0 | 218 | 96,5 | 0 | 0,0 | 8 | 3,5 | 226 | 100,0 |
| 13 a 19 | 25 | 4,0 | 594 | 95,8 | 1 | 0,2 | 620 | 95,7 | 2 | 0,3 | 26 | 4,0 | 648 | 100,0 |
| 20 a 24 | 49 | 2,8 | 1705 | 97,0 | 3 | 0,2 | 1757 | 96,4 | 7 | 0,4 | 58 | 3,2 | 1822 | 100,0 |
| 25 a 29 | 97 | 2,6 | 3641 | 97,3 | 5 | 0,1 | 3743 | 96,5 | 9 | 0,2 | 125 | 3,2 | 3877 | 100,0 |
| 30 a 34 | 140 | 2,4 | 5705 | 97,5 | 5 | 0,1 | 5850 | 96,5 | 23 | 0,4 | 191 | 3,1 | 6064 | 100,0 |
| 35 a 39 | 154 | 2,0 | 7514 | 97,9 | 11 | 0,1 | 7679 | 96,7 | 29 | 0,4 | 232 | 2,9 | 7940 | 100,0 |
| 40 a 49 | 391 | 2,1 | 17845 | 97,7 | 35 | 0,2 | 18271 | 97,0 | 49 | 0,3 | 510 | 2,7 | 18830 | 100,0 |
| 50 a 59 | 263 | 2,0 | 12989 | 97,8 | 27 | 0,2 | 13279 | 97,0 | 40 | 0,3 | 366 | 2,7 | 13685 | 100,0 |
| 60 e mais | 140 | 1,9 | 7117 | 97,9 | 12 | 0,2 | 7269 | 97,2 | 28 | 0,4 | 179 | 2,4 | 7476 | 100,0 |
| Total ² | 1329 | 2,2 | 57582 | 97,6 | 99 | 0,2 | 59010 | 96,9 | 192 | 0,3 | 1706 | 2,8 | 60908 | 100,0 |

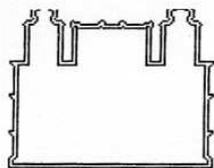
Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS Notas: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os seguintes marcadores sorológicos reagentes: Anti-HCV e HCV-RNA; (2) Casos notificados no SINAN até dezembro de 2009; (3) 19 casos ignorados quanto a faixa etária. Não foram retiradas as duplicidades de notificação. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

8.6- Casos confirmados de hepatite C⁽¹⁾ (número e percentual.) segundo a provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999-2009⁽²⁾

| Provável fonte/ mecanismo de infecção | 1999 | | 2000 | | 2001 | | 2002 | | 2003 | | 2004 | | 2005 | | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2009 ³ | | Total | |
|--|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|-------------------|--------------|----------------|--------------|
| | n ^o | % | n ^o | % | n ^o | % |
| Uso de drogas | 25 | 14,0 | 42 | 14,1 | 90 | 15,1 | 315 | 16,7 | 741 | 19,5 | 1210 | 17,6 | 1569 | 18,7 | 1428 | 17,9 | 1961 | 19,4 | 1580 | 15,9 | 1571 | 16,1 | 10732 | 17,6 |
| Transfusional | 15 | 8,4 | 39 | 13,1 | 72 | 12,1 | 275 | 14,6 | 710 | 18,7 | 1382 | 20,1 | 1546 | 18,5 | 1730 | 19,0 | 1224 | 12,1 | 1388 | 13,9 | 1298 | 13,3 | 9679 | 15,9 |
| Sexual | 10 | 5,6 | 10 | 3,4 | 24 | 4,0 | 159 | 8,4 | 370 | 9,7 | 735 | 10,7 | 818 | 9,8 | 865 | 9,5 | 909 | 9,0 | 770 | 7,7 | 837 | 8,6 | 5507 | 9,0 |
| Transmissão vertical | 1 | 0,6 | 0 | 0,0 | 2 | 0,3 | 2 | 0,1 | 9 | 0,2 | 25 | 0,4 | 22 | 0,3 | 37 | 0,4 | 47 | 0,5 | 33 | 0,3 | 37 | 0,4 | 215 | 0,4 |
| Acidente de trabalho | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,3 | 18 | 1,0 | 32 | 0,8 | 53 | 0,8 | 56 | 0,7 | 65 | 0,7 | 60 | 0,6 | 49 | 0,5 | 61 | 0,6 | 396 | 0,7 |
| Hemodíalise | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 106 | 1,0 | 59 | 0,6 | 73 | 0,7 | 238 | 0,4 |
| Domiciliar | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | 0,2 | 18 | 0,5 | 28 | 0,4 | 34 | 0,4 | 30 | 0,3 | 34 | 0,3 | 30 | 0,3 | 38 | 0,4 | 215 | 0,4 |
| Outros | 16 | 9,0 | 25 | 8,4 | 37 | 6,2 | 165 | 8,7 | 462 | 12,1 | 886 | 12,9 | 1194 | 14,3 | 1143 | 12,6 | 1427 | 14,1 | 1197 | 12,0 | 1227 | 12,6 | 7779 | 12,8 |
| Ignorado/Em branco | 111 | 62,4 | 182 | 61,1 | 369 | 61,9 | 949 | 50,3 | 1464 | 38,5 | 2541 | 37,0 | 3131 | 37,4 | 3600 | 39,6 | 4347 | 43,0 | 4848 | 48,7 | 4605 | 47,2 | 26147 | 42,9 |
| Total | 178 | 100,0 | 298 | 100,0 | 596 | 100,0 | 1886 | 100,0 | 3806 | 100,0 | 6860 | 100,0 | 8370 | 100,0 | 9098 | 100,0 | 10115 | 100,0 | 9954 | 100,0 | 9747 | 100,0 | 60908 | 100,0 |

Fontes: Casos de hepatites virais: SINAN/SVS/MS Notas: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os seguintes marcadores sorológicos reagentes: Anti-HCV e HCV-RNA; (2) Casos notificados no SINAN até dezembro de 2009; (3) Dados preliminares para 2009. Não foram retiradas as duplicidades de notificação. Execução: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.

8.7- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2009.

PARECER

Título do Projeto original: “Avaliação de marcadores do vírus da Hepatite B obtidos em papel de filtro armazenadas em diferentes condições ambientais”

Título do Projeto: “Avaliação de marcadores do vírus da Hepatite B e C obtidos em papel de filtro armazenadas em diferentes condições ambientais”

Protocolo CEP: 459/08

Pesquisador Responsável: Lia Laura Lewis Ximenez S. Rodrigues

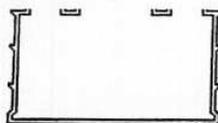
Instituição: IOC

Foram apresentados e submetidos à apreciação do CEP/FIOCRUZ o relatório parcial e emenda com alterações ao projeto original do projeto supra mencionado.

Trata-se de projeto de pesquisa iniciado em 2008 com o objetivo de caracterizar a estabilidade de amostras sanguíneas coletadas em papel de filtro para a realização de testes sorológicos para a hepatite B. O relatório parcial está em acordo com os objetivos e desenho experimental apresentados no projeto original e conta com a inclusão de 155 indivíduos até o presente.

A emenda proposta visa acrescentar a detecção sorológica para hepatite C nas mesmas amostras. Foram apresentadas alterações no título, projeto de pesquisa e TCLE.

Por se tratar da continuidade de um projeto e por não apresentar fatos novos que indiquem desacordos com a Resolução 196/96, foi aprovado o documento acima mencionado.



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ**

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida à apreciação do CEP/FIOCRUZ.

Patrícia T. Bozza
Coordenadora Interina do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz

8.8- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Federal dos Servidores do Estado.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
HOSPITAL FEDERAL DOS SERVIDORES DO ESTADO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2011.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Federal dos Servidores do Estado (CEP-HFSE).
A Ilma Sra. Farmacêutica Camille Petruccio Urago Brandão.

Assunto: Aprovação do Protocolo CEP: 000.429.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HFSE, após analisar a carta da pesquisadora principal de 09.02.11, que visa responder as pendências colocadas no Parecer Consubstanciado do CEP-HFSE, de 13.12.10 e a carta da Pesquisadora Responsável do Laboratório de Hepatite Virais do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), de 21.02.11, que é a autora e pesquisadora principal do projeto de pesquisa original, a saber: "Avaliação de marcadores do vírus da Hepatite B e C obtidos em papel de filtro armazenadas em diferentes condições ambientais", do qual este é um subprojeto, considerou assim aprovado, o protocolo de pesquisa intitulado: "Adaptação de ensaios imunoenzimáticos comerciais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da Hepatite C em amostras de sangue coletado em papel de filtro", na Versão 1.0 de 04.11.2010, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido, na Versão 2.0 de 09.02.2011, cuja pesquisadora principal é a Farmacêutica Camille Petruccio Urago Brandão, funcionária desta instituição, estando o mesmo de acordo com o que preconiza a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), devendo a pesquisadora principal:

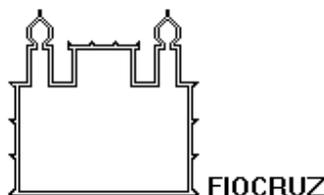
- 1- Comunicar ao CEP em casos de emendas ao protocolo de pesquisa ou ao TCLE e
- 2- Enviar relatórios da pesquisa a partir da primeira data estabelecida na folha de rosto, e segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê e pelo pesquisador, assim como as cópias dos termos de consentimento livre e esclarecidos assinados pelos sujeitos da pesquisa.

Dr. Marcos Henrique Manzoni
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos do HFSE

8.9- Termo de consentimento livre e esclarecido



Ministério da Saúde
Hospital Federal Dos Servidores
Do Estado



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hepatites Virais

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO versão 2.0 de 09.02.2011

O (a) Sr(a) está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa intitulada: **Adaptação de ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C em amostras de sangue coletado em papel de filtro.**

O objetivo deste estudo é investigar se é possível utilizar o seu sangue fixado num pedaço de papel para o diagnóstico da hepatite C. Normalmente, para se fazer o teste de diagnóstico para hepatite C o sangue é coletado em um tubo e parte do mesmo (soro) é submetida a um exame de laboratório chamado ensaio imunoenzimático. No entanto, em locais muito distantes do laboratório como pequenas cidades ou aldeias indígenas pode ser difícil coletar, separar e transportar o sangue de forma adequada para que este teste possa ser realizado. A coleta e o transporte do sangue fixado em um pedaço de papel pode resolver este problema. Este estudo pretende padronizar o teste para hepatite tipo C no sangue fixado em papel.

Os doadores voluntários de sangue são obrigatoriamente submetidos a testes para determinar a presença de infecções transmissíveis pelo sangue doado, incluindo o teste para hepatite C. Nesta pesquisa, a amostra de sangue será coletada durante os procedimentos normais realizados para doação de sangue.

Durante a doação de sangue, uma bolsa de sangue e três tubos de sangue são coletados pela equipe de rotina do Banco de Sangue. Neste momento, mais um tubo de sangue (8mL) será coletado para pesquisa sem que haja necessidade de realizar **nova punção** no indivíduo. Parte deste sangue será, então, colocado em papel de filtro com ajuda de um conta-gotas e armazenado, e outra parte será armazenado para realização do teste de rotina para hepatite C. Essas amostras serão enviadas para o Laboratório de Hepatites Virais no Instituto Oswaldo Cruz onde serão testadas.

Toda a pesquisa será realizada de forma a não revelar a sua identidade e quando os resultados forem publicados em congresso ou revista científica a sua identidade também será preservada. Somente os pesquisadores e os profissionais responsáveis pela pesquisa e os médicos do Banco de Sangue terão acesso as suas informações médicas garantindo proteção contra qualquer tipo de preconceito ou censura.

É possível que novas amostras de sangue sejam necessárias. Caso isto ocorra, o (a) Sr. (a) será contatado por um dos responsáveis pela pesquisa que irá perguntar se o (a) Sr. (a) autoriza a coleta de uma outra amostra de sangue (8 mL) para o teste de hepatite C. O (a) Sr. (a) estará livre para recusar esta solicitação.

Os possíveis riscos e desconfortos previstos nesta pesquisa são aqueles relacionados com a doação de sangue em si, tais como, dor ou vermelhidão no local, e são informados ao doador no momento da entrevista pré-doação.

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso ao profissional responsável pelo estudo ou um médico do Serviço de Hemoterapia do Hospital Federal dos Servidores do Estado através dos telefones (21) 2291-3131 R 3765 ou 9648-2367. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre questões éticas relacionadas a esta pesquisa pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Federal dos Servidores do Estado através dos telefones (21) 2291-3131 R 3544.

É importante você saber que:

- 1) Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária.
- 2) Poderá sair do estudo a qualquer momento que desejar sem prejuízos para sua saúde.
- 3) Não há custo ou remuneração prevista para que participe deste estudo.
- 4) Sua identidade será mantida em sigilo quando os resultados forem publicados.
- 5) Não lhe será oferecido nenhum benefício direto ao participar deste estudo, visto que o resultado do teste da hepatite C já é fornecido rotineiramente pelo Banco de Sangue ao doador. No entanto, esta pesquisa poderá trazer conhecimentos que beneficiem pessoas da comunidade viabilizando o diagnóstico em locais de difícil acesso onde a coleta de sangue e o transporte de sangue é inviável e permitindo o desenvolvimento de trabalhos de vigilância epidemiológica nessas regiões.
- 6) A pesquisa não está ligada a doação de sangue, ou seja, o doador de sangue tem a livre escolha para participar da pesquisa se assim desejar. A doação de sangue será feita de acordo com as normas estabelecidas pelo Banco de Sangue e a legislação vigente.
- 7) O Banco de sangue fornecerá todos os cuidados médicos adequados para o controle dos efeitos adversos que possam ocorrer em consequência da doação de sangue como dor local, vermelhidão, queda de pressão. Também, o Sr. (a) será encaminhado para unidades de saúde especializadas nos

casos em que o acompanhamento médico se fizer necessário, como por exemplo, caso seja detectada a presença do vírus da hepatite C.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo **Adaptação de ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C em amostras de sangue coletado em papel de filtro** acima citado que li ou foram lidas para mim.

Eu discuti com o pesquisador _____, sobre a minha decisão de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são seus propósitos, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e benefícios diretos. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo a minha saúde.

Data: ___/___/_____.

Nome do voluntário: _____

Assinatura do voluntário: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Assinatura do pesquisador responsável : _____