

**Catia Inês Costa**

**Estratégia metodológica para avaliação da potência *in vitro* das vacinas  
contra o vírus da hepatite B utilizada no Programa Nacional de Imunizações-  
PNI – Brasil**

**PPGVS/INCQS  
FIOCRUZ  
2009**

**Estratégia metodológica para avaliação da potência *in vitro* das vacinas  
contra o vírus da hepatite B utilizada no Programa Nacional de Imunizações-  
PNI - Brasil**

**Catia Ines Costa**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Vigilância Sanitária INCQS/FIOCRUZ como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Vigilância Sanitária.

**ORIENTAÇÃO**

Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza  
Dra. Isabella Fernandes Delgado

**Rio de Janeiro**

2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### **Estratégia metodológica para avaliação da potência *in vitro* das vacinas contra o vírus da hepatite B utilizada no Programa Nacional de Imunizações- PNI - Brasil**

**Catia Ines Costa**

Tese submetida à comissão Examinadora composta pelo corpo docente do programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

\_\_\_\_\_ (FIOCRUZ)  
Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

\_\_\_\_\_ (UFRJ)  
Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro

\_\_\_\_\_ (FIOCRUZ)  
Dra. Vera Bongertz

\_\_\_\_\_ (FIOCRUZ)  
Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

\_\_\_\_\_ (Instituto Biomédico)  
Dra. Márcia Sarpa de Campos Mello

Rio de janeiro  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Catia Inês

Estratégia metodológica para avaliação da potência *in vitro* das vacinas contra o vírus da hepatite B utilizada no Programa Nacional de Imunizações- PNI – Brasil/ Catia Inês Costa. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xvii, 112 p., il., tab.

Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador(s): Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza  
Isabella Fernandes Delgado

1. Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) 2. Vacina 3. ELISA 4. Potência 5. PNI .Título

### TÍTULO INGLÊS

Methodology for the evaluation of *in vitro* potency of vaccines against hepatitis B virus used in the National Immunization Program - NIP.

A minha mãe, Cândida pelo amor e grandeza de estar do meu lado me aconselhando e apoiando.

Ao meu pai, Roberto pela sua dedicação e carinho.

A minha filha, Luana pelo sorriso e alegria para continuar.

Ao meu querido, Eduardo pelo carinho, compreensão e amizade.

Quando deixarmos de ter esperança é melhor apagar o arco-íris.

Mário Iago

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, pela amizade, carinho e por ter acreditado, incentivado e fornecido a base necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha orientadora Dra. Isabella Fernandes Delgado pela amizade, carinho e por ter me ajudado a manter o ritmo e o foco da pesquisa.

A Dra. Vera Bongertz pela amizade e por ter compartilhado os seus conhecimentos e experiências.

A Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira pela amizade, incentivo e seus conhecimentos.

A Jaline Alves Cabral da Costa pela amizade, paciência, compreensão e pela ajuda nos meus momentos difíceis.

A Renata Faria de Carvalho pelo carinho, amizade e contribuição para a realização deste estudo.

Ao Sérgio da Silva e Mouta Júnior e ao Carlos Otávio Alves Vianna pelo carinho, ajuda e alegria.

A Aline e Monick pelo amor e carinho neste e em outros momentos importantes na minha vida.

Ao Sérgio Alves da Silva pela amizade e por ter compartilhado seus conhecimentos estatísticos.

A Maria Pia Vicente Paixão *in memoriam* pela amizade e contribuição.

A Dra. Selma Andrade Gomes pela doação de amostra do anti HBsAg policlonal.

A todos do Departamento de Imunologia do INCQS.

Muito obrigada!

## RESUMO

O vírus da hepatite B (HBV) infecta o homem e primatas não humanos. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de dois bilhões de pessoas já tiveram contato com o HBV, sendo mais de 350 milhões portadores crônicos. O estudo do HBV teve início nos anos 60 com a descoberta do antígeno Austrália, cuja correlação com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) foi estabelecida em 1968. Em 1986 foi licenciada a primeira vacina humana contra a hepatite B, utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante, para uso geral da população. A potência das vacinas contra a hepatite B pode ser avaliada através da ação *in vivo* (camundongos) ou pela determinação do conteúdo antigênico pelo método de avaliação *in vitro*. O método *in vitro* pode ser realizado através do uso de kit ELISA comercial ou desenvolvido *in house*, padronizado e validado conforme os parâmetros estatísticos descritos para a validação de metodologia para biológicos. Durante o desenvolvimento de um projeto institucional em BioManguinhos-Fiocruz, quatorze MAb anti-HBs foram caracterizados quanto a especificidade para o HBsAg e determinação do perfil isotípico sendo identificados como subclasse IgG1.

Oito MAb foram selecionados e avaliados para o estabelecimento de um ELISA *in house* para avaliação de potência das vacinas contra o HBV usadas pelo PNI. Dentre estes o MAb CG2 foi selecionado como anticorpo de captura através dos resultados de reatividade para HBsAg das vacinas dos diferentes produtores (Engerix-B, Hepavax-Gene, Butang, Euvax e Quinvaxem). O ensaio ELISA foi otimizado através de vários parâmetros. A padronização foi realizada considerando as condições básicas do ensaio (placa, tampões, saturação, tempo e agitação da incubação, o MAb CG2 como anticorpo de captura (8µg/ml), as concentrações de vacinas (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/ml), e foi preparado e titulado (1:2500) um conjugado - MAb anti-HBs AG9 – ligado à peroxidase. A resistência à estocagem do kit *in house* desenvolvido e a sua sensibilidade ao stress foi analisada. A validação do teste foi feito de acordo com as normas da ANVISA (especificidade, linearidade, precisão, limite de detecção, exatidão).

O ELISA *in house* para avaliação da potência das vacinas contra a hepatite B foi estabelecido e validado com sucesso.

## ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) infects human and non-human primates. The World Health Organization estimates that about two billion people have had contact with HBV, and approximately 350 million are chronically infected. The study of HBV became possible in the 60's, when the Australia antigen was discovered, correlated to the hepatitis B surface antigen (HBsAg) in 1968. In 1986, the first anti-HBV vaccine for human use employing DNA recombinant technology was licensed. The potency of the hepatitis B vaccine can be evaluated through *in vivo* assays or through *in vitro* determination of the antigen. The ELISA used for HBsAg determination can be a commercial kit or be developed *in house*, if properly standardized and validated according to statistical parameters.

Fourteen monoclonal antibodies against the HBsAg (anti-HBs) were produced by BioManguinhos-FIOCRUZ and were characterized as to their specificity and isotypic profile (identified as IgG1 subclass), during the development of an institutional project. Eight of these MAbs were selected and evaluated for use in an *in house* ELISA to determine the potency of HBV vaccines that are being used in the Brazilian National Program of Immunization (PNI).

The MAb named CG2 was selected as capture antibody due to its high reactivity with vaccines of different producers (Engerix-B, Hepavax-gene, Butang, Euvax e Quinvaxem). Several parameters were analysed to optimize the *in house* ELISA, including standardization of assay parameters (plates, buffers, saturation, time and agitation speed of incubations, MAb CG2 concentration (8µg/ml), vaccine concentration (0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1µg/ml), a horse radish peroxidase (HRP) conjugate prepared and titrated (MAb AG9-HRP; 1:2,500). Stability to storage (4°C and -20°C) and sensitivity to stressful conditioning (60°C) was analysed. The test was validated according to ANVISA rules (specificity, linearity, precision, detection limit, precision).

An ELISA for hepatitis B vaccines potency determination was successfully established.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa = aminoácido

AAP = *American Academy of Pediatrics*

AIDS = *Acquired Immunodeficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA = Análise de Variância simples

anti-HBs = anticorpo contra HBsAg

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCIP = 5-Bromo-4-Chloro-3'-indolyphosphate p-Toluidine salt

C = gene C do HBV

CDC = *Centers for Disease Control and Prevention*

CRIES = Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais

CV = coeficiente de variação

DNA = *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico

DO = densidade óptica

DP = desvio padrão

DTP- HepB+ Hib = vacina contra Difteria (toxóide diftérico-D), o Tétano (toxóide tetânico-T), a coqueluche (Pertussis-P) e meningite causada pela (*Haemophilus Influenzae* tipo b) e hepatite B.

DTP-HepB = vacina contra Difteria (toxóide diftérico-D), o Tétano (toxóide tetânico-T), a coqueluche (Pertussis-P) e hepatite B

ELISA = *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ensaio imunoenzimático

Farmarmacopéia Bras. Farmacopéia Brasileira

FDA = *Food and Drug Administration*

GP = glicoproteína

HBcAg, = *Hepatitis B core antigen* – antígeno c do HBV

HBeAg, = *Hepatitis B e antigen* – antígeno e do HBV

HBsAg, = *hepatitis B surface antigen*- antígeno de superfície do HBV

HBV = *hepatitis B vírus* – vírus da Hepatite B.

HepB-Hib – vacina contra hepatite B combinada com a vacina contra meningite causada pela *Haemophilus Influenzae* tipo b

HRP = *horse-radish peroxidase* – enzima peroxidase  
ICH = *International Conference on Harmonisation*  
IgG1 = imunoglobulina G subclasse 1  
INCQS = Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde  
IPV = vacina da poliomielite inativada  
KPL = Kirkegaard & Perry Laboratories  
LAL = Lisado de Amebócitos do Limulus  
LATAM = laboratório de tecnologia de anticorpos monoclonais  
LD = limite de detecção  
LQ = limite de quantificação  
MAb = *monoclonal antibody* – anticorpo monoclonal  
MSD = Merck Sharp Dome  
NBT = Nitro-Blueterazolium Chloride  
ng/mL = nanograma por mililitro  
OFR = *Open Reading Frames* - região aberta de leitura  
OMS = Organização Mundial de Saúde  
P = gene da polimerase do HBV  
p = proteína  
pb = pares de bases  
PBS/BSA = *phosphate buffered saline/bovine serum albumin* – solução salina tamponada com fosfatos/ soro albumina bovina  
PBS/T = *phosphate buffered saline/ twenn* - solução salina tamponada com fosfatos com detergente tween 20  
PNI = Programa Nacional de Imunizações  
PM = peso molecular  
pré-S/S = região pré S/S do HBV  
RNA = ribonucleic acid - ácido ribonucléico  
S = gene S do HBV  
s = proteína pequena do HBsAg  
S+Pré-S2 = proteína média do HBsAg  
S+Pré-S2+Pré-S1 = proteína grande do HBsAg  
SDS-PAGE-*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – eletroforese em gel de poliacrilamida tratado com o detergente sulfato dodecil sódico.

SKB = SmithKline Beecham

TMB = 3, 5, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine - tetrametilbenzidina

USA = *United States of America* - Estados Unidos da América

X = gene X do HBV

°C = graus Celsius

μ = micro

μg = micrograma

g – gravidade

kDa - Kilodalton

min = minuto

mL = mililitro

nm = nanômetro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microscopia eletrônica do HBV	01
<b>Figura 2.</b> Figura representativa da partícula do HBV	03
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do genoma do HBV	04
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática dos domínios das proteínas do envelope do HBV	05
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática das proteínas sintetizadas pelas regiões preS1, preS2 e S	05
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da estrutura do HBsAg	06
<b>Figura 7.</b> Distribuição Mundial HbsAg	08
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do ensaio ELISA do tipo sanduíche	15
<b>Figura 9.</b> Gel SDS-PAGE corado por coloração em prata correspondente à análise do perfil de proteínas das vacinas contra a hepatite B	31
<b>Figura 10.</b> Membrana correspondente ao resultado do <i>Western Blot</i> do HBsAg das vacinas utilizando o anticorpo anti-SmithKline	32
<b>Figura 11.</b> Reatividades dos oito MABs com o HBsAg das três vacinas	33
<b>Figura 12.</b> Resultados de reatividades dos MABs CG2, CH6 e CH7 (individual e em combinação)	34
<b>Figura 13.</b> Resultados das diferentes concentrações do MAb CG2 para captura (A - 2µg/mL), (B - 4µg/mL) e (C- 8µg/mL)	35
<b>Figura 14.</b> Resultados obtidos com uso de amostras de vacinas após a retirada do hidróxido de alumínio	37
<b>Figura 15.</b> Resultados obtidos com o tempo de incubação da placa de 90 minutos a 37°C	39
<b>Figura 16.</b> Resultados obtidos com as diferentes diluições do conjugado AG9-HRP usando 3 concentrações do MAb de captura CG2	40
<b>Figura 17.</b> Resultados obtidos com o tempo de 60 minutos de incubação a 37°C com as vacinas Engerix-B (A1), Butang (A2), Hepavax-gene (A3), Euvax (A4) e Quinvaxem (A5)	43
<b>Figura 18.</b> Resultados obtidos com o tempo de 120 minutos de incubação com as	

vacinas Engerix-B (A1), Butang (A2), Hepavax-gene (A3), Euvax (A4) e Quinvaxem (A5)	45
<b>Figura 19.</b> Comparação dos três tempos de incubação (60, 90 e 120 minutos) a 37°C com as vacinas Engerix-B (A1), Butang (A2), Hepavax-gene (A3), Euvax (A4) e Quinvaxem (A5)	47
<b>Figura 20.</b> Resultados encontrados com os MAb's CH6, CH7 e CG2, individual e combinados com as vacinas Euvax- B (A1), Engerix-B (A2) e Hepavax-gene (A3)	50
<b>Figura 21 (A1– A5).</b> Resultados de estabilidade do MAb CG2 ( 8µg/mL)	52
<b>Figura 22.</b> Resultados de sensibilidade (%) obtidos para placas estocadas 6 meses /4°C com placas não estocadas (sensibilidade = 100%)	55
<b>Figura 23 (A, B, C e D).</b> Resultados obtidos com amostras de vacinas armazenadas a 4°C e a 60°C por 7 dias.	56
<b>Figura 24 .</b> Resultados da robustez variando a concentração do BSA no tampão de saturação (PBS/BSA)	71

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Principais acontecimentos históricos relacionados à vacinação contra o HBV no Brasil	09
<b>Quadro 2.</b> Vacinas utilizadas pelo PNI - Brasil e avaliadas quanto à potência pelo INCQS	20
<b>Quadro 3.</b> Características das reatividades dos anticorpos monoclonais por ELISA	22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados de densidades óptica obtido com uso de amostras antes da retirada e após a retirada do hidróxido de alumínio	38
<b>Tabela 2.</b> Resultados de densidades óptica obtidos com uso de amostras após a retirada do hidróxido de alumínio durante um tempo de incubação de 120 e 90 minutos a 37°C.	39
<b>Tabela 3.</b> Especificidade do ELISA	58
<b>Tabela 4.</b> Resultados de linearidade da vacina Euvax	59
<b>Tabela 5.</b> Resultados de linearidade da vacina Hepavax-gene	60
<b>Tabela 6.</b> Resultados de linearidade da vacina Engerix-B	61
<b>Tabela 7.</b> Resultados de linearidade da vacina Butang	62
<b>Tabela 8.</b> Resultados de linearidade da vacina Quinvaxem	63
<b>Tabela 9.</b> Resultados de Repetibilidade (precisão intraensaio)	64
<b>Tabela 10.</b> Resultados de Precisão intermediária (precisão interensaio)	65
<b>Tabela 11.</b> Resultados do Limite de Detecção-LD do ensaio	66
<b>Tabela 12.</b> Resultados do Limite de Quantificação-LQ	66
<b>Tabela 13.</b> Resultados de Exatidão	67

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1. Hepatite B: A doença e o vírus	01
1.2. Epidemiologia	08
1.3. Programa Nacional de Imunizações-PNI no âmbito do controle da hepatite B	09
1.3.1. As vacinas contra a hepatite B	10
1.4. Controle de qualidade da vacina contra a hepatite B no Brasil	12
1.5. Sistema de leveduras para expressão de proteínas heterólogas	13
1.6. Ensaio imunoenzimático ELISA	14
1.7. Padronização e validação de ensaios analíticos	15
1.7.1. Especificidade	16
1.7.2. Limite de Detecção-LD (sensibilidade)	16
1.7.3. Limite de Quantificação-LQ	16
1.7.4. Lineariedade	17
1.7.5. Precisão	17
1.7.6. Exatidão	17
1.7.7. Robustez	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	20
4.1. Parâmetros iniciais para a padronização do ELISA para quantificação de HBsAg em vacinas contra a Hepatite B	20
4.1.1. Amostras de vacinas	20
4.1.2. SDS-PAGE- <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>	21
4.1.3. <i>Western blot</i>	21
4.1.4. MAb anti-HBs	22
4.1.4.1. Obtenção dos fluídos ascíticos contendo os MAb anti-HBs	22
4.1.4.2. Quantificação da concentração protéica total dos MAb anti-HBs	23

4.1.4.3. Purificação dos fluídos ascíticos contendo os MAbs anti-HBs	23
4.1.4.4. Conjugação do MAb AG9	24
4.1.5. Parâmetros utilizados no desenvolvimento de protocolos para a padronização do ELISA	24
4.1.5.1. Placas de 96 poços	24
4.1.5.2. Saturação da placa	25
4.1.5.3. Estabelecimento da diluição ideal do conjugado AG9	25
4.1.5.4. Dissociação do hidróxido de alumínio (adjuvante) das diferentes amostras de vacinas utilizadas	25
4.1.6. Protocolo padronizado de ELISA para quantificação de HBsAg em vacinas contra a hepatite B	26
4.1.7. Teste de estabilidade	26
4.1.8. Análise estatística	27
4.1.9. Parâmetros de validação	27
4.1.9.1. Especificidade	28
4.1.9.2. Linearidade	28
4.1.9.3. Precisão	28
4.1.9.3.1. Repetitividade interensaios	28
4.1.9.3.2. Reprodutibilidade intralaboratorial (Precisão Intermediária)	29
4.1.9.4. Limite de Detecção-LD	29
4.1.9.5. Limite de Quantificação	29
4.1.9.6. Exatidão	29
4.1.9.7. Robustez	30
<b>5. RESULTADOS</b>	31
5.1. Análise por SDS-PAGE e Western-blot do HBsAg das vacinas contra a hepatite B	31
5.2. Estabelecimento de parâmetros iniciais para padronização do ELISA para detecção de HBsAg em amostras vacinais	32
5.2.1. Placas de ELISA	32
5.2.2. Solução de saturação da placa	33
5.2.3. Seleção quanto à reatividade dos MAbs anti-HBs para o ELISA	33
5.2.4. Avaliação dos três MAbs previamente selecionados (CG2, CH6 e CH7) como captura do HBsAg das cinco vacinas	34

<b>5.2.5.</b> Avaliação das diferentes concentrações do MAb selecionado (CG2) como anticorpo de captura frente às diferentes concentrações de vacinas	35
<b>5.2.6.</b> Retirada do hidróxido de alumínio e agitação das placas de ELISA a 13,7 x g com tempo de incubação de 120 minutos a 37°C	37
<b>5.2.7.</b> Retirada do hidróxido de alumínio e agitação das placas de ELISA a 13,7 x g com tempo de incubação de 90 minutos a 37°C	38
<b>5.2.8.</b> Estabelecimento da diluição do conjugado anti-HBs AG9-HRP	40
<b>5.3.</b> Padronização do ELISA para detecção do HBsAg em amostras vacinais – resultados finais	42
<b>5.3.1.</b> Utilização de diferentes concentrações de MAb CG2 e vacinas, tempo de incubação a 37°C durante 60 minutos e agitação da placa a 63 x g durante a incubação	42
<b>5.3.2.</b> Utilização de diferentes concentrações de MAb CG2, tempo de incubação a 37°C de 120 minutos sob agitação de 63 x g	45
<b>5.3.3.</b> Utilização da concentração de MAb CG2, (8µg/mL) frente aos tempos de incubação de 60, 90 e 120 minutos a 37°C sob agitação de 63 x g	47
<b>5.3.4.</b> Utilização dos MAbs CG2, CH6 e CH7 na concentração (8µg/mL) (individual e combinados) para captura frente a duas concentrações de amostras de vacinas (0,1 e 1µg/mL)	50
<b>5.3.5.</b> Avaliação da estabilidade do MAb CG2 após revestimento e estabilização no tempo inicial (dia “zero”) e seis meses após estocagem nas temperaturas de 4°C e -20°C	52
<b>5.3.5.1.</b> Comparação da sensibilidade (%) do ensaio ELISA obtida no dia “zero” (100%) e seis meses após estocagem à temperatura de 4°C	55
<b>5.3.6.</b> Utilização das amostras de vacinas submetidas à situação de estresse (4°C e a 60°C por sete dias) avaliadas no ELISA	55
<b>5.4.</b> Validação do ELISA para detecção de HBsAg em amostras vacinais	58
<b>5.4.1.</b> Resumo dos resultados da validação	58
<b>5.4.2.</b> Especificidade	58
<b>5.4.3.</b> Linearidade	59
<b>5.4.4.</b> Precisão	64
<b>5.4.4.1.</b> Repetibilidade (precisão intraensaio)	64

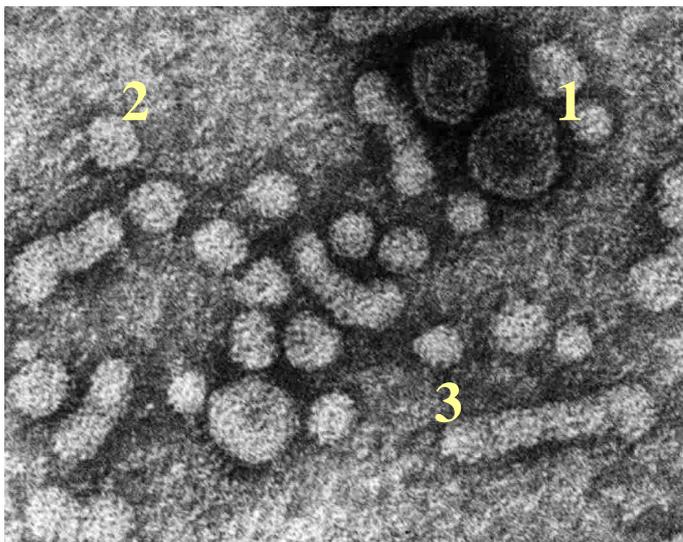
<b>5.4.4.2. Reprodutibilidade (precisão interensaio)</b>	65
<b>5.4.5. Limite de Detecção-LD</b>	66
<b>5.4.6. Limite de Quantificação-LQ</b>	66
<b>5.4.7. Avaliação da Exatidão</b>	66
<b>5.4.8. Robustez</b>	71
<b>6. DISCUSSÃO</b>	72
<b>7. CONCLUSÃO</b>	80
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	82
<b>9. ANEXOS</b>	94
<b>9.1 Anexo 1A</b>	
<b>9.2 Anexo1B</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hepatite B: a doença e o vírus

O vírus da hepatite B (HBV, do inglês *hepatitis B virus*) é membro da família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* e que infectam o homem e primatas não humanos.

O estudo do HBV teve início nos anos 60 com a descoberta do antígeno Austrália. A correlação com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg, do inglês *hepatitis B surface antigen*) só foi estabelecida em 1968 (BLUMBERG, et al., 1965, BLUMBERG, et al., 1968). Ainda em 1968, foi demonstrada a presença de partículas pleomórficas tubulares e esféricas no soro de indivíduos com HBV, correspondentes às partículas incompletas (Figura 1). Posteriormente, foi demonstrada a presença das partículas esféricas completas, denominadas, devido ao seu descobridor, de partículas de Dane, conforme Figura 1 (DANE et al., 1970).

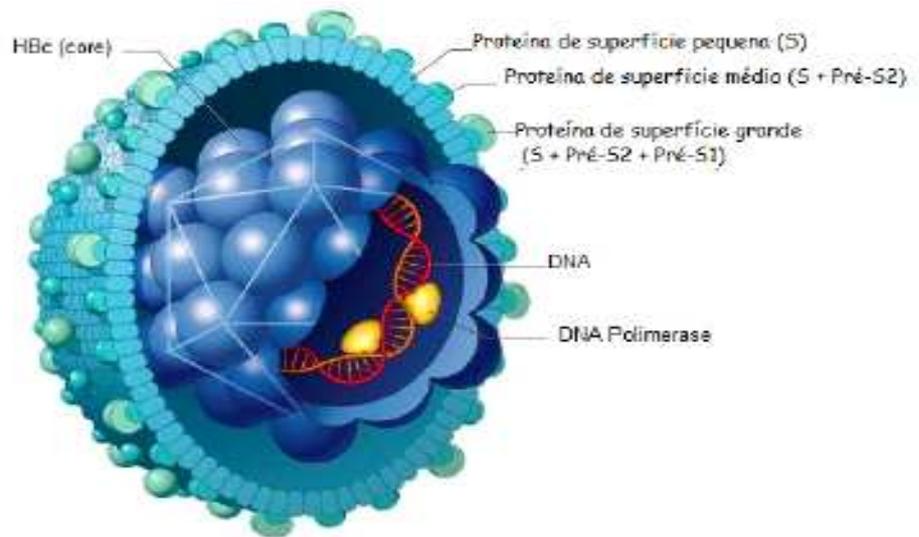


**Figura 1:** Microscopia eletrônica do HBV. Partículas esféricas completas (1), esféricas incompletas (2) ou filamentosas (3) compostas exclusivamente de HBsAg.

Fonte: [web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html](http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html)

As partículas incompletas, apresentando um tamanho de 22nm, não são infecciosas, pois não apresentam genoma viral e são encontradas no soro em grande número. As partículas de Dane apresentam um tamanho de 42nm, são infecciosas por conterem o genoma viral e são encontradas em menor número (GALLE, et al., 1994). Tais partículas possuem uma estrutura composta de um nucleocapsídeo icosaédrico coberto por um envelope externo que é representado pelas proteínas que compreendem o HBsAg, juntamente com lipídeos e carboidratos originados da membrana celular hospedeira. No nucleocapsídeo encontram-se os antígenos do core (HBcAg, do inglês *Hepatitis B core antigen*) e o antígeno e (HBeAg, do inglês *Hepatitis B e antigen*). O nucleocapsídeo envolve o genoma do tipo ácido desoxiribonucléico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) circular de fita parcialmente dupla, de aproximadamente 3.200 pares de bases – pb (dependendo do genótipo) e a enzima DNA-polimerase que também possui atividade de transcriptase reversa (DELUIS, et al, 1983; BENENSON, et al., 1995; GROB, et al., 1998), conforme Figura 2.

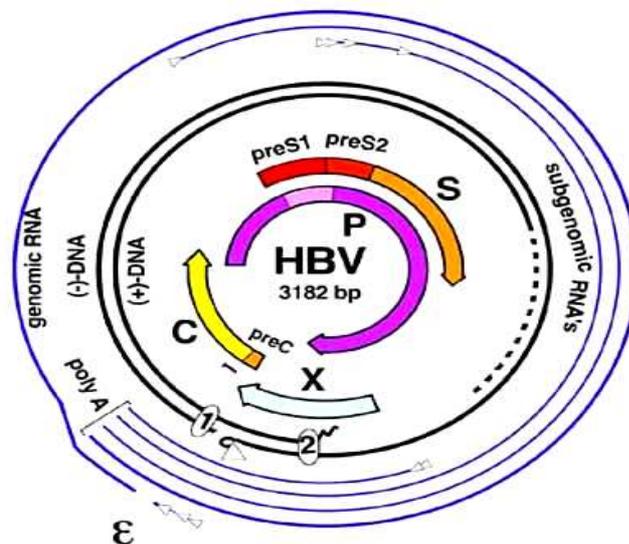
A fita maior é complementar ao RNA mensageiro denominada negativa. A fita menor é denominada positiva e apresenta a porção 3' de tamanho variável. O genoma circular é mantido por extremidades coesivas situadas à porção terminal 5' de ambas as fitas, de 224 pb (SATTLER & ROBINSON, 1979). Na fita maior estão presentes as quatro regiões abertas de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frames*). Estas regiões (S, C, P e X) se sobrepõem e codificam as proteínas estruturais e não estruturais envolvidas (MALIK & LEE, 2000). As proteínas do HBsAg são codificadas pelo gene S, e as do nucleocapsídeo formado pelos antígenos intracelulares (HBcAg e HBeAg) são codificadas pelo gene C. As proteínas não estruturais envolvidas no processo de replicação (polimerase viral) são codificadas pelo gene P e a proteína transativadora (X) responsável pela regulação de promotores virais e celulares é codificada pelo gene X. (PASEK, et al., 1978; GALIBERT, et al., 1979; VALENZUELA, et al., 1982; ONO, et al., 1983; GANEM & VARMUS, 1987; COOPER, et al., 2003). As fases de leitura S, C e X são sobrepostas ao gene da polimerase (P), o qual perfaz cerca de 75% do genoma (SHELDON, et al., 2006). A polimerase do HBV pode agir como transcriptase reversa, para síntese da cadeia negativa de DNA a partir do RNA genômico, ou como polimerase endógena (GHANY & LIANG, 2007), conforme Figura 3.



**Figura 2:** Figura representativa da partícula do HBV. Genoma DNA, Polimerase e as proteínas do HBsAg: pequena (S), Média (S+Pré-S2) e Grande (S+Pré-S2+Pré-S1).

Fonte: [www.people.rit.edu/japfaa/infections.html](http://www.people.rit.edu/japfaa/infections.html)

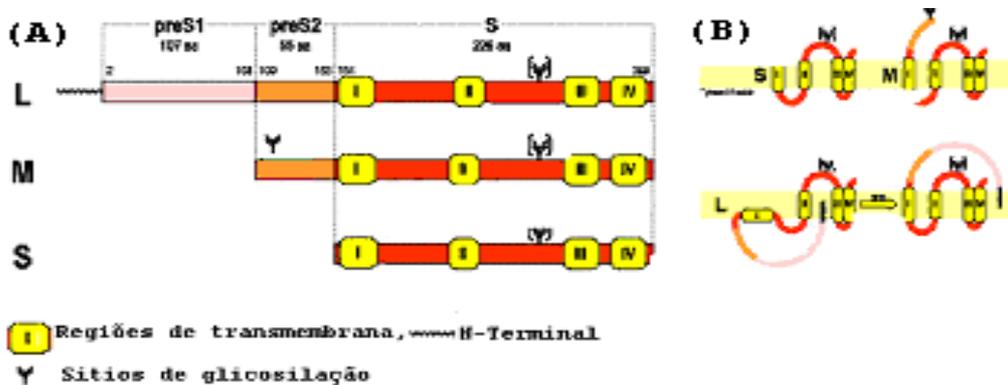
O HBV não se replica em linhagens celulares contínuas, mas somente células de primatas podem ser empregadas para replicação viral (GALLE, et al., 1994). Algumas linhagens humanas tais como, HepG2, HuH6 e HuH7 de hepatomas, são permissivas à replicação do HBV somente quando transfectadas com o genoma viral clonado (TSURIMOTO, et al., 1987, SELLS, et al., 1988). Entretanto, recentemente foi desenvolvida uma linhagem celular, HepaRG, de hepatoma humano, que é suscetível à infecção pelo HBV (GRIPON, et al., 2002). O sítio de replicação do HBV é o fígado e as células alvo são os hepatócitos.



**Figura 3.** Representação esquemática do genoma do HBV. O genoma do HBV é constituído por uma molécula circular de DNA com duas cadeias: uma completa (-) e outra parcialmente incompleta (+). Quatro regiões de leitura aberta (S,C,P e X), que apresentam zonas de sobreposição. Fonte: [www.uni-kiel.de/infmed/research/hildt](http://www.uni-kiel.de/infmed/research/hildt)

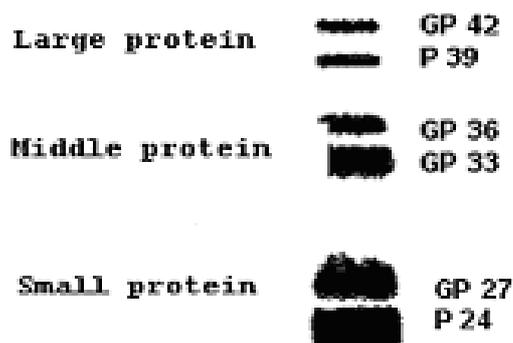
O gene pré-S/S inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S, com três codons de iniciação em uma mesma fase de leitura, conforme Figura 4A e B (YOKOSUKA & ARAI, 2006; GERIN, et al., 1971; GERIN, et al., 1980; HEERMANN, et al., 1984; MACHIDA, et al., 1984; WONG, et al., 1985; PERSING, et al., 1985).

A maior das proteínas sintetizada a partir do primeiro códon de iniciação (pré-S1) é denominada proteína grande ou *large S*, com 400 aa e apresenta peso molecular de 39 kDa (forma não glicosilada - P) ou 42 kDa (forma glicosilada - GP). As duas outras proteínas sintetizadas a partir das regiões pré-S2 e S são respectivamente denominadas de proteína média ou *middle S*, com 281 aa e peso molecular de 33 kDa (GP) ou 36 kDa (GP); e proteína pequena ou *small S*, com 226 aa e peso molecular de 24 kDa (P) ou 27 kDa (GP).



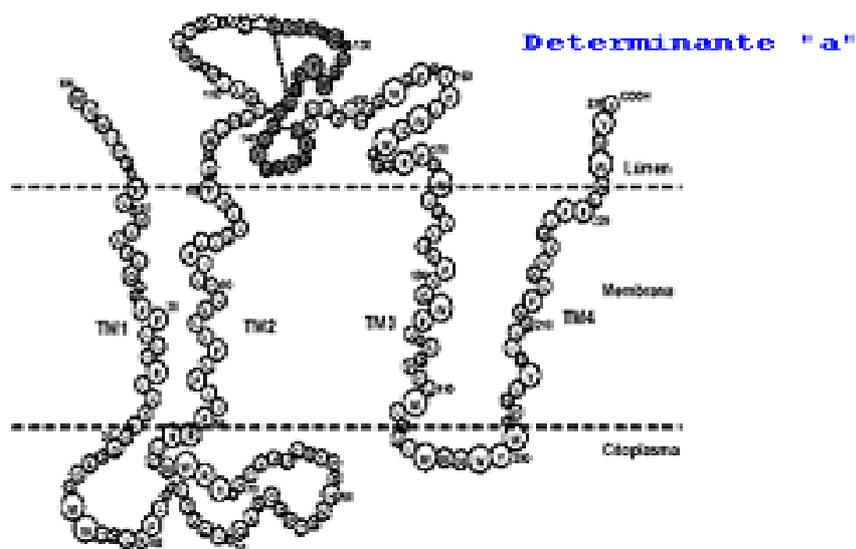
**Figura 4.** Representação esquemática dos domínios das proteínas do envelope do HBV (A); topologia da membrana das proteínas do envelope do HBV(B). Fonte: [http://www.molecular-virology.uni-hd.de/rsr/hbv/1\\_morphology-and-genomeorganization.htm](http://www.molecular-virology.uni-hd.de/rsr/hbv/1_morphology-and-genomeorganization.htm)

Cada uma das três proteínas é encontrada no soro, formando o HBsAg em três formas isoméricas, diferindo assim, somente na ausência de glicosilação ou presença de monoglicosilação ou diglicosilação (Figura 5).



**Figura 5.** Representação esquemática das proteínas sintetizadas pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. Fonte: [http://www.molecular-virology.uni-hd.de/rsr/hbv/1\\_morphology-and-genomeorganization.htm](http://www.molecular-virology.uni-hd.de/rsr/hbv/1_morphology-and-genomeorganization.htm)

A proteína S é uma glicoproteína de 226 aa e é o principal componente do HBsAg. Ela se encontra ancorada à membrana do retículo endoplasmático, provavelmente através de quatro segmentos transmembranar (TM1-TM4). O TM1 está localizado na porção amino-terminal da proteína (resíduos 4 à 24), é seguido por um *loop* citosólico (resíduos 24 à 80) englobando um epítipo para células T (CHISARI & FERRARI, 1995), o segmento TM2 (resíduos 81 a 100), e um *loop* antigênico (resíduos 101 à 164), voltado para o lúmen do retículo endoplasmático, que contém o principal epítipo para células B, o determinante *a* (resíduos 124 à 147) (GAVILANES, et al., 1982), conforme Figura 6.



**Figura 6.** Representação esquemática da estrutura do HBsAg. Os aminoácidos (aa) marcados correspondem ao determinante antigênico “a” (adaptado de JEANTET, et al, 2002).

A heterogeneidade sorológica do HBsAg foi estabelecida em 1976 ( LE BOUVIER, 1971; SOULIER & COUROUCÉ-PAUTY, 1973; COUROUCÉ, et al., 1976, COUROUCÉ-PAUTY, et al., 1978). Todos os sorotipos conhecidos contêm um determinante comum denominado de *a* e outro de cada determinante mutuamente exclusivo *d/y* e *w/r* e/ou *q* (+ ou -). Assim, dez diferentes subtipos de HBsAg são conhecidos: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*,

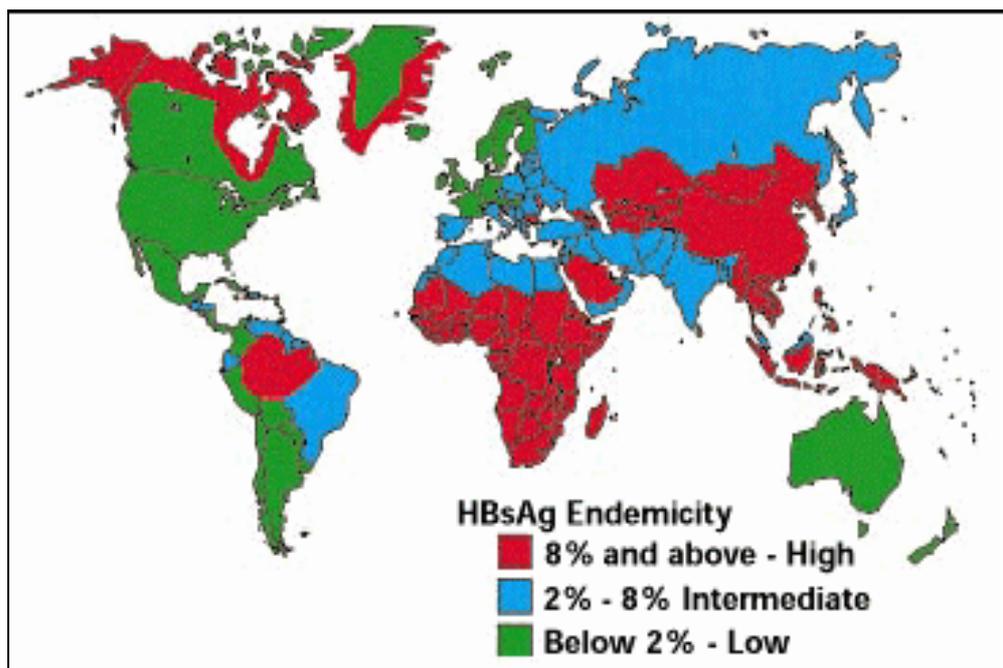
*adw4*, *adw4q*<sup>-</sup>, *adrq*<sup>-</sup> e *adrq*<sup>+</sup> (ALAN & FABIEN, 2007). No Brasil, os subtipos mais comumente encontrados são *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adw2* e *adw4* (GASPAR & YOSHIDA, 1987). Os subtipos *adw2* e *adw4* são mais predominantes na Região Norte. No Nordeste o subtipo *adw2*. No Sudeste são encontrados os subtipos *adw2* e *ayw3*. Na Região Sul, os subtipos *ayw3* e *ayw2* são predominantemente mais encontrados. No Centro-Oeste, é encontrado o subtipo *adw2* (GASPAR & YOSHIDA, 1987).

Fundamentada na divergência de seqüência nucleotídica, as diferentes cepas de HBV foram classificadas em quatro grupos genômicos designados de A-D, comparando-se a seqüência genômica completa de amostras do HBV originadas de pacientes do Japão, Indonésia, Estados Unidos, França e Nova Guiné (OKAMOTO, et al., 1988). Posteriormente, tomando como base um estudo onde o genoma completo das amostras pertencentes aos genótipos acima foram seqüenciados, foram então propostos outros dois genótipos designados de E-F (NORDER, et al., 1992, 1994). Sendo assim, seis grupos, de A-F foram então estabelecidos (OKAMOTO, et al., 1988; NORDER, et al., 1992). Posteriormente, dois novos genótipos foram identificados, ampliando a classificação genômica para oito genótipos, de A-H (STUYVER, et al., 2000; ARAUZ-RUIZ, et al., 2002). Devido a uma grande diversidade intra-genotípica, alguns genótipos foram divididos em subgenótipos. Os genótipos A em subgenótipos A1, A2 e A3 (BOWYER et al., 1997; KRAMVIS et al., 2002, KURBANOV et al., 2005) os genótipos B em B1, B2, B3, e B4 (SUGAUCHI et al., 2004), os genótipos C em C1, C2 e C3 (HUY, et al., 2004), os genótipos D em D1, D2, D3 e D4 (NORDER et al., 2004) e os genótipos F em F1a, F1b, F2, F3 e F4 (DEVESA et al., 2004). No Brasil, estudos têm demonstrado a ocorrência variada dos genótipos em diferentes regiões (SITNIK, et al., 2004). Dentre os já encontrados, temos o B, C, D e F, e recentemente um caso isolado do E em um viajante paulistano que percorria países da América Latina, África e Europa (SITNIK, et al., 2007). Estudo feito com amostras de soro HBsAg positivos de doadores de sangue de cinco regiões do Brasil mostrou maior predominância do genótipo A no país. Os genótipos A, D e F são os mais prevalentes encontrados nas cinco regiões brasileiras (MORAES, et al., 1996, TELES, et al., 1999; DE CASTRO, et al., 2001; ARAÚJO, et al., 2004, MELLO, et al., 2007).

## 1.2. Epidemiologia

A hepatite B é um dos grandes problemas de saúde nas sociedades. A Organização Mundial de Saúde - OMS estima que cerca de dois bilhões de pessoas já tiveram contato com o HBV, tornando-se, em mais de 350 milhões de portadores crônicos (OMS, 2009).

A prevalência do HBV (Figura 7) varia bastante entre as áreas geográficas mundiais e as diversas populações. Podemos distinguir essas áreas de acordo com três principais padrões de endemicidade: alto (prevalência de HBsAg, acima de 8%), intermediário (prevalência entre 2 e 8%) e baixo (menos que 2% da população possui HBsAg) (GROSHEIDE & VAN DAMME, 1996, BANKER, 2003; LAVANCHY, 2004).



**Figura 7.** Distribuição Mundial HBsAg - Fonte: OMS

No Brasil ocorrem áreas de alta prevalência na Bacia Amazônica e focos em regiões como oeste do estado de Santa Catarina e certas zonas rurais no estado do Espírito Santo e Minas Gerais. As zonas de prevalência intermediária situam-se em cidades do nordeste, centro-oeste e sudeste e regiões de baixa prevalência são encontradas no sul do Brasil. A região sul que

sempre teve os menores índices, apresentou sub-regiões com prevalência intermediária a elevada do HBsAg, tais como, as regiões de Francisco Beltrão-PR, Cascavel-PR e Chapecó-SC, (SOUTO, et al., 1999; BRASIL, 2002).

### 1.3. Programa Nacional de Imunizações – PNI no âmbito do controle da hepatite B

O Programa Nacional de Imunizações-PNI tem se mostrado um programa ativo e bem sucedido, que tem melhorado a qualidade de vida da população pelo uso da mais efetiva estratégia de prevenção e controle de doenças infecciosas, que é a vacinação (BRASIL, 2003). O Quadro 1 mostra alguns dos principais acontecimentos históricos relacionados à vacinação contra o HBV no Brasil.

**Quadro 1** - Principais acontecimentos históricos relacionados à vacinação contra o HBV no Brasil. Fonte: Brasil, 2003.

DATA	ACONTECIMENTO
1991	A OMS recomenda a inclusão da vacina contra a hepatite B (produzida a partir de partículas não infecciosas purificadas do plasma de indivíduos com infecção aguda pelo HBV contendo o HBsAg) nos programas nacionais e a vacina entra no calendário básico do Amazonas para menores de um ano de idade.
1992	A vacina contra a hepatite B produzida por engenharia genética (Engerix-B) passa a ser adquirida no Brasil e faz parte do calendário básico da Amazônia Legal, Paraná, Espírito Santo, Santa Catarina e Distrito Federal para menores de 5 anos.
1994	A vacina contra a hepatite B tem sua oferta ampliada aos profissionais de saúde do setor privado, bombeiros, policiais, militares, estudantes de medicina, odontologia, enfermagem e bioquímica.
1995	A vacina contra a hepatite B é implantada no Distrito Federal para menores de um ano de idade.
1996	O Instituto Butantan desenvolve um projeto e inicia a produção industrial da vacina contra a hepatite B por engenharia genética; Redefinição das recomendações para a vacinação contra a hepatite B; Ampliação da oferta da vacina contra a hepatite B para toda a população brasileira menor de 1 (um) ano de idade, com exceção dos estados da Amazônia Legal, Espírito Santo, Santa Catarina, Paraná e Distrito federal, onde a oferta passa a ser aos menores de 15 anos de idade. A efetivação dessas novas recomendações apenas acontece em 1998.
1997	O país tem a vacina nacional contra a hepatite B e inicia a implementação, conforme as recomendações definidas em 1996; campanhas de vacinação contra a hepatite para odontólogos, estudantes de odontologia e escolares. A iniciativa para a vacinação Infantil define um plano estratégico para o controle global efetivo da hepatite B mediante a implementação das vacinas em todas as regiões até 2005.
2000	A vacina contra a hepatite B tem sua oferta ampliada para menores de 20 anos, gradativamente até 2003 em todo o País (30% em 2001, 30% em 2002 e 40% em 2003).

A vacinação contra o HBV é a maneira mais eficaz na prevenção da infecção aguda ou crônica (ZY, 1985; ANDRÉ, 1989; CDC, 1991). É indicada de forma universal para todas as

crianças, adolescentes até 19 anos e para adultos pertencentes aos grupos de risco: politransfundidos, pacientes submetidos à diálise, profissionais de saúde, contactantes domiciliares com o portador crônico, parceiro sexual do portador crônico, usuários de drogas injetáveis, pessoas de vida sexual promíscua e imigrante de áreas endêmicas (CDC, 2000 e 2002a, AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000).

A prevenção da transmissão vertical é de maior importância porque as infecções adquiridas em idade infantil resultam em 90% dos casos em hepatite B crônica (TABOR, et al., 1985). A vacina deve ser aplicada universalmente e rotineiramente, logo após o nascimento, nas primeiras 12 horas de vida (BRASIL, 2004).

### **1.3.1. As vacinas contra a hepatite B**

A primeira vacina contra a hepatite B foi produzida a partir de partículas não infecciosas purificadas do plasma de indivíduos com infecção aguda pelo HBV contendo o HBsAg, através de um processo onde todas as partículas infecciosas residuais eram inativadas. Esse tipo de vacina, licenciada em 1981, amplamente usada na prevenção da infecção pelo HBV, apresentava várias desvantagens para os produtores, entre elas, o plasma adequado para a produção tinha um fornecimento restrito nas áreas de baixa endemicidade onde estão localizados os principais fabricantes das vacinas; e os procedimentos utilizados na manufatura das vacinas (purificação, inativação e testes prolongados) encareciam o produto.

Em meados da década de 80 surgiram as primeiras vacinas contra a hepatite B utilizando-se DNA recombinante produzido em leveduras (Quadro 2) (VALENZUELA, 1982). Os primeiros ensaios clínicos foram realizados em 1984 e em 1986 foi licenciada a primeira vacina humana contra a hepatite B, utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante, para uso geral da população (GROTTO, 1998). Essa vacina foi denominada Recombivax-HB<sup>®</sup> produzida pela Merck Sharp and Dohme (MSD). Em 1989 uma nova vacina utilizando a mesma tecnologia, denominada de Engerix-B<sup>®</sup> da Smith Kline Beecham (SKB), também foi licenciada. Uma terceira vacina, de mesma tecnologia, produzida pelo Instituto Pasteur, denominada Gen Hevac B<sup>®</sup> foi posteriormente licenciada na França (GROTTO, 1998).

Na formulação da vacina recombinante contra a hepatite B, o HBsAg encontra-se adsorvido ao adjuvante, hidróxido de alumínio, cujo papel principal é potencializar a resposta imunológica, podendo conter ou não timerosal como preservante (CDC, 2000).

As vacinas que contêm adjuvante são sensíveis ao congelamento. O congelamento reduz a potência dessas vacinas pela quebra da ligação entre os antígenos e o adjuvante (DIMINSKY, 1999). Atualmente existem vacinas contra a hepatite B monovalentes e combinadas com outros antígenos. As combinadas são DTP-HepB, DTP- HepB+ Hib, HepB-Hib, contra a Hepatite B com a vacina da poliomielite inativada (IPV) para a hepatite A e B (OMS, 2001). Estas vacinas combinadas não são usadas geralmente em programas de imunização de rotina, somente em programas especiais nos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais - CRIES (BRASIL, 2001; OMS, 2001).

O esquema básico de vacinação é constituído de três doses, com intervalos de 30 dias da primeira para a segunda dose e 180 dias da primeira para a terceira dose (0, 1 e 6 meses). Se a vacinação for interrompida, não é necessário recomeçar o esquema, apenas completá-lo.

Em relação à posologia, há uma dependência individual, considerando-se idade, condições de saúde, imunodeficiência e a vacina. Em geral, a dose recomendada para crianças é a metade daquela recomendada para adultos.

As vacinas têm eficácia de 80% a 100% em prevenir a infecção pelo HBV ou a doença clínica naqueles que recebem o esquema completo de vacinação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000, CDC 2002, WONG, et al.,1994). Entretanto, com a idade, ocorre queda da imunogenicidade e aos 60 anos, aproximadamente, apenas cerca de 75% dos vacinados desenvolvem anticorpos protetores. Os títulos de anti-HBs considerados protetores são superiores a 10 mUI/mL (CDC, 2002a).

#### **1.4. Controle de qualidade da vacina contra a Hepatite B no Brasil.**

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, criado em 1983, é o órgão responsável pelo controle da qualidade das vacinas usadas no PNI.

A metodologia empregada no controle da qualidade da vacina contra a hepatite B segue recomendações técnicas da OMS e monografias farmacopéicas (OMS, 1989; Farmacopéia Bras., 2004).

Os testes normalmente requeridos para o controle da qualidade em amostras de lotes finais de vacinas podem ser classificados em ensaios físicos, químicos e biológicos tais como: aparência, esterilidade bacteriana e fúngica, avaliação da potência através de ensaios *in vivo* ou *in vitro* (isto é, usando o ensaio imunoenzimático *Enzyme-linked immunosorbent assay*-ELISA), conteúdo de endotoxina bacteriana através de LAL ou teste de pirogênio, avaliação do conteúdo do tiomersal e o do hidróxido de alumínio usado como adjuvante.

Historicamente, o ensaio de potência da vacina tem sido realizado baseado na imunogenicidade da vacina usando um ensaio *in vivo*. O ensaio consiste na inoculação de diluições seriadas da vacina em análise e da vacina referência, em 180 animais camundongos Balb/c (fêmeas) de 3-4 semanas de idade, sangria individual após 28 dias de inoculação e a realização de ELISA, para avaliação da soroconversão através do número de animais respondedores ao antígeno HBsAg, com a produção do anticorpo anti-HBs (OMS, 1989).

O ensaio de potência *in vivo* foi implementado como ensaio de rotina no INCQS em 1996, mas foi, gradativamente, substituído pelo ensaio *in vitro* (OMS, 1989 e 1999; Farmacopéia Bras. 2004). Os ensaios imunoenzimáticos são igualmente apropriados para testes de potências comparativas ou relativas de amostras de lotes de vacina (TIJSSEN, 1993; MARTINEZ, et al., 1999; NEREY, et al., 1999).

A potência relativa também pode ser determinada através da determinação do conteúdo antigênico pelo método de avaliação *in vitro*. O método *in vitro* pode ser realizado através do uso de *kit* ELISA comercial ou desenvolvido *in house* padronizado e validado conforme os parâmetros estatísticos descritos para a validação de metodologia para biológicos (DESCAMPS, et al., 1999; OMS, 1999; MARLIES, 2001).

Desde a implementação das metodologias *in vivo* para avaliação imunogênica das vacinas, usando animais Balb c/ haplotipo H2d, fêmeas e *in vitro*, pela avaliação antigênica através da quantificação do antígeno HBsAg, que as análises da potência das vacinas tem sido feitas através de conjuntos de reagentes comerciais – *kits* comerciais para detecção do anticorpo anti-HBs ou do antígeno HBsAg, de amostras clínicas, adaptados para avaliação dos soros dos animais pós vacinados ou pela quantificação do antígeno HBsAg nas amostras de lotes finais

recebidas para análises no INCQS. Entretanto, ocorrendo um processo de descontinuidade de produção desses kits, necessitamos novamente o estabelecimento de escolha, padronização e validação de outros kits. Essas novas padronizações e validações envolvem o desenvolvimento de vários protocolos para definição de novas curvas de concentração, para cada uma das vacinas produzidas pelos diferentes produtores, gerando assim grande perda de tempo, aumento de custo e atraso na liberação dos resultados dos lotes a serem analisados e liberados para o PNI. A solução mais adequada para essa situação seria o desenvolvimento de ELISA *in house*, com especificidade, rapidez e segurança, usando anticorpos anti-HBs monoclonais (MAbs do inglês *monoclonal antibody*) ou policlonais.

### **1.5. Sistema de leveduras para expressão de proteínas heterólogas**

A utilização de leveduras para expressão de proteínas heterólogas proporciona vantagens com relação aos sistemas de expressão em procariotos, principalmente pela fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitindo a expansão para a produção de proteínas em escalas industriais. Inicialmente, a produção de proteínas heterólogas em leveduras foi estabelecida com a utilização de *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, algumas limitações são encontradas com o uso dessa cepa de levedura (GELLISSEN, et al., 2005). Mais recentemente, leveduras metilotróficas capazes de crescerem utilizando metanol como única fonte de carbono são utilizadas como poderosos sistemas de expressão. Como exemplo temos *Hansenula polymorpha* e a *Pichia pastoris*. A cepa *Pichia pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como a glicosilação e adição de pontes dissulfídicas, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação (CEREGHINO & CREGG, 1999). Modificações pós-traducionais de proteínas realizadas em *Pichia pastoris* representam a grande vantagem deste sistema de expressão: o processamento do peptídeo sinal, a formação de pontes dissulfídicas, a adição de certos lipídios, a realização de tanto N-quanto a O- glicosilação (DALY & HEARN, 2005). No entanto, a capacidade de glicosilar é limitada, sendo que apenas resíduos de manose são adicionados na O-glicosilação e no núcleo da N-glicosilação. Tal padrão difere do observado na glicosilação de proteínas humanas nativas, por exemplo, onde uma variedade de açúcares, incluindo galactose, n-acetilgalactosamina e ácido siálico, é adicionada. Entretanto, em relação a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Pichia pastoris* não possui tendência de hiper-glicosilação e realiza a adição de manoses terminais por ligações 1,2 e

não 1,3, como a *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é considerada alergênica (CEREGHINO & CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000). Por isso a cepa *Pichia pastoris* para expressão de proteínas heterólogas é o melhor recurso devido à segurança na produção em larga escala e com estruturas semelhantes às proteínas nativas. As proteínas originadas desta cepa possibilitam o uso no diagnóstico e na produção de vacinas.

## 1.6. Ensaio imunoenzimático ELISA

O método imunoenzimático (ELISA) é muito apropriado para prova de rotina; é sensível específico, de elevada precisão e exatidão, desenhado para facilitar o estudo de um grande número de amostras simultaneamente.

O princípio básico da reação de um ensaio ELISA está na propriedade que as proteínas (os anticorpos ou antígenos) possuem de serem facilmente adsorvidos a superfícies sólidas, dentre elas, as plásticas. A partir do momento que um dos compostos (anticorpo ou antígeno) encontra-se imobilizado, a separação entre os compostos que se ligaram e os que estão livres pode ser feita por sucessivos processos de lavagens da placa (Figura 8). O resultado de um ELISA é uma reação cromogênica que pode ser avaliada pela simples observação ou por espectrofotômetros específicos (TIJSSEN, et al.,1993; MARTINEZ et al.,1999).



**Figura 8.** Representação esquemática do ensaio ELISA tipo sanduíche.

## **1.7. Padronização e validação de ensaios analíticos**

A padronização do ensaio analítico seguido da validação do método e a homogeneidade dos reagentes químicos e biológicos são elementos imprescindíveis para o alcance de bons resultados. Para padronizar um ensaio é necessário determinar as condições de trabalho ótimas dos reagentes químicos e biológicos, a temperatura e o tempo de incubação em cada etapa, a diluição das amostras e a preparação dos padrões e controles, entre outros aspectos. Com uma padronização adequada se consegue chegar a ótimos parâmetros no ensaio. Os distintos parâmetros analisados durante o processo de validação não só nos permite qualificar a técnica padronizada como também concluir a necessidade de modificações através da re-padronização do método. A validação é o processo estabelecido para obtenção de provas convenientemente documentadas e demonstrativas de que o método é suficiente para produzir resultados previstos dentro dos valores definidos.

Diferentes métodos de análise requerem diferentes esquemas de validação. No presente trabalho foi utilizado esquema que se refere a métodos analíticos para quantificação do componente ativo em produto acabado seguindo os seguintes parâmetros: Especificidade, Limite de Detecção-LD (sensibilidade), Limite de Quantificação-LQ, Linearidade, Precisão, Exatidão e Robustez, conforme preconizado em compêndios oficiais (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001; ANVISA, 2003).

### **1.7.1. Especificidade**

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um determinado composto em presença de outros componentes.

### **1.7.2. Limite de detecção-LD (sensibilidade)**

O limite de detecção-LD do método é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior do que zero. Para a validação normalmente é suficiente fornecer uma indicação de nível

superior ao da detecção seja negativa, calculada pela média do controle negativo “*branco*” adicionado de triplicata do desvio padrão. A matriz da amostra usada para determinar o LD deve ser identificada.

### **1.7.3. Limite de Quantificação-LQ**

O limite de quantificação-LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do “*branco*” adicionado de 5, 6 ou 10 desvios-padrão a depender da variabilidade do desvio padrão do teste.

### **1.7.4. Lineariedade**

A lineariedade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a lineariedade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes.

### **1.7.5. Precisão**

A precisão é o grau de concordância entre resultados de medições independentes, em torno de um valor central, realizada várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições experimentais pré-estabelecidas. Recomenda-se a avaliação da precisão em dois níveis: repetitividade do método e reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária), variando o analista e um mínimo de dois dias diferentes.

### **1.7.6. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

### **1.7.7. Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos.

## 2. JUSTIFICATIVA

O ELISA em questão estabelece uma diretriz metodológica estratégica que visa substituir os kits comerciais de detecção de HBsAg para avaliação de potências das vacinas contra a hepatite B usadas na população brasileira.

O laboratório de tecnologia de anticorpos monoclonais (LATAM) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (BioManguinhos) possui um banco de anticorpos monoclonais-MAbs que abrange várias doenças como AIDS, hepatite A, hepatite B, hepatite C, dengue, sarampo e outros.

Durante o desenvolvimento de um projeto institucional, coordenado pela Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, quatorze MAbs anti-HBs foram caracterizados, quanto a especificidade para o HBsAg e perfil isotípico (subclasse IgG1) (VIANA, et al., 2006). Alguns desses MAbs foram selecionados e avaliados para o estabelecimento do ELISA *in house* em questão.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Desenvolver e validar metodologia, tendo como alvo o método ELISA, utilizando MAbS anti HBs para detecção de HBsAg, visando à avaliação da potência de vacinas contra a hepatite B utilizadas pelo PNI.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

1. Selecionar dentre um painel de 14 MAbS anti-HBs existentes no LATAM aqueles que melhor reagem com as cinco vacinas contra a hepatite B utilizadas no PNI;
2. Padronizar o ELISA através dos seguintes parâmetros: concentração de recobrimento, concentrações das vacinas, tipo e condições de bloqueio e diluições do conjugado, tempo e a temperatura, amostras de vacinas com ou sem dissociação do adjuvante hidróxido de alumínio e agitação da placa de ELISA.
3. Validar um ELISA para quantificação de HBsAg com aplicação na avaliação de potência das vacinas contra a hepatite B utilizadas no PNI.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Parâmetros iniciais para a padronização do ELISA para quantificação de HBsAg em vacinas contra a Hepatite B

A padronização inicial do ELISA foi realizada conforme a descrição dos itens a seguir.

#### 4.1.1. Amostras de vacinas

Amostras de lotes de vacinas contra a hepatite B contendo a proteína *small S* do HBsAg de cinco diferentes produtores comerciais e amostras de vacinas combinadas (Quinvaxem), enviados para o INCQS para controle de qualidade, armazenadas a 4°C foram utilizadas neste estudo, conforme Quadro 2.

**Quadro 2** - Vacinas\* \*\*utilizadas pelo PNI\*\*\* – Brasil e avaliadas quanto a potência pelo INCQS

Vacina	Produtor	Levedura utilizada para expressão
Butang (subtipo <i>adw<sub>2</sub></i> )	Instituto Butantan, São Paulo, Brasil	<i>Hansenula polymorpha</i>
Engerix B (subtipo <i>adw<sub>2</sub></i> )	Glaxo Smithkline, Rixensart, Bélgica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Euvax B (subtipo <i>adr</i> )	LG Chemical, Seoul, Coréia	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hepavax-gene ( subtipo <i>adr</i> )	Green Cross Corporation-Coréia	<i>Hansenula polymorpha</i>
Heberbiovac-HB ( subtipo <i>adw<sub>2</sub></i> )	HB-Heberbiotec-Cuba	<i>Pichia pastoris</i>
Quinvaxem (DTP- HepB- Hib) (HBsAg/ subtipo <i>adr</i> )	Berna Biotech Corporation. Coréia	<i>Hansenula polymorpha</i>

\* - Todas as vacinas monovalentes contêm somente a região *Small S* do HBsAg (ZURINA, et al., 2007; NGUYEN, et al., 2002; JORI, et al., 2006; REBEDEA, et al., 2006).

\*\* - A vacina Quinvaxem é uma vacina combinada com os componentes da hepatite B (HBsAg) e os componentes da vacina contra Difteria (toxóide diftérico-D), o Tétano (toxóide tetânico-T), a coqueluche (Pertussis-P) e meningite causada pela (*Haemophilus Influenzae* tipo b). O componente HBsAg é do mesmo produtor da vacina Hepavax-gene (Green Cross Corporation-Coréia).

\*\*\* - O PNI segue procedimentos de aquisição que viabilizam a utilização de uma ou mais vacinas.

#### **4.1.2. SDS-PAGE-*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis***

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições redutoras foi realizada com volumes de 1,0 mL/20µg de amostras de vacinas submetidas à centrifugação (3,702 x *g*) por 15 minutos. Foram realizados os descartes dos sobrenadantes e os precipitados resuspendidos com 200 µL de tampão Tris 1M pH 6,8 e a seguir guardados a 4°C até o momento do uso (solução estoque). Foram retirados 20 µL da solução estoque (2µg), e adicionados a mesma 20 µL de tampão Tris 1M pH 6,8 e 20 µL do tampão de amostra (Tris 1M, pH 6,8, SDS 20%, glicerol, azul de bromofenol e água destilada). As amostras foram incubadas em banho-maria à 95°C por 5 minutos e transferidas imediatamente para banho de gelo até o momento de uso. Foram aplicados 10 µL de cada amostra (0,5µg), de vacina nas cavidades do gel e 10 µL do tampão de amostra nos poços vazios. Os géis foram submetidos a uma corrente constante de 200 volts por aproximadamente 30 minutos. Após o procedimento, os géis foram lavados com água destilada e corados com prata conforme descrito por MICHAEL, 2007.

#### **4.1.3. *Western blot***

Amostras de vacinas conforme descrito no item 4.1.1 foram submetidas a SDS-PAGE, conforme item 4.1.2. As proteínas foram transferidas por 40min a 16 V para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) usando um sistema *semi-dry* (BioRad) e a seguir foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS-T contendo 5% de leite desnatado) por 18hs a 4°C. Lavagens utilizando PBS-T foram realizadas e a seguir como anticorpo primário foi utilizado o soro de coelho anti-HBs policlonal diluído 1/100 em tampão de bloqueio por 2 horas, produzido pelo laboratório de Virologia Molecular a partir da imunização de coelhos com a vacina *SmithKline* e gentilmente cedido pela Dra. Selma de Andrade Gomes. Amostras de HBsAg obtidas de pacientes crônicos, subtipo *ayw3*, previamente purificadas conforme descrito por MOUTA, et al. (2003), foram utilizadas como controle positivo. Após lavagem do anticorpo primário, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina-FA (Sigma), diluído 1/1000 em tampão de bloqueio por 1 hora. Após os procedimentos de lavagens, as membranas foram incubadas com solução de substrato para a enzima FA contendo Nitro-Blueterazolium Chloride (NBT) e 5-Bromo-4-Chloro-3'-indolyphosphate p-Toluidine salt (BCIP). Após desenvolvimento de cor, as reações foram interrompidas com água destilada.

#### 4.1.4. MABs anti-HBs

Durante o desenvolvimento de um projeto institucional em BioManguinhos-Fiocruz, quatorze MABs anti-HBs foram caracterizados quanto à especificidade para o HBsAg e determinação do perfil isotípico, sendo identificados como subclasse IgG1. Destes, oito MABs anti HBs foram selecionados para o estudo.

##### 4.1.4.1. Obtenção dos fluídos ascíticos contendo os MABs anti-HBs

Os fluídos ascíticos contendo os MABs anti-HBs designados CH7, AG9, CG2, AE3, BD12, IC2, IA4 e CH6, obtidos através da imunização de camundongos a partir do *pool* de plasma humano contendo os subtipos do HBsAg *ayw3* e *adw2*, previamente caracterizados (VIANNA et al., 2006), foram produzidos pelo LATAM (Quadro 3).

**Quadro 3.** Características das reatividades dos anticorpos monoclonais por ELISA .

Anticorpos monoclonais-MABs (subclasse IgG <sub>1</sub> )*	Reatividade dos MABs com o painel de diferentes subtipos do HBV
<b>CH7</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, adw<sub>4</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub>, ayw<sub>4</sub> e adr</i>
<b>AG9</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, adw<sub>4</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub>, ayw<sub>4</sub> e adr</i>
<b>CG2</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, adw<sub>4</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub>, ayw<sub>4</sub> e adr</i>
<b>AE3</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub>, Ayw<sub>4</sub> e adr (+/-)</i>
<b>BD12</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, adw<sub>4</sub>, ayw<sub>2</sub> e adr</i>
<b>IC2</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub> ayw<sub>4</sub> e adr (+/-)</i>
<b>IA4</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub> ayw<sub>4</sub>(+/-) e adr</i>
<b>CH6</b>	<i>Adw<sub>2</sub>, adw<sub>4</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub>, ayw<sub>4</sub> e adr</i>

##### 4.1.4.2. Quantificação da concentração protéica total dos MABs anti-HBs

Cada fluído ascítico correspondendo a cada um dos oito MABs utilizados na padronização do ELISA, identificados no Quadro 2, foram quantificados antes e após a

purificação para determinação da concentração protéica total utilizando o método de Lowry com albumina bovina, como padrão de referência quantitativa (PETERSON, 1983), através do *kit* comercial Bicinnchoninic Acid Protein Assay (SIGMA), segundo recomendação do fabricante.

#### **4.1.4.3. Purificação dos fluídos ascíticos contendo os MAbs anti-HBs**

O *kit* Affi-Gel Protein A MAPS II (BioRad, USA) foi utilizado para purificação de volumes determinados de cada fluído ascítico, de acordo com recomendações do fabricante e com pequenas modificações (MOUTA et al., 2003). Para cada fluído ascítico correspondendo a cada MAb anti-HBs, os seguintes procedimentos foram seguidos: os fluídos foram diluídos 1:2 em tampão de ligação MAPS II (BioRad, USA) e filtrado em mini filtro de 0,45 micra Millex-HA (Millipore, USA). Um volume apropriado de acordo com a concentração protéica total de cada fluído ascítico, de resina de cromatografia de afinidade contendo proteína A foi empacotado em uma mini coluna, que foi então lavada e equilibrada, com o tampão de ligação MAPS II. Os fluídos ascíticos foram aplicados na coluna e um fluxo sob pressão, utilizando bomba peristáltica (BioRad, USA) correspondendo a 1,5mL/min. A coluna foi lavada com tampão ligação MAPS II e a seguir 15 frações de 1,0mL foram coletadas. A densidade óptica (DO) de cada fração foi avaliada em espectrofotômetro a 280nm. A pureza das frações foi avaliada em gel SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) aplicando cerca de 5uL de cada fração com DO acima de 1,5 e os géis foram corados utilizando o corante *coomassie blue* preparado conforme instruções do fabricante (BioRad, USA). Cada volume de anticorpo purificado foi diluído 1:2 em glicerol e estocado a -20°C.

#### **4.1.4.4. Conjugação do MAb AG9**

A conjugação do MAb AG9 com a enzima peroxidase foi realizada usando o *kit* comercial SureLink HRP conjugation (KPL, USA), segundo recomendações do fabricante.

#### **4.1.5. Parâmetros utilizados no desenvolvimento de protocolos para a padronização do ELISA**

Para a realização da padronização do ELISA direto para a quantificação do HBsAg, foram utilizados protocolos desenvolvidos com diferentes parâmetros de avaliação: concentração de recobrimento, concentrações das vacinas, tipo e condições de bloqueio e diluições do conjugado, tempo e temperatura, amostras de vacinas com ou sem dissociação do adjuvante hidróxido de alumínio, incubação com ou sem agitação da placa. A finalidade da padronização foi selecionar em cada fase de otimização do ELISA a maior resposta dos valores principais isolados ou combinados, os quais são correspondentes à resposta particular para o ponto ótimo ou máximo das variáveis (leitura a 450 nm). Os resultados foram obtidos através das médias das triplicatas. As apresentações dos resultados obtidos nos ensaios com o uso desses protocolos foram feitas através de gráficos, semelhantemente entre si, para as vacinas analisadas (Anexo 1 A e B).

##### **4.1.5.1. Placas de 96 poços**

Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços de diferentes fabricantes (Nunc-Maxisorp®, Dinamarca e Microlon® 600, Greiner Bio-one, Atlanta, EUA). Para a avaliação das placas foram realizados revestimentos com diversas concentrações de MAbs e de amostras de vacinas conforme Anexo 1A.

Um volume de 100µL/poço foi usado para todos os reagentes a não ser quando indicado especificamente.

##### **4.1.5.2. Saturação da placa**

Após o revestimento das placas, seguiu-se ao bloqueio dos sítios ativos da placa não ocupados pelo MAb de recobrimento (saturação da placa).

Foram utilizadas diferentes soluções para a avaliação da sensibilidade do ensaio para reagentes de saturação conforme Anexo 1 A.

#### **4.1.5.3. Estabelecimento da diluição ideal do conjugado AG9**

Para o estabelecimento da diluição de trabalho do conjugado AG9 foram analisadas diferentes diluições do mesmo, frente a diferentes concentrações do anticorpo de captura (Mab CG2) e de vacina (Anexo 1 A). A diluição do conjugado foi determinada pela discriminação da diferença do sinal de absorvância entre o valor positivo e o valor negativo.

#### **4.1.5.4. Dissociação do hidróxido de alumínio (adjuvante) das diferentes amostras de vacinas utilizadas**

Como o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  impede a quantificação correta do antígeno vacinal, ensaios foram feitos também usando as vacinas após dissociação do  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

Resumidamente, foram feitas misturas de volumes iguais (500 $\mu\text{L}$ ) de amostras de vacinas em análises contendo 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e solução de dissociação do hidróxido (PBS contendo Diethanolamina-DEA (Merck) à 2,5% e triton X100 (Merck) a 0,2%). As misturas foram incubadas à temperatura ambiente, por trinta minutos e centrifugadas por 10 segundos a 231x g, para precipitação do hidróxido de alumínio dissociado. Os sobrenadantes foram retirados e usados conforme descrito no Anexo 1 A e B.

#### **4.1.6. Protocolo padronizado de ELISA para quantificação de HBsAg em vacinas contra a hepatite B.**

Para realização do ELISA, foram revestidos os poços das placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Denmark) com a concentração de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$  do Mab CG2 diluído em tampão carbonato-bicarbonato (50mM, pH 9,6) e incubadas por 30 minutos a 37°C e 4°C por 18 horas. Após o período de incubação, as placas foram bloqueadas com 100 $\mu\text{L}$  de PBS/BSA a 3% e incubadas por 1 hora a 37°C, com agitação a 63,0 x g. Após três ciclos de lavagens com PBS-T a 0,05% as placas foram incubadas com 100 $\mu\text{L}$  das amostras de vacinas diluídas em PBS, por 1 hora à 37°C com agitação a 63,0 x g. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T a 0,05% e incubadas por 1 hora à 37°C com agitação, com 100 $\mu\text{L}$  do conjugado marcado

com peroxidase, (MAb AG9-HRP) diluído 1/2.500 em PBS. Após, as placas foram lavadas três vezes e incubadas com 100µL da solução reveladora para enzima peroxidase (tampão fosfato citrato e 3, 5, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-TMB à 2M, (Sigma), e peróxido de hidrogênio, a 30% (Merck). As placas foram mantidas ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 30min e a reação foi interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico à 2M. A absorbância foi medida a 450nm com leitor de microplacas ELX 800 (BIO-TEK, USA).

#### **4.1.7. Teste de estabilidade**

Após a padronização do ELISA, algumas placas foram revestidas com o MAb, estabilizadas e armazenadas a 4°C e a -20°C, por um período de seis (6) meses para avaliação da estabilidade através da sensibilidade analítica. Para o teste da estabilidade foram preparados tampões de estabilização de anticorpos (solução de carbonato-bicarbonato adicionada com sacarose a 5% e BSA a 0,3% com ajuste do pH a 9,6). As diluições das concentrações dos MAbs foram realizadas com tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, e distribuição de 800ng/100µL em cada poço da placa, que foram seladas e incubadas por 30'/ 37°C mais 18 horas e mantidas a 4°C, em atmosfera úmida. Foram feitos os descartes dos sobrenadantes e a distribuição de 200µL/poço do tampão de estabilização descrito acima. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, seguido do descarte do sobrenadante, selamento e manutenção nas temperaturas selecionadas para estabilidade até o momento do uso (seis meses). Antes da realização do ensaio as placas foram colocadas em temperatura ambiente, lavadas três vezes com tampão PBS-tween 20 (0,05%) e usadas conforme o ELISA padronizado. Os resultados avaliados através dos valores de absorbâncias obtidos no primeiro dia antes do período de armazenagem (tempo zero) foram considerados como 100 % de sensibilidade. Os cálculos da variação percentual da sensibilidade foram realizados conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Sensibilidade \%t} = \frac{A_t}{A_i} \times 100$$

Onde,

t = Amostra de reagente em teste

A<sub>t</sub> = Absorbância obtida para t

A<sub>i</sub> = Absorbância obtida antes do período de armazenagem por uma placa do lote usado no teste de estabilidade (100%)

#### **4.1.8. Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias das triplicatas comparadas adotando-se o nível de 5% de probabilidade pelo teste estatístico ANOVA.

#### **4.1.9. Parâmetros de validação**

Os parâmetros especificidade, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez foram utilizados para a validação do ELISA.

##### **4.1.9.1. Especificidade**

Para a avaliação da especificidade foram utilizadas amostras de vacinas contendo ou não o HBsAg frente à amostras das vacinas combinadas com outros antígenos.

##### **4.1.9.2. Linearidade**

Para o estabelecimento da linearidade foram usadas amostras de vacinas (com concentrações baixas, médias e altas (lote 1, lote 2 e lote 3), com três triplicatas. Foram usadas cinco concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/mL) de cada amostra em triplicata. As avaliações das linearidades foram realizadas através da regressão linear pelo método dos quadrados mínimos, da determinação dos parâmetros linear e angular e pela determinação do coeficiente de correlação de variação das replicatas ( $|R| \geq 0,98$ ). Foram realizados testes estatísticos ANOVA para a Análise da Variância com teste de falta de ajuste ( $p < 0,05$  para o coeficiente angular não nulo e  $p > 0,05$  para reta).

##### **4.1.9.3. Precisão**

###### **4.1.9.3.1. Repetitividade interensaios**

Para o estabelecimento da repetitividade foram usadas amostras de vacinas (com concentrações baixas, médias e altas (lote 1, lote 2 e lote 3), com três triplicatas. Foram usadas

cinco concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/mL) de cada amostra em triplicata. Foram calculados os desvios-padrão e os coeficientes de variação-CVs (menor que 10%) das amostras.

#### **4.1.9.3.2. Reprodutibilidade intralaboratorial (Precisão Intermediária)**

Para o estabelecimento da reprodutibilidade foram usadas amostras de vacinas com concentrações baixas, médias e altas (lote 1, lote 2 e lote 3), com três triplicatas. Foram usadas cinco concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/mL) de cada amostra em triplicata. Os ensaios foram realizados com diferentes analistas. Foram calculados as médias, as variâncias, os desvios padrão e os CVs das amostras (menor que 20%).

#### **4.1.9.4. Limite de Detecção-LD**

Para avaliação do LD foram realizadas oitenta e uma repetições utilizando como controles negativo PBS e MAb IgG 1a anti interferon (CANTELLI, et al., 2009), em três placas diferentes. Usamos o valor médio mais três vezes o desvio padrão para estimar o LD.

#### **4.1.9.5. Limite de Quantificação**

Para o estabelecimento do LQ, foi usado o valor médio adicionado de dez desvios padrão do padrão branco (PBS) encontrados para o LD.

#### **4.1.9.6. Exatidão**

Para avaliação da exatidão foram usados os resultados encontrados com o uso da faixa de trabalho obtidos com as concentrações de (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/mL) das vacinas através das curvas padrão (linearidade), onde os desvios não deverão exceder 20%. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}}$$

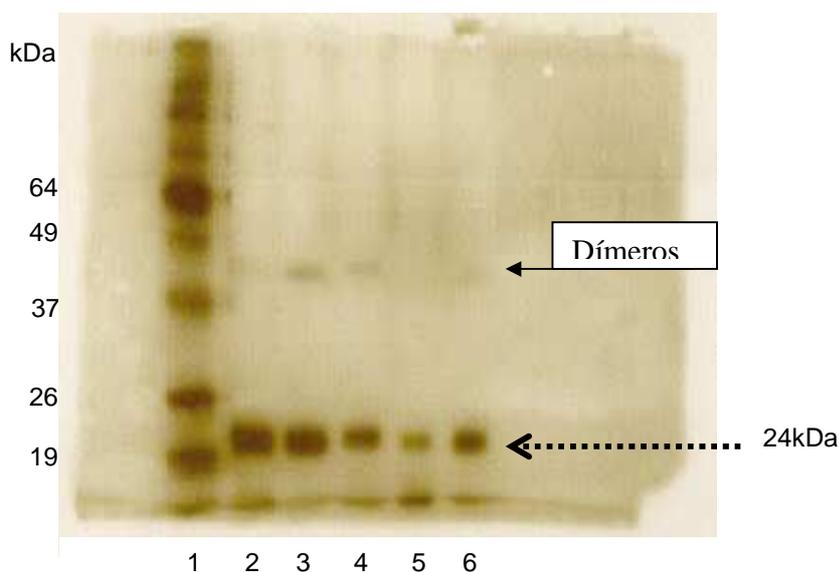
#### **4.1.9.7. Robustez**

A robustez foi avaliada através da utilização de soluções de saturação (PBS/BSA) com diferentes concentrações de reagente de saturação BSA (3 e 5%).

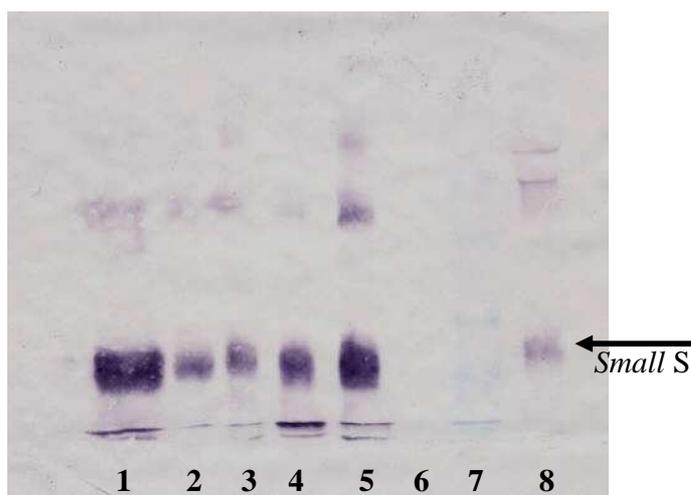
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise por SDS-PAGE e *Western-blot* do HBsAg das vacinas contra a hepatite B

A pureza do HBsAg foi confirmada por SDS-PAGE como uma banda de aproximadamente 24 kDa (*Small S*), como esperado para monômeros e de aproximadamente 46 kDa correspondente à forma dímera que não foi reduzida (Figura 9). No *Western Blot* a presença das formas monômera e dímera do HBsAg foi confirmada com o anticorpo específico para *Small S* (Figura 10).



**Figura 9.** Gel SDS-PAGE corado por coloração em prata correspondente à análise do perfil de proteínas das vacinas contra a hepatite B. canaleta 1, padrão de peso molecular BenchMark Pré-corado (Invitrogen, 5 $\mu$ l); canaleta 2, amostra de vacina Engerix-B (10 $\mu$ l); canaleta 3, amostra vacina Euvax (10 $\mu$ l); canaleta 4, amostra vacina Hepavax-gene (10 $\mu$ l); canaleta 5, vacina Butang (10 $\mu$ l) e canaleta 6, Heberbiovac(10 $\mu$ l).



**Figura 10.** Membrana correspondente ao resultado do *Westen Blot* do HBsAg das vacinas utilizando o anticorpo anti- HBsAg da GlaxoSmithKline: canaleta 1, amostra de vacina Engerix-B (10 $\mu$ l); canaleta 2, amostra vacina Euvax (10 $\mu$ l); canaleta 3, amostra vacina Hepavax-gene (10 $\mu$ l); canaleta 4. vacina Butang (10 $\mu$ l); canaleta 5, Heberbiovac(10 $\mu$ l), canaleta 6, tampão amostra, canaleta 7, padrão de peso molecular BenchMark Pré-corado (Invitrogen, 5 $\mu$ l); canaleta 8, padrão HBsAg.

## 5.2. Estabelecimento de parâmetros iniciais para padronização do ELISA para detecção de HBsAg em amostras vacinais

O volume usado dos reagentes individuais foi de 100 $\mu$ L/poço, a não ser quando indicado especificamente.

### 5.2.1. Placas de ELISA.

Após avaliações com diferentes concentrações de MAbs frente às diferentes concentrações de vacinas ( $\mu$ g/mL) utilizando as placas Nunc-Maxisorb® (Dinamarca) e Microlon 600 (Greiner Bio-one, Atlanta), os valores de absorvância encontrados para a placa Maxisorb 96 foram superiores aos encontrados para a placa Microlon 600 (Greiner Bio-one, Atlanta).

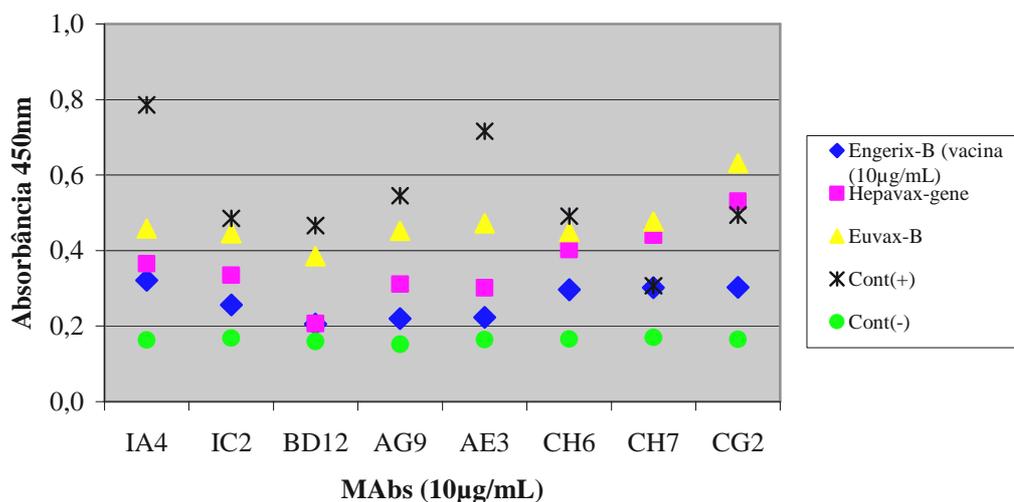
### 5.2.2. Solução de saturação da placa

Foram avaliadas várias soluções contendo reagentes de saturação da reatividade da placa após o revestimento por MAb (Anexo 1A), e a solução de PBS/BSA 3% apresentou valores de absorvância inespecífica inferiores diferenciando-se das outras soluções de saturação testadas (dados não mostrados).

### 5.2.3. Seleção quanto à reatividade dos MABs anti-HBs para o ELISA

Inicialmente, como MAb de captura para o ELISA foram avaliados oito MABs anti-HBs e todos reagiram com os HBsAg das três vacinas analisadas (Hepavax-gene, Euvax-B e Engerix-B). No entanto, a reatividade de alguns MABs foi menor com a vacina Engerix-B (MABs IC2, BD12, AG9 e AE3), com a vacina Hepavax-gene e Euvax (MAb BD12) e com o controle positivo (MAb CH7) (Figura 11). O MAb BD12 foi o que apresentou menor reatividade para todas as vacinas (Figura 11). Foram selecionados como anticorpos de captura os MABs CG2, CH6 e CH7.

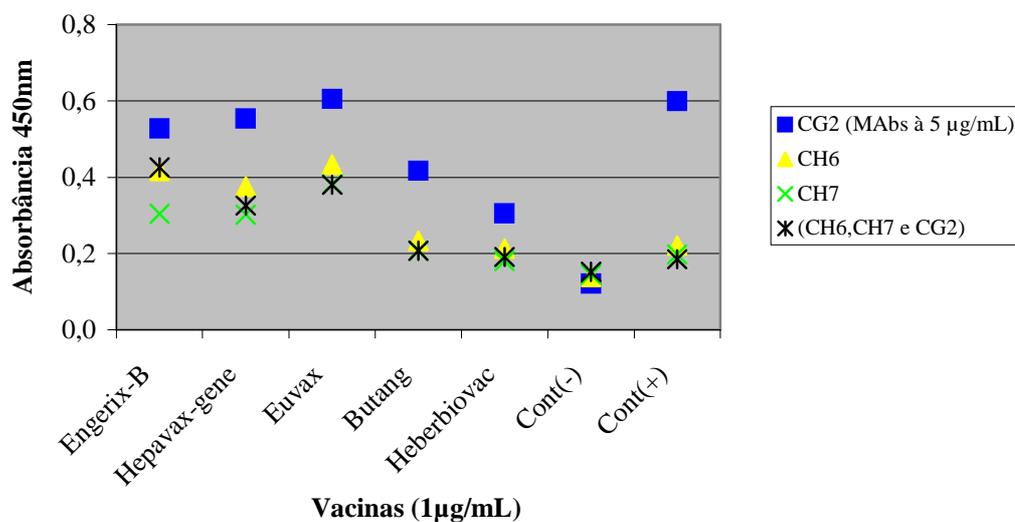
**Figura 11.** Reatividades dos oito MABs com o HBsAg das três vacinas



#### 5.2.4. Avaliação dos três MAb previamente selecionados (CG2, CH6 e CH7) como anticorpos de captura do HBsAg das cinco vacinas

Os MAb CG2, CH6 e CH7 foram testados como anticorpos de captura para duas novas amostras de vacinas (Butang e a Heberbiovac-HB), introduzidas neste estudo, no entanto a reatividade foi menor do que a encontrada para as vacinas Hepavax-gene, Euvax-B e Engerix-B conforme demonstrado na Figura 12. A reatividade utilizando o MAb CG2 sozinho foi igual à reatividade utilizando o MAb CG2 combinado com os anticorpos CH6 e CH7 (Figura 12).

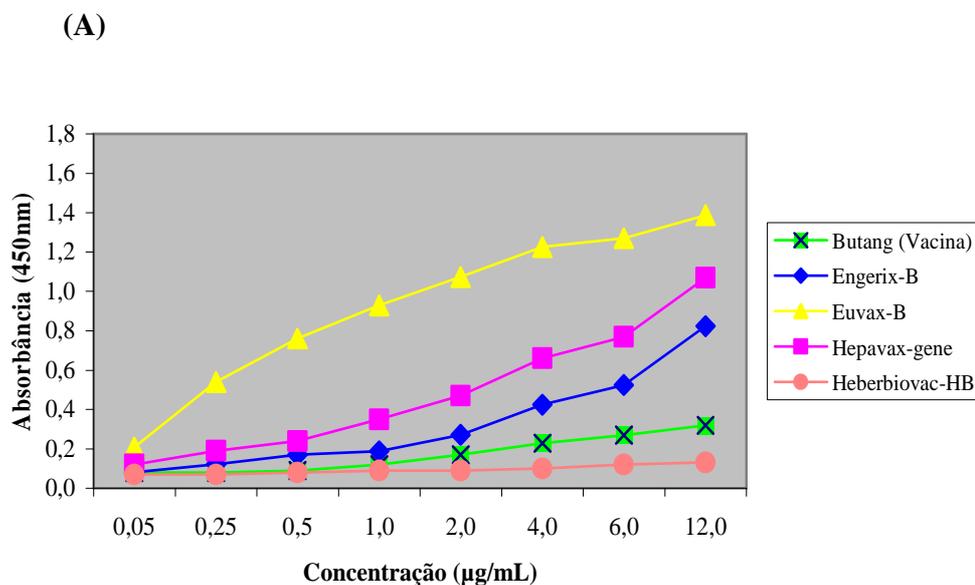
**Figura 12.** Resultados de reatividades dos MAb CG2, CH6 e CH7 (individual e em combinação)



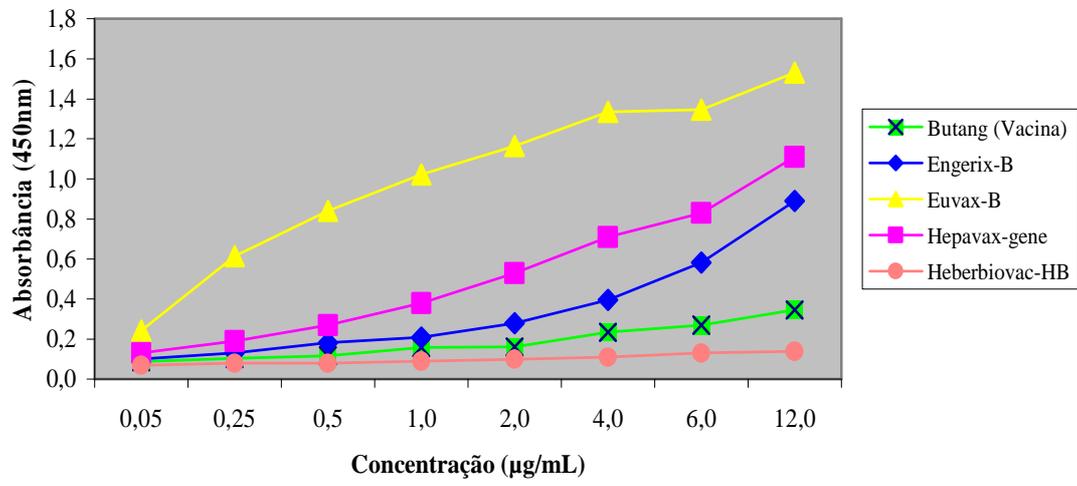
### 5.2.5. Avaliação das diferentes concentrações do MAb selecionado (CG2) como anticorpo de captura frente às diferentes concentrações de vacinas

Não houve variação nos valores de absorvância relativa quando diferentes concentrações do anticorpo de captura (MAb CG2) foram utilizadas, mesmo frente a diferentes concentrações de vacina. O perfil de absorvância apresentado nas Figuras 13A-C mostra que não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as reatividades ao utilizarmos diferentes diluições de MAb e concentrações de cada vacina analisada (Butang ( $p=0,811$ ), Engerix-B ( $p=0,865$ ), Euvax ( $p=0,776$ ), Hepavax-gene ( $p=0,928$ ) e Heberbiovac- HB ( $p=0,381$ )).

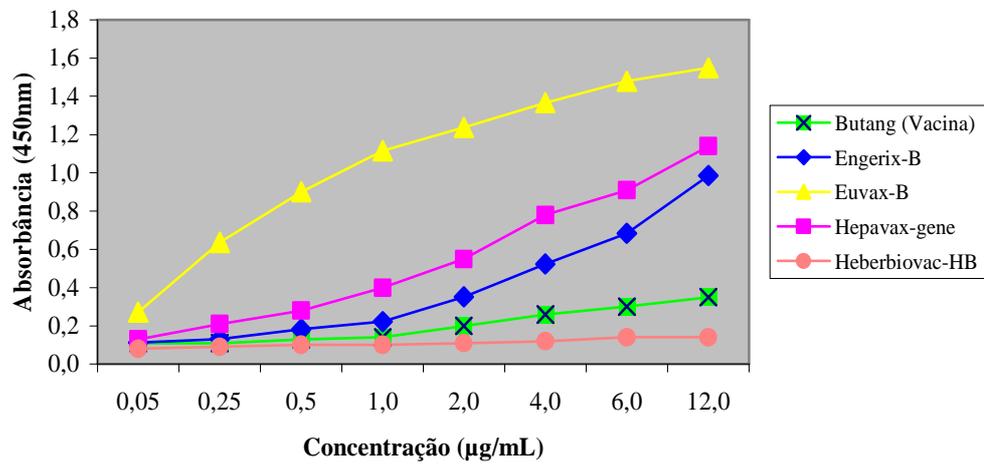
**Figura 13.** Resultados das diferentes concentrações do MAb CG2 para captura (A -  $2\mu\text{g/mL}$ ), (B -  $4\mu\text{g/mL}$ ) e (C -  $8\mu\text{g/mL}$ )



(B)



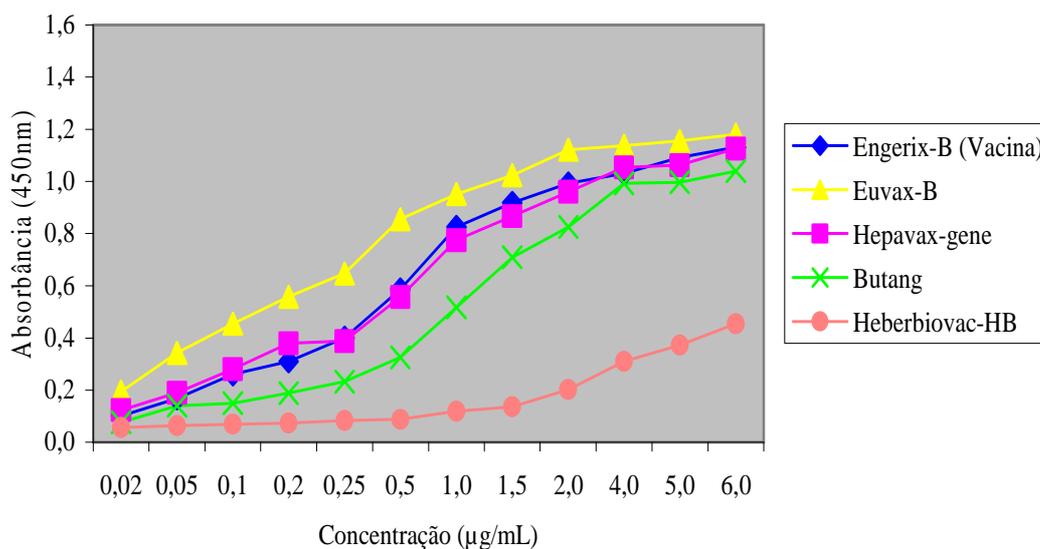
(C)



### 5.2.6. Retirada do hidróxido de alumínio e agitação das placas de ELISA a 13,7 x g com tempo de incubação de 120 minutos a 37°C.

Os valores de absorbância obtidos foram superiores quando as amostras foram previamente tratadas para a retirada de hidróxido de alumínio, e as placas mantidas sob agitação de 13,7 x g pelos 120 minutos de incubação a 37°C (Figura 14).

**Figura 14.** Resultados obtidos com uso de amostras de vacinas após a retirada do hidróxido de alumínio com a concentração do MAb CG2 para captura (2µg/mL)



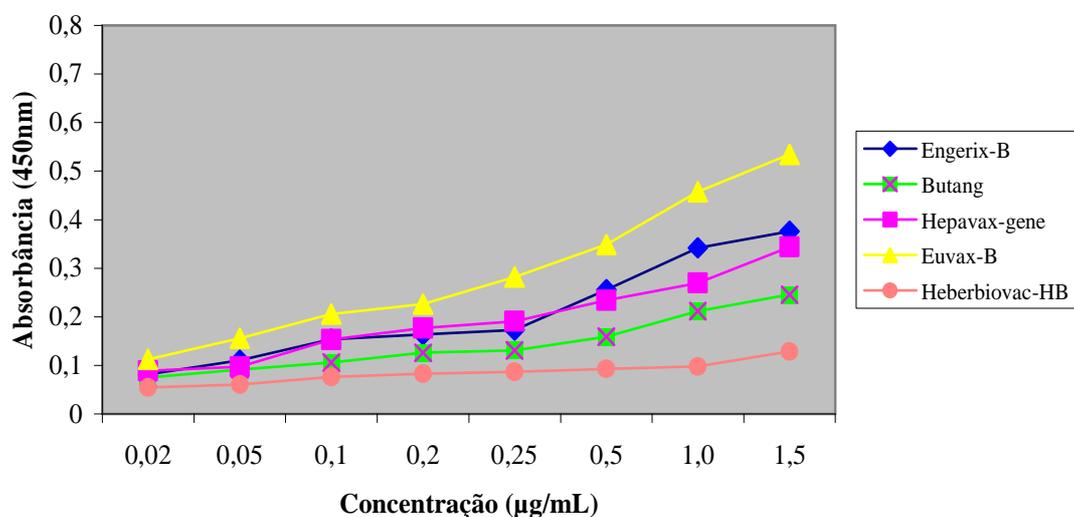
**Tabela 1.** Resultados de densidades óptica obtido com uso de amostras antes da retirada e após a retirada do hidróxido de alumínio

<b>Amostras de vacinas sem o hidróxido de alumínio (<math>\mu\text{g/mL}</math>) (Médias das triplicatas - DOs)</b>				
	<b>0,05</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
Engerix-B	0,169	0,401	0,586	0,825
Euvax-B	0,343	0,647	0,855	0,952
Hepavax-gene	0,19	0,388	0,557	0,775
Butang	0,14	0,232	0,326	0,517
Heberbiovac-HB	0,064	0,083	0,088	0,119
<b>Amostras de vacinas com o hidróxido de alumínio (<math>\mu\text{g/mL}</math>) (Médias das triplicatas - DOs)</b>				
	<b>0,05</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
Engerix-B	0,111	0,173	0,256	0,342
Euvax-B	0,156	0,282	0,349	0,458
Hepavax-gene	0,097	0,191	0,234	0,27
Butang	0,092	0,131	0,159	0,212
Heberbiovac-HB	0,061	0,087	0,093	0,098

### **5.2.7. Retirada do hidróxido de alumínio e agitação das placas de ELISA a 13,7 x g durante um tempo de incubação de 90 minutos a 37°C**

Na análise dos resultados obtidos com os dois tempos de incubação, de 90 (Figura 15) e 120 minutos (Figura 14) a 37°C, observamos que as reatividades encontradas para o tempo de 120 minutos foram superiores para todas as vacinas. No entanto, as vacinas Euvax-B, Engerix-B e Hepavax-gene foram as que apresentaram melhores respostas para a maioria das concentrações usadas com o tempo de 90 minutos (Figura 15).

**Figura 15.** Resultados obtidos com o tempo de incubação da placa de 90 minutos



**Tabela 2.** Resultados de densidades ópticas obtidos com uso de amostras após a retirada do hidróxido de alumínio durante um tempo de incubação de 120 e 90 minutos a 37°C.

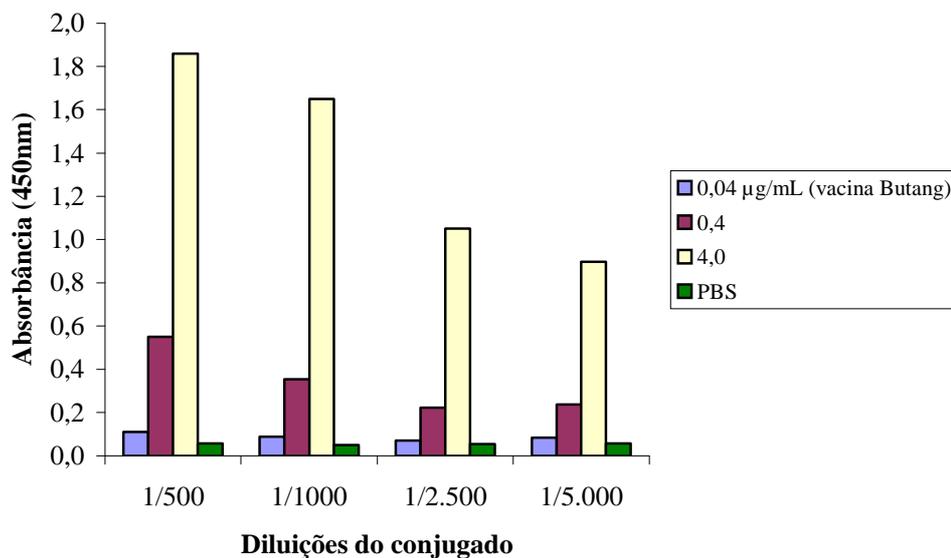
<b>Amostras de vacinas (µg/mL) e tempo de incubação da placa por 120 minutos a 37°C (Médias das triplicatas - DOs)</b>				
	<b>0,05</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
Engerix-B	0,169	0,401	0,586	0,825
Euvax-B	0,343	0,647	0,855	0,952
Hepavax-gene	0,19	0,388	0,557	0,775
Butang	0,14	0,232	0,326	0,517
Heberbiovac-HB	0,064	0,083	0,088	0,119
<b>Amostras de vacinas (µg/mL) e tempo de incubação da placa por 90 minutos a 37°C (Médias das triplicatas - DOs)</b>				
	<b>0,05</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
Engerix-B	0,111	0,173	0,256	0,342
Euvax-B	0,156	0,282	0,349	0,458
Hepavax-gene	0,097	0,191	0,234	0,27
Butang	0,092	0,131	0,159	0,212
Heberbiovac-HB	0,061	0,087	0,093	0,098

### 5.2.8. Estabelecimento da diluição do conjugado anti-HBs AG9-HRP

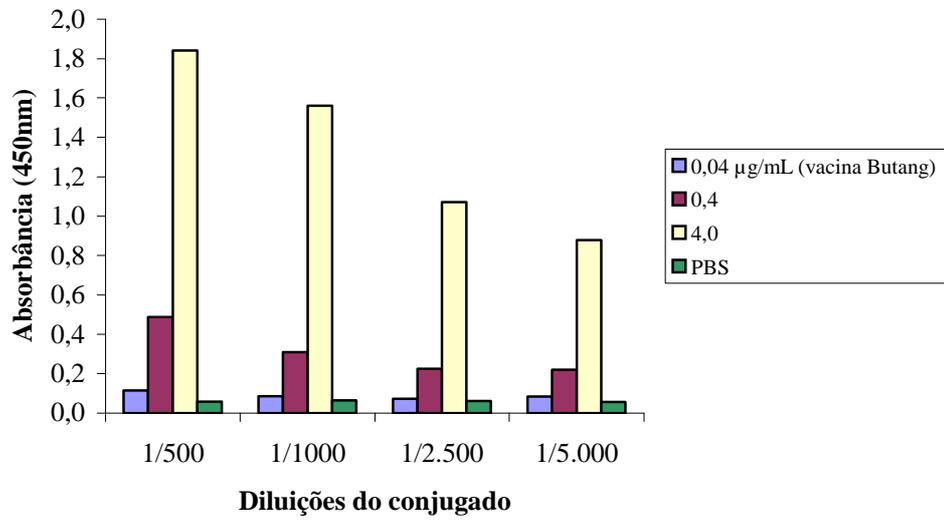
Foram analisadas diferentes diluições, do conjugado AG9HRP (1:500, 1:1000, 1:2500 e 1:5000) frente a diferentes concentrações do MAb CG2 usado para captura (2, 5 e 10 $\mu$ g/mL) e da vacina Butang (0,04, 0,4 e 4 $\mu$ g/mL). As diluições de conjugado 1:2500 e 1:5000 foram consideradas adequadas já que uma concentração de 4 $\mu$ g/mL com a diluição de 1:2500 deu uma absorção de 1,0 a 450nm quando a menor concentração de MAb CG2 de captura foi usada (Figura 16 A, B e C).

**Figura 16.** Resultados obtidos com as diferentes diluições do conjugado AG9-HRP usando três concentrações do MAb de captura CG2 (2, 5 e 10 $\mu$ g/mL)

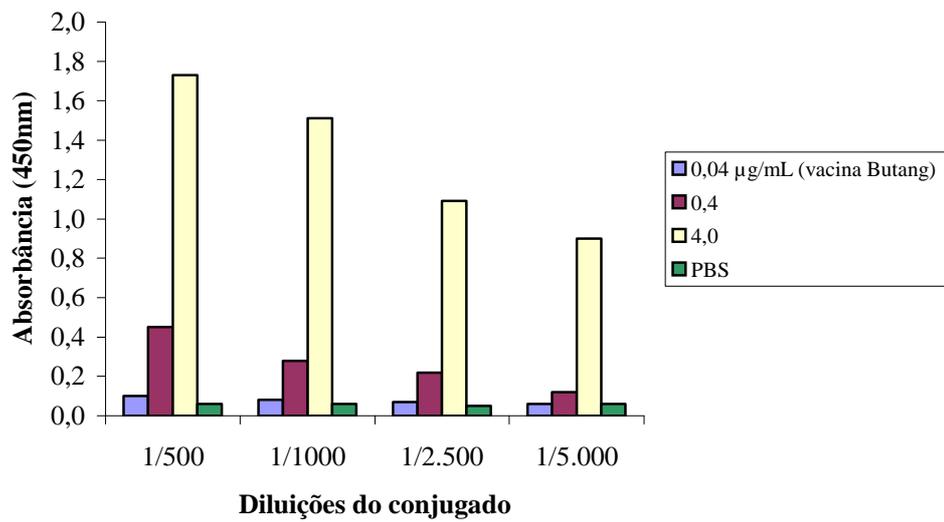
A



**B**



**C**



### **5.3. Padronização do ELISA para detecção do HBsAg em amostras vacinais - resultados finais**

Iniciamos esta fase do trabalho utilizando um segundo lote de fluído ascítico contendo o MAb CG2 recebido de Biomanguinhos, o qual foi previamente purificado conforme descrito no item 4.1.4.3 e utilizado como captura. Nesta fase também foram utilizadas concentrações menores de amostras vacinais (Anexo 1B).

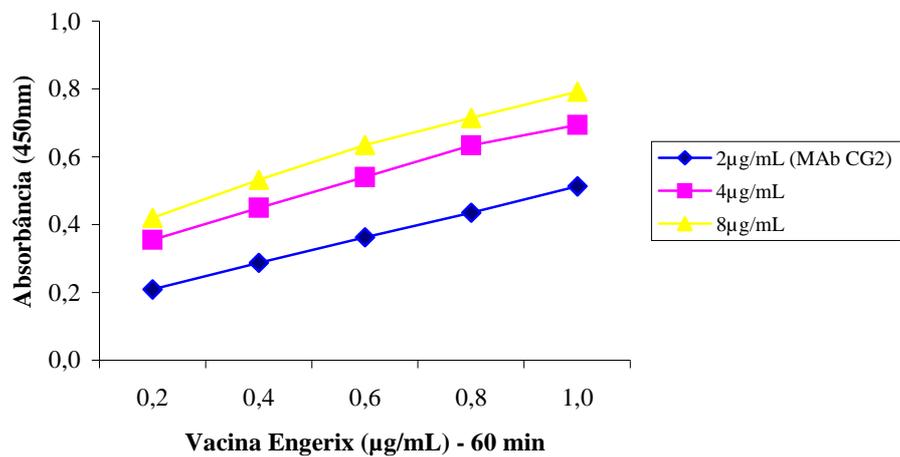
Amostras de vacinas combinadas (Quinvaxem: DTP-HepB+Hib) foram introduzidas no estudo em substituição às amostras da vacina Heberbiovac, retiradas para serem avaliadas com outros parâmetros, posteriormente.

#### **5.3.1. Utilização de diferentes concentrações de MAb CG2 e vacinas, tempo de incubação a 37°C durante 60 minutos e agitação da placa a 63 x g durante a incubação**

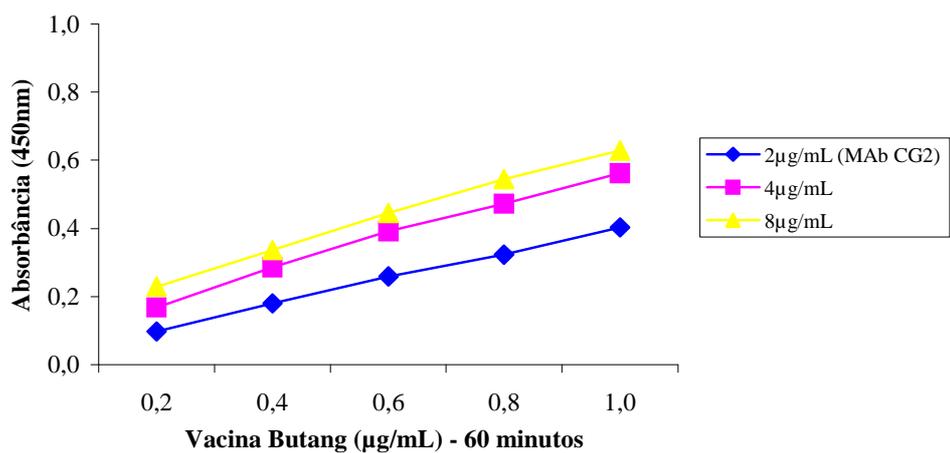
Os valores de absorbância obtidos utilizando tempo de incubação de 60 minutos, diferentes concentrações de MAb CG2 e de vacinas foram proporcionais as concentrações utilizadas. Comparativamente, os resultados obtidos com as concentrações de 2 e 8µg/mL de MAb CG2 mostraram diferenças significativas para as vacinas Engerix (p=0,03), Euvax (p=0,01) e Quinvaxem (p=0,02) (Figura 17 A1-A5).

**Figura 17** – Resultados obtidos com o tempo de 60 minutos de incubação a 37°C com as vacinas Engerix-B (A1), Butang (A2), Hepavax-gene (A3), Euvax-B (A4) e Quinvaxem (A5).

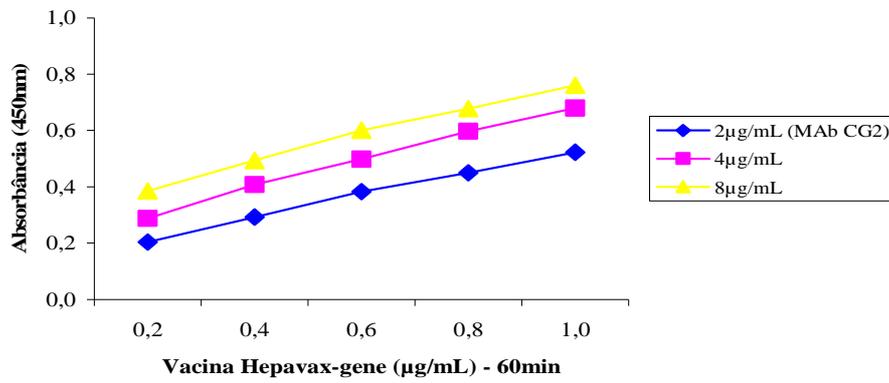
(A1)



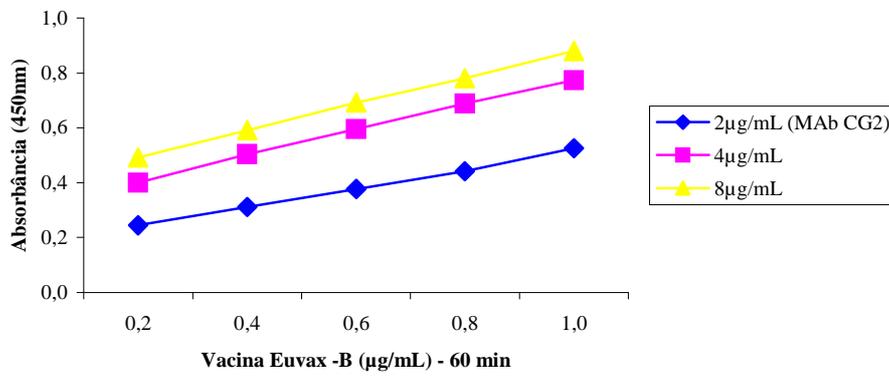
(A2)



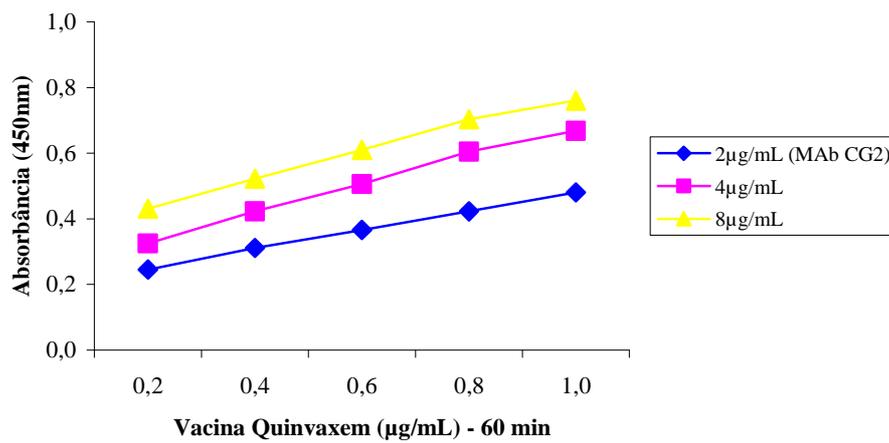
(A3)



(A4)



(A5)

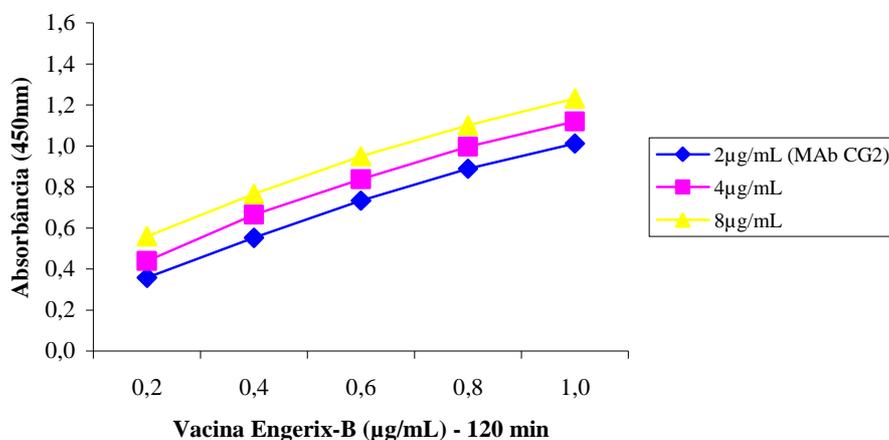


### 5.3.2. Utilização de diferentes concentrações de MAb CG2, tempo de incubação a 37°C de 120 minutos sob agitação de 63 x g.

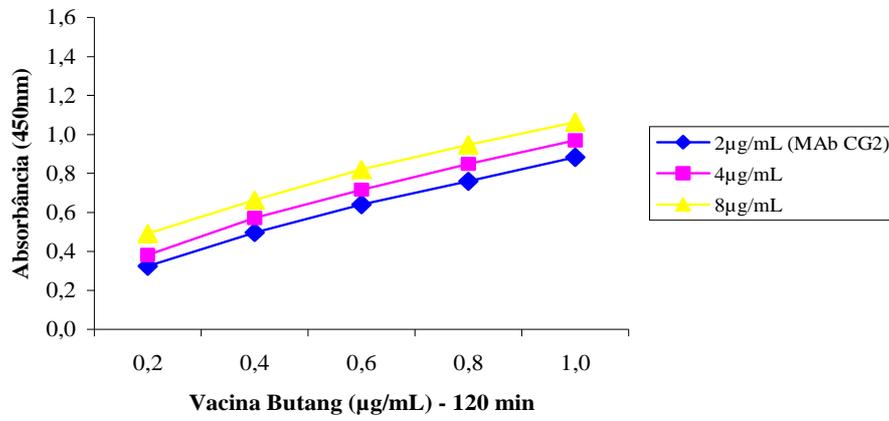
Os resultados obtidos com o tempo de incubação a 37°C de 120 minutos com as diferentes concentrações de MAb foram todos superiores aos obtidos com o tempo de 60 minutos (Figura 18A1-A5) para as cinco amostras de vacinas analisadas. A comparação dos resultados entre as concentrações de 2 e 8µg/mL de MAb mostrou diferença significativa apenas para a vacina Euvax (p=0,026) (Figura 18A4).

**Figura 18.** Resultados obtidos com o tempo de 120 minutos de incubação com as vacinas Engerix-B (A1), Butang (A2), Hepavax-gene (A3), Euvax-B (A4) e Quinvaxem (A5)

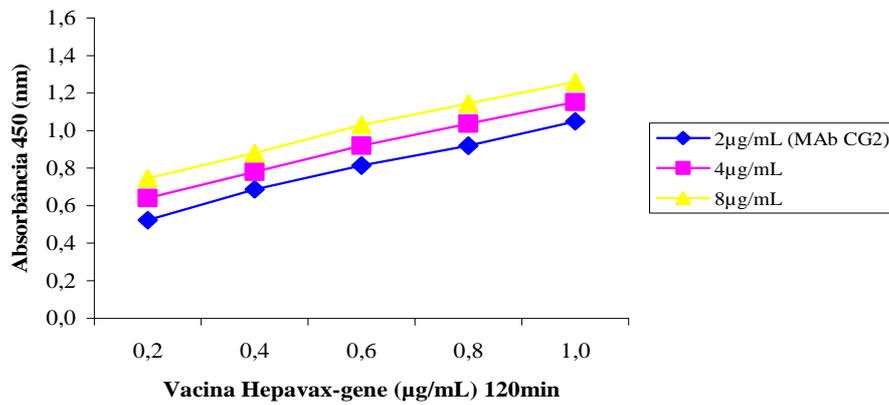
(A1)



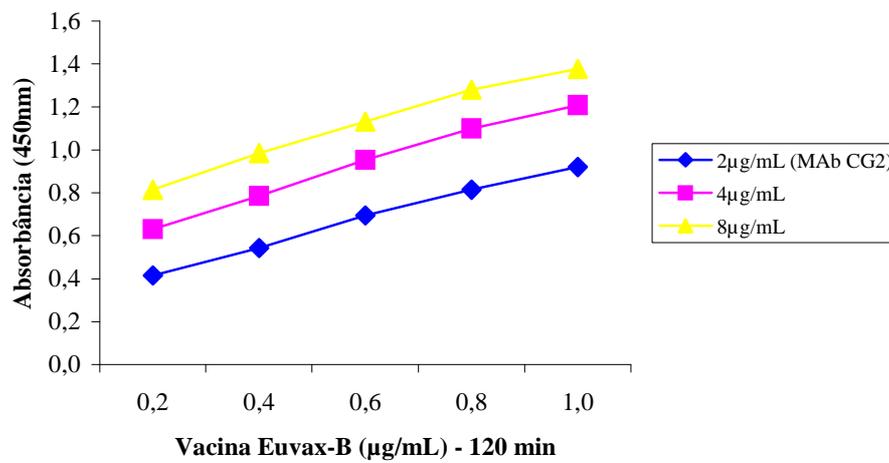
(A2)



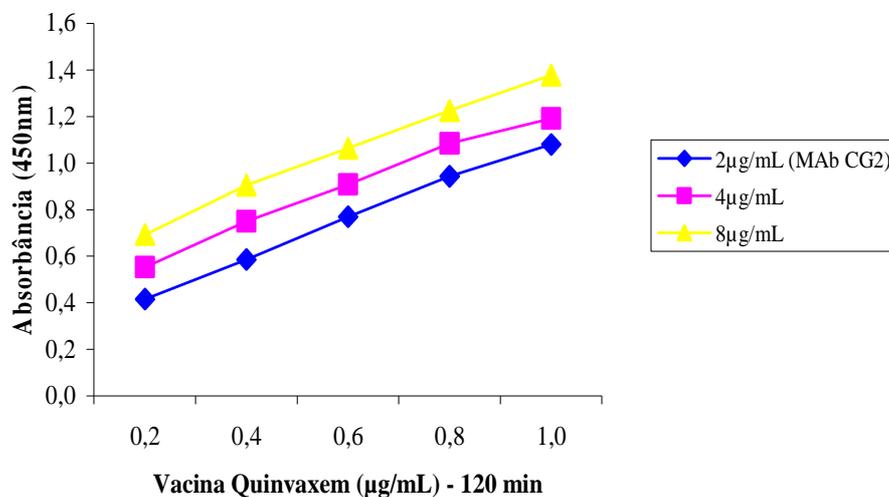
(A3)



(A4)



(A5)

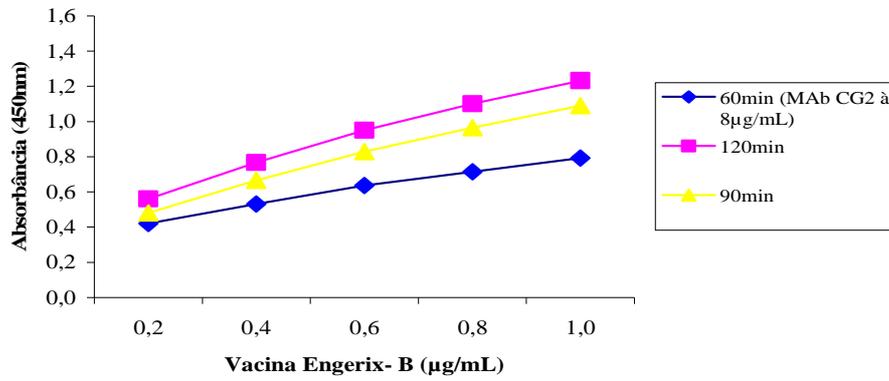


### 5.3.3. Utilização da concentração de MAb CG2, (8µg/mL) frente aos tempos de incubação de 60, 90 e 120 minutos a 37°C e agitação de 63 x g

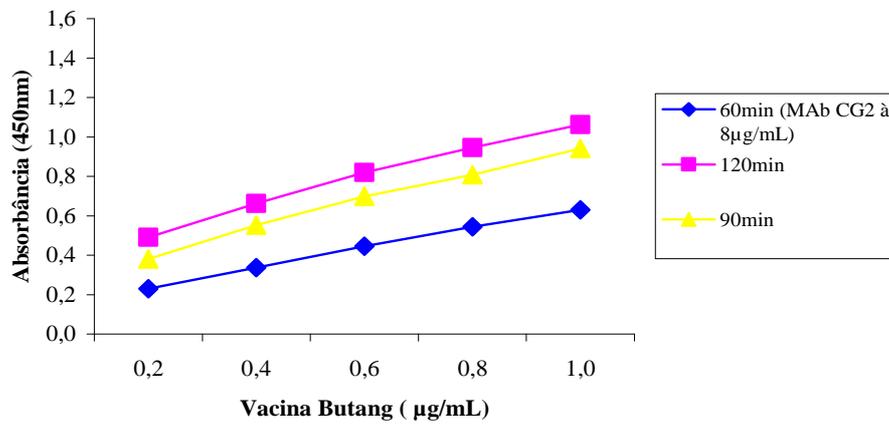
Os resultados obtidos com o tempo de 90 minutos de incubação das placas foram superiores aos encontrados com o tempo de 60 minutos (Figura 17 A1-A5). A comparação dos resultados obtidos com a concentração de 8µg/mL de MAb de captura com os tempos de incubação de 60 e 120 minutos mostraram diferenças significativas para as três vacinas Butang ( $p=0,019$ ), Hepavax-gene ( $p=0,005$ ), Euvax ( $p=0,007$ ) e Quinvaxem ( $p=0,010$ ) (Figura 19 A1-A5).

**Figura 19.** Comparação dos três tempos de incubação (60, 90 e 120 minutos) a 37°C com as vacinas Engerix-B (A1), Butang (A2), Hepavax-gene (A3), Euvax-B (A4) e Quinvaxem (A5)

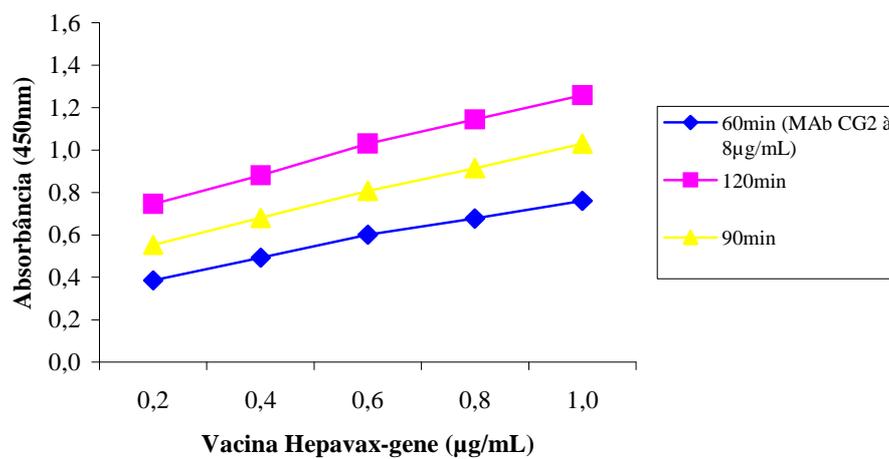
(A1)



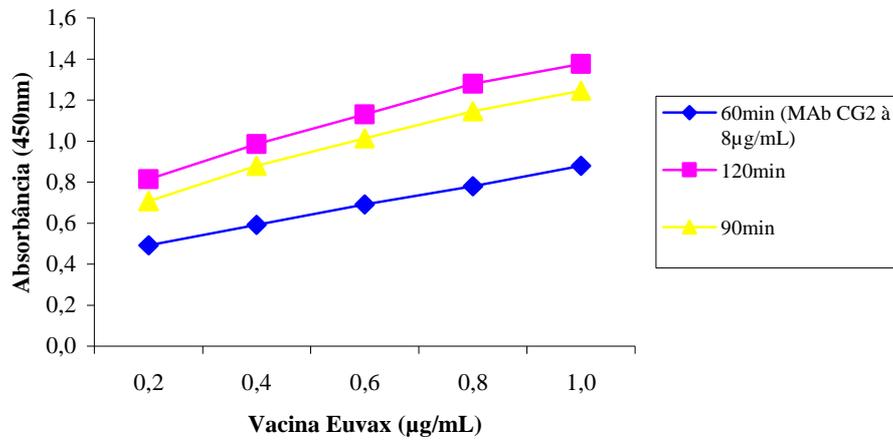
(A2)



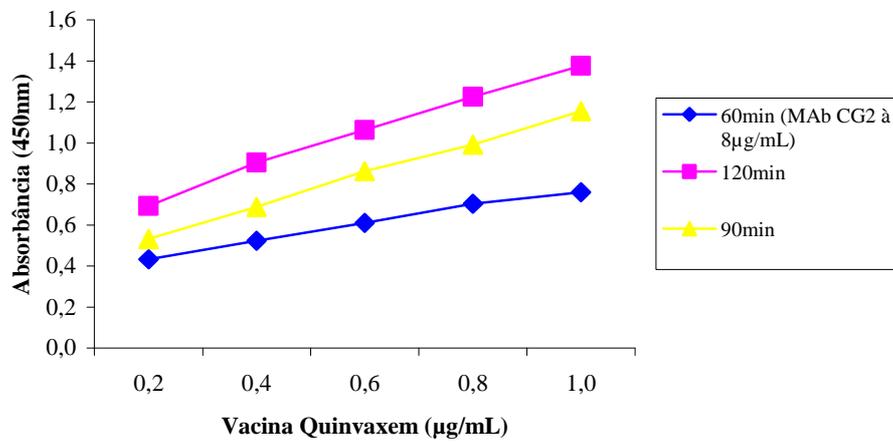
(A3)



(A4)



(A5)

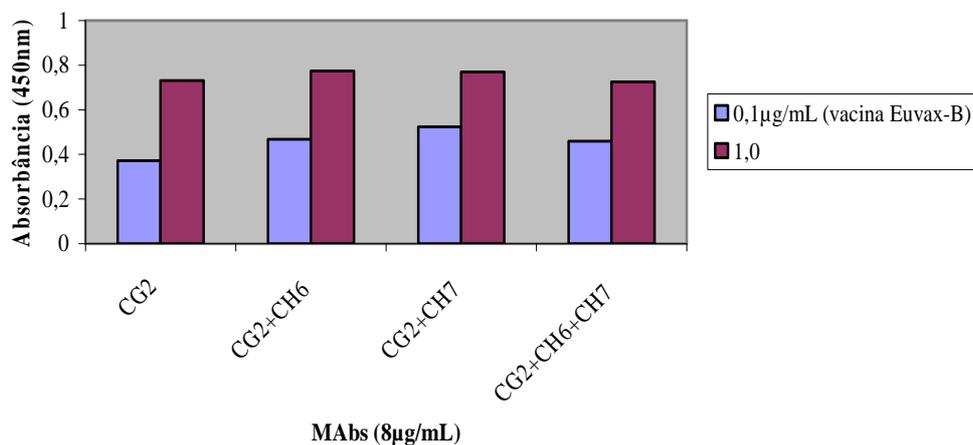


### 5.3.4. Utilização dos MAbs CG2, CH6 e CH7 na concentração de 8 $\mu$ g/mL (individual e combinados) para captura de concentrações de amostras de vacinas (0,1 e 1 $\mu$ g/mL)

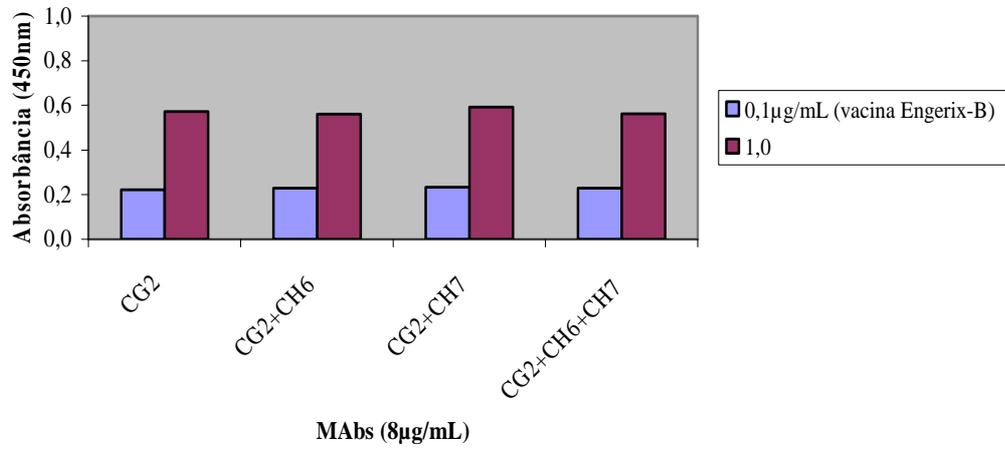
Os valores de absorbância obtidos foram proporcionais às concentrações das amostras de vacinas utilizadas. A combinação dos MAbs CG2 e CH7, para a concentração da vacina Euvax-B (0,1 $\mu$ g/mL) foi superior às outras vacinas (Figura 20 A1). Não foram encontradas diferenças significativas com o uso do MAb CG2 sozinho ou em combinação com os MAbs CH6 e CH7 na concentração de 1 $\mu$ g/mL das vacinas utilizadas ( Euvax- B, p=0,99, Engerix-B, p=0,98 e Hepavax-gene, p= 0,99) (Figura 20 A1-3).

**Figura 20.** Resultados encontrados com os MAbs CH6, CH7 e CG2 (8 $\mu$ g/mL) individual e combinados com as vacinas Euvax- B (A1), Engerix-B (A2) e Hepavax-gene (A3)

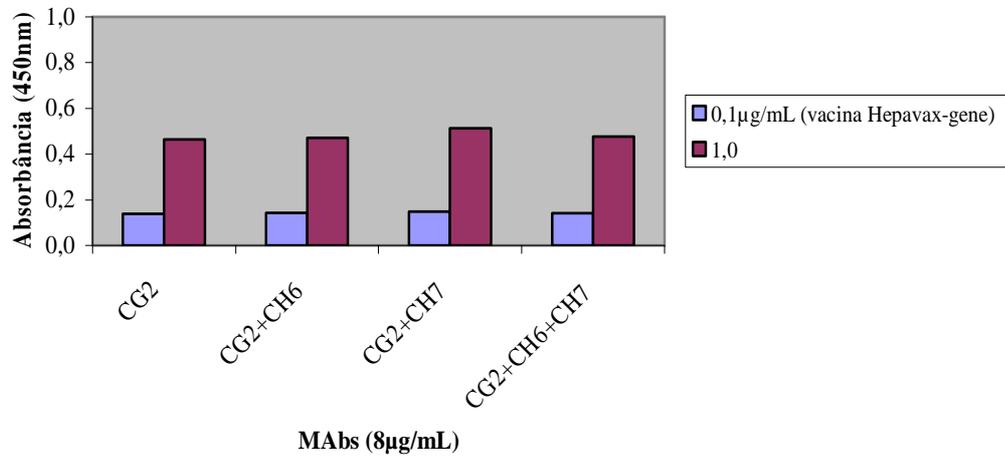
A1



## A2



## A3

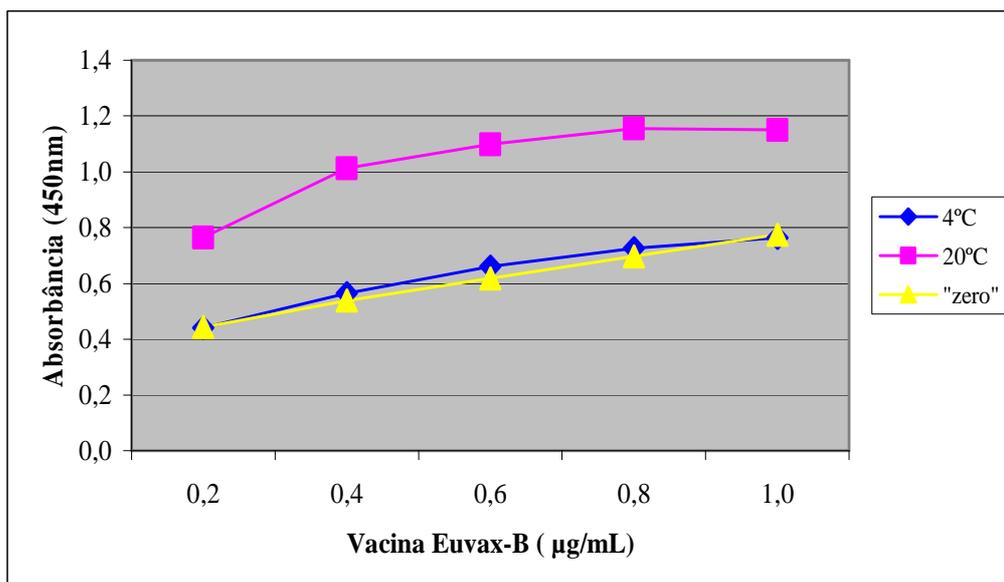


### 5.3.5. Avaliação da estabilidade do MAb CG2 após revestimento e estabilização no tempo inicial (dia “zero”) e seis meses após estocagem nas temperaturas de 4°C e -20°C

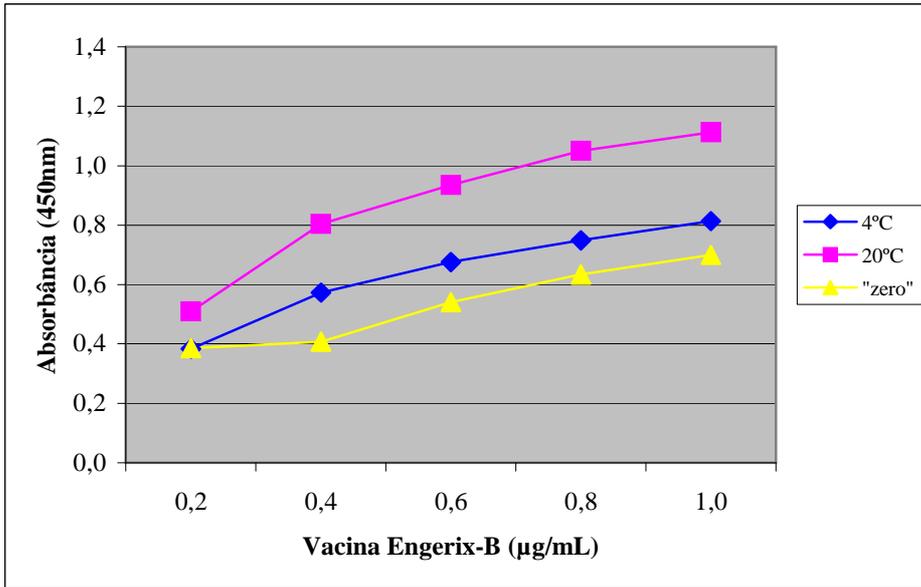
Os resultados encontrados para as placas sensibilizadas e estabilizadas com o MAb CG2 no dia “zero” e seis meses após o armazenamento à temperatura de 4°C foram semelhantes para as amostras vacinais Euvax-B, Hepavax-gene e Butang (Figura 21 A1, 3, 4 e 5). A reatividade obtida para a vacina Engerix-B foi superior ao dia “zero”, mais não significativamente diferente (Figura 21 A2). Para a temperatura de armazenamento -20°C foi observada uma alteração nos valores de absorbância para maior em relação ao tempo “zero” (Figura 21A1-A5).

**Figura 21 (A1– A5).** Resultados de estabilidade do MAb CG2 ( 8µg/mL)

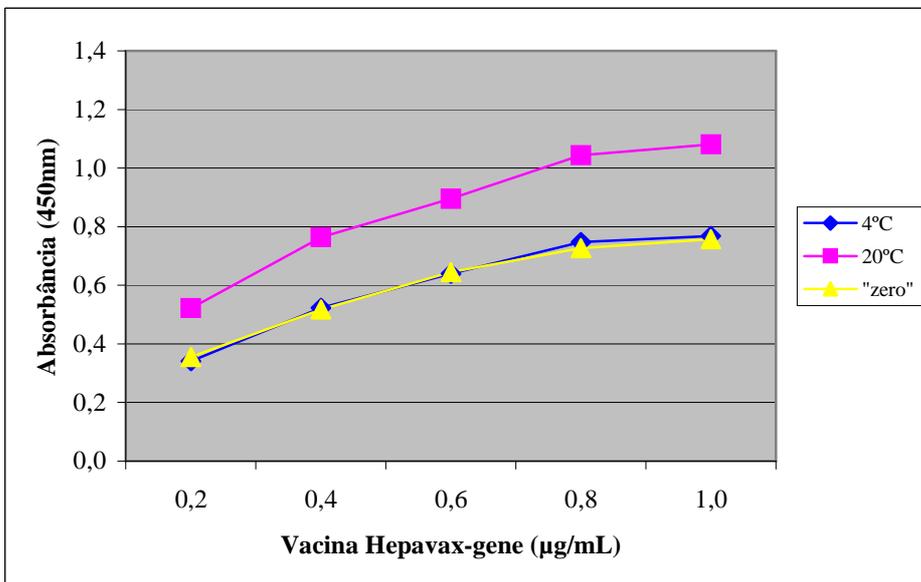
**A1**



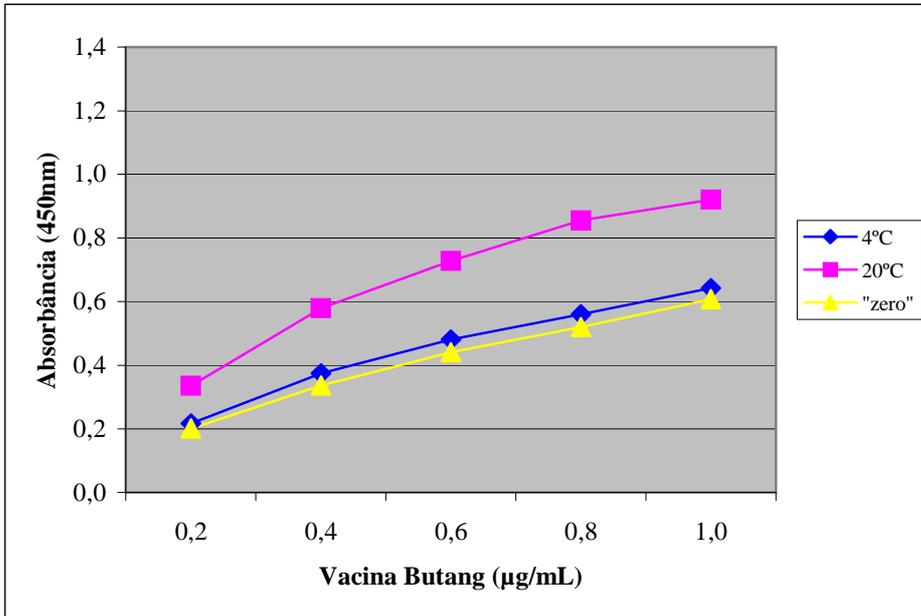
**A2**



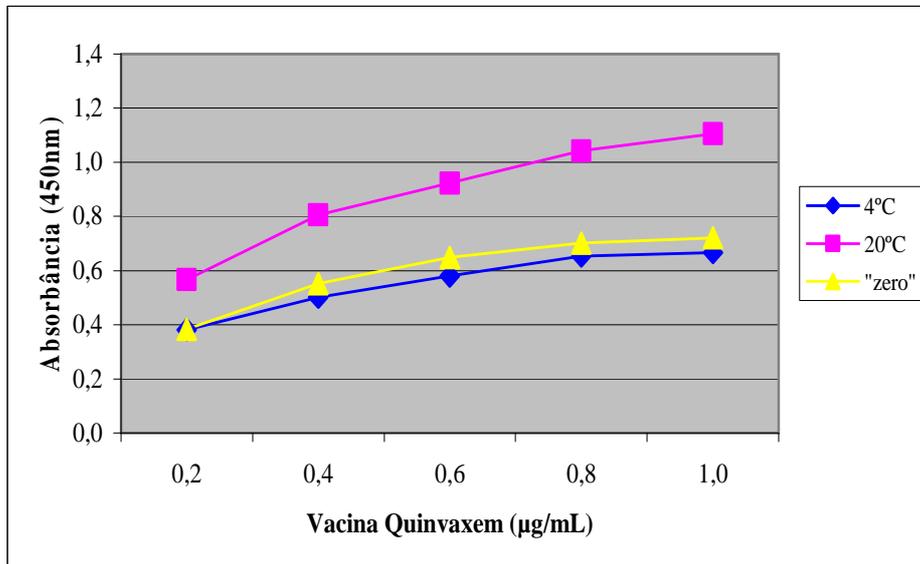
**A3**



**A4**



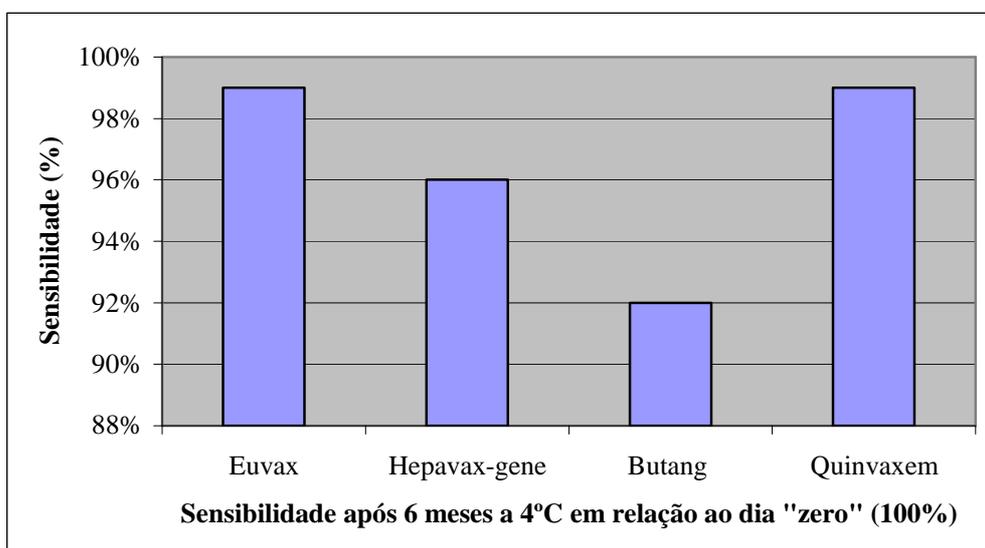
**A5**



### 5.3.5.1. Comparação da sensibilidade (%) do teste obtida no dia “zero” (100%) e seis meses após estocagem à temperatura de 4°C.

Os resultados obtidos com a comparação de sensibilidade (%) utilizando placas armazenadas por seis meses a 4°C e no tempo inicial (dia “zero” = 100%) com as vacinas Euvax-B, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B e Quinvaxem indicaram uma estabilidade da sensibilidade do teste superior a 90% conforme Figura 22.

**Figura 22.** Resultados de sensibilidade (%) obtidos para placas estocadas 6 meses/4°C com placas não estocadas (sensibilidade = 100%)



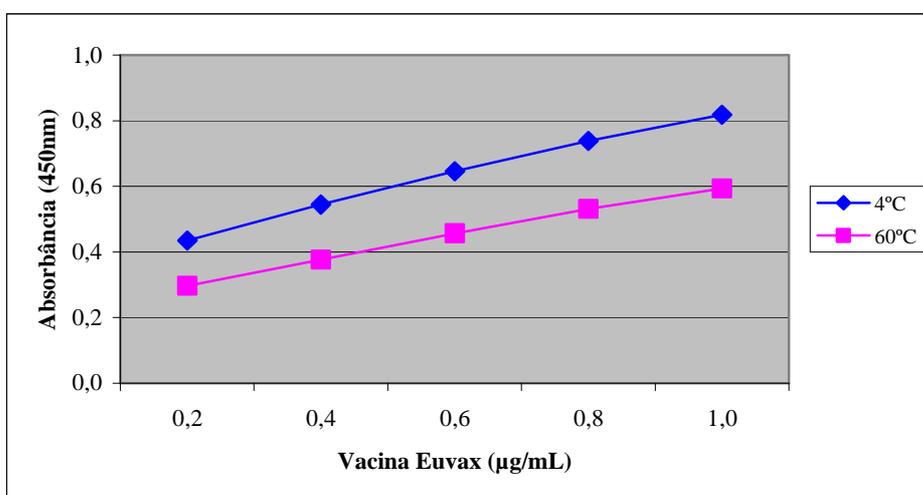
### 5.3.6. Utilização das amostras de vacinas submetidas à situação de estresse (4°C e a 60°C por sete dias) avaliadas no ELISA.

Foram utilizadas amostras das vacinas mantidas em temperaturas de 4°C e 60°C (durante sete dias) com o objetivo de avaliar a existência de possíveis alterações devido a mudanças extremas de temperatura.

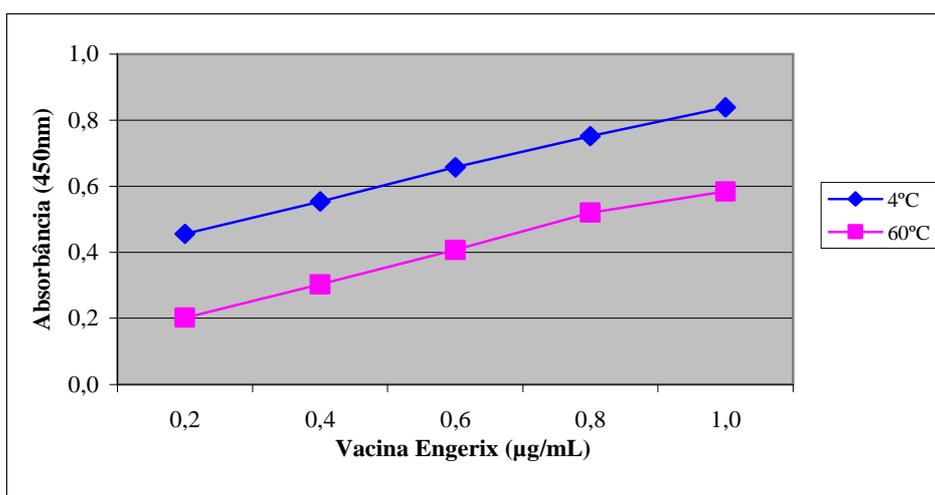
Os resultados mostraram que as alterações encontradas com as amostras submetidas à situação de estresse foram reconhecidas no ELISA (Figura 23 A-D). As diferenças encontradas com o uso das amostras nas diferentes temperaturas foram significativas para as vacinas Engerix-B ( $p= 0,03$ ), Hepavax-gene ( $p=0,005$ ) e Butang, ( $p= 0,004$ ). Para vacina Euvax a diferença não foi significativa ( $p=0,06$ ) (Figura 23 A,B, C e D).

**Figura 23 (A, B, C e D).** Resultados obtidos com amostras de vacinas armazenadas a 4°C e a 60°C por 7 dias..

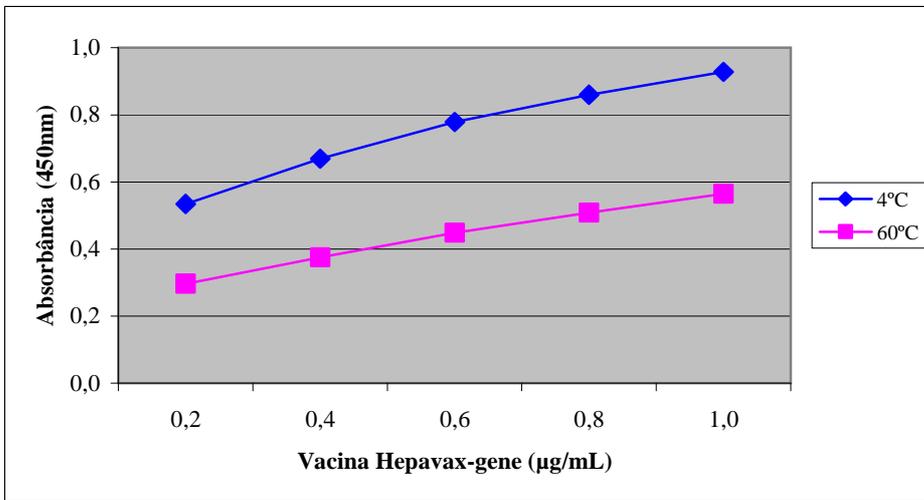
**A**



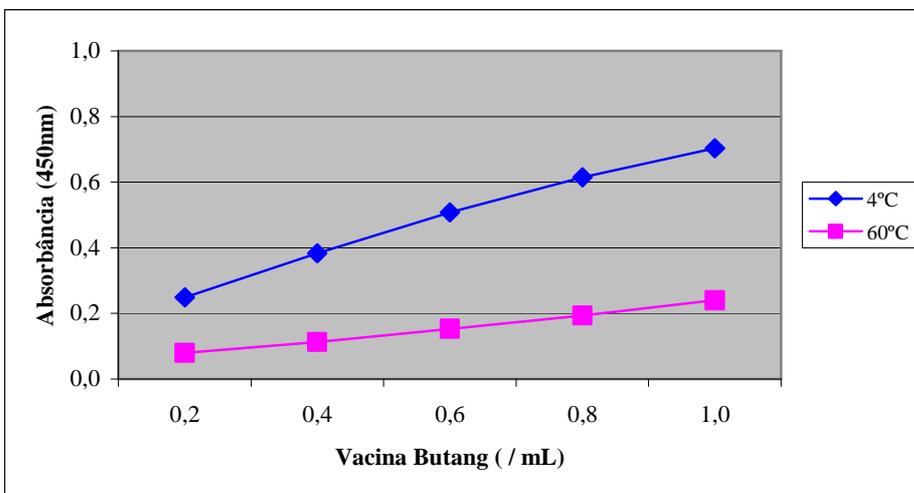
**B**



C



D



Resumidamente as condições estabelecidas como ótimas foram: revestimento da placa com o MAb CG2 de captura com a concentração de 8µg/mL, saturação da placa com solução de PBS contendo BSA a 3%, concentrações de vacinas (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/mL), incubação com conjugado, o MAb AG9- ligado à peroxidase titulado (1:2500), revelação com tampão substrato, lavagens com solução de PBS/Tween 20, tempo de incubação da placa durante 60 minutos, temperatura de incubação da placa a 37°C e agitação da placa a 63 x g.

## 5.4. Validação do ELISA para detecção de HBsAg em amostras vacinais

### 5.4.1. Resumo dos resultados da validação

Como nosso interesse era empregar uma condição em comum que permitisse a melhor detecção de HBsAg de todas as vacinas analisadas, decidimos optar pelas condições obtidas pelas variáveis que demonstraram os melhores resultados na fase de padronização do ensaio. Os resultados obtidos com o ensaio padronizado foram usados na validação (Anexo 1B).

### 5.4.2. Especificidade.

Foram avaliadas as especificidades através das amostras de vacinas combinadas (DTP+Hib+HB) e DTP+ Hib sem HB utilizada para a padronização método. O MAb CG2 utilizado como captura mostrou reatividade para a vacina Quinvaxem (DTP+HepB+Hib), e não reagiu com os outros antígenos. Foram encontradas diferenças significativas entre as amostras avaliadas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 3. Especificidade do ELISA**

Vacinas	Concentração (ng/mL) / Média das DO				
	200ng/mL	400ng/mL	600ng/mL	800ng/mL	1000ng/mL
<b>Quinvaxem DTP+HepB+Hib</b>	0,436	0,684	0,775	0,836	0,894
<b>DTP+Hib</b>	0,060	0,059	0,061	0,063	0,064
<b>PBS*</b>	0,059	0,059	0,060	0,062	0,063

- controle negativo

### 5.4.3. Linearidade

As tabelas 4 a 8 representam os resultados estatísticos gerados através dos resultados obtidos no ELISA com diferentes amostras de vacinas (três lotes de cada) realizadas

separadamente, por dois diferentes analistas. As linearidades da precisão da curva foram verificadas através dos coeficientes de determinação  $R^2$ , próximos de 1, que representam a estimativa da regressão linear. Todos os coeficientes obtidos foram acima de 0,99 para todas as análises. O uso da estatística para avaliação da variância (teste com falta de ajuste) mostrou valores dentro do limite de aceitação para o ensaio,  $p < 0,05$  para o coeficiente angular não nulo e  $p > 0,05$  para reta.

**Tabela 4 (A1-A4). Resultados de linearidade da vacina Euvax.**

**A1**

Parâmetros de Avaliação EUVAX	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2
Coefficiente de Correlação (r)	0,9970	0,9964	0,9961	0,9908	0,9925	0,9970
Coefficiente Angular (b)	0,0004	0,0005	0,0005	0,0004	0,0004	0,0004
Coefficiente Linear (a)	0,2680	0,2406	0,2375	0,2787	0,3040	0,2806

**ANOVA - Análise da Variância (com teste de falta de ajuste).**

**A2**

ANOVA		Lote 1				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,27367117	0,2736712	497,61978	9,53824E-12	<b>p &lt; 0,05: coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,007149485	0,00055			
lack-of-fit	3	0,001621281	0,0005404	0,9775819	0,44149908	<b>p &gt;= 0,05: reta ok</b>
erro puro	10	0,005528204	0,0005528			
total	14	0,280820656				

**A3**

ANOVA		Lote 2				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,3090675	0,3090675	474,12044	1,29629E-11	<b>p &lt; 0,05: coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,008474381	0,0006519			
lack-of-fit	3	0,002425	0,0008083	1,3360904	0,317177467	<b>p &gt;= 0,05: reta ok</b>
erro puro	10	0,006050	0,000605			
total	14	0,317541881				

**A4**

ANOVA		Lote 3				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,217600833	0,2176008	402,79811	3,63486E-11	<b>p &lt; 0,05: coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,0070229	0,0005402			
lack-of-fit	3	0,003294	0,0010981	2,944961	0,085095192	<b>p &gt;= 0,05: reta ok</b>
erro puro	10	0,003729	0,0003729			
total	14	0,224623733				

**Tabela 5 (A1-A4) . Resultados de linearidade da vacina Hepavax-gene.**

**A1**

Parâmetros de Avaliação HEPAVAX-GENE	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>	0,9983	0,9958	0,9942	0,9987	0,9987	0,9965
<b>Coefficiente Angular (b)</b>	0,0004	0,0005	0,0004	0,0005	0,0005	0,0005
<b>Coefficiente Linear (a)</b>	0,2873	0,2470	0,2702	0,2557	0,2241	0,2447

**ANOVA - Análise da Variância (com teste de falta de ajuste)**

**A2**

ANOVA		Lote 1				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,276288033	0,276288	1307,5135	1,9692E-14	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,002747004	0,0002113			
<i>lack-of-fit</i>	3	0,000918707	0,0003062	1,6749791	0,234732726	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
erro puro	10	0,001828296	0,0001828			
total	14	0,279035037				

**A3**

ANOVA		Lote 2				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,326772033	0,326772	1735,5217	3,17175E-15	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,0024477	0,0001883			
<i>lack-of-fit</i>	3	0,000794	0,0002648	1,6015457	0,250286112	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
<i>erro puro</i>	10	0,001653	0,0001653			
total	14	0,329219733				

**A4**

ANOVA		Lote 3				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,364541633	0,3645416	1637,4836	4,61606E-15	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,0028941	0,0002226			
<i>lack-of-fit</i>	3	0,000892	0,0002974	1,485348	0,277369245	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
<i>erro puro</i>	10	0,002002	0,0002002			
total	14	0,367435733				

**Tabela 6 (A1-A4) . Resultados de linearidade da vacina Engerix-B**

**A1**

Parâmetros de Avaliação ENGERIX-B	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2
Coefficiente de Correlação (r)	0,999	0,9979	0,9974	0,9915	0,9964	0,9953
Coefficiente Angular (b)	0,0005	0,0005	0,0004	0,0005	0,0004	0,0005
Coefficiente Linear (a)	0,2582	0,2052	0,3029	0,2441	0,2733	0,2170

**ANOVA - Análise da Variância (com teste de falta de ajuste)**

**A2**

ANOVA		Lote 1				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,316555648	0,3165556	1868,5209	1,96903E-15	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,002202396	0,0001694			
lack-of-fit	3	0,000493433	0,0001645	0,962442	0,447803272	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
erro puro	10	0,001708963	0,0001709			
total	14	0,318758044				

**A3**

ANOVA		Lote 2				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,2566875	0,2566875	1002,6153	1,08627E-13	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,003328233	0,000256			
lack-of-fit	3	0,001306233	0,0004354	2,1533685	0,156876168	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
erro puro	10	0,002022	0,0002022			
total	14	0,260015733				

**A4**

ANOVA		Lote 3				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,2840187	0,2840187	947,77398	1,55876E-13	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,0038957	0,0002997			
lack-of-fit	3	0,002024367	0,0006748	3,6059257	0,053534513	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
erro puro	10	0,001871333	0,0001871			
total	14	0,2879144				

**Tabela 7 (A1 – A4) . Resultados de linearidade da vacina Butang**

**A1**

Parâmetros de Avaliação BUTANG	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2
Coefficiente de Correlação (r)	0,9952	0,999	0,9960	0,999	0,9951	0,999
Coefficiente Angular (b)	0,0004	0,0004	0,0005	0,0005	0,0004	0,0004
Coefficiente Linear (a)	0,1753	0,1789	0,1563	0,1629	0,1758	0,1852

**ANOVA - Análise da Variância (com teste de falta de ajuste)**

**A2**

ANOVA	Lote 1					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,2875323	0,2875323	1162,4934	4,19679E-14	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,003215433	0,0002473			
<i>lack-of-fit</i>	3	0,000906	0,000302	1,3078811	0,325403812	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
<i>erro puro</i>	10	0,002309	0,0002309			
total	14	0,290747733				

**A3**

ANOVA	Lote 2					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,322196033	0,322196	3451,0575	3,72101E-17	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,0012137	9,336E-05			
<i>lack-of-fit</i>	3	0,000086	2,857E-05	0,2532506	0,857291911	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
<i>erro puro</i>	10	0,001128	0,0001128			
total	14	0,323409733				

**A4**

ANOVA	Lote 3					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,2645163	0,2645163	2767,278	1,55441E-16	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,001242633	9,559E-05			
<i>lack-of-fit</i>	3	0,000497	0,0001655	2,2190944	0,148726512	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
<i>erro puro</i>	10	0,000746	7,46E-05			
total	14	0,265758933				

**Tabela 8 (A1-A4) . Resultados de linearidade da vacina Quinvaxem**

**A1**

Parâmetros de Avaliação QUINVAXEM	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2	Anal. 1	Anal. 2
Coefficiente de Correlação (r)	0,9968	0,9967	0,9997	0,9985	0,9992	0,9993
Coefficiente Angular (b)	0,0004	0,0005	0,0005	0,0005	0,0004	0,0005
Coefficiente Linear (a)	0,3500	0,3579	0,3074	0,3489	0,3617	0,3307

**ANOVA - Análise da Variância (com teste de falta de ajuste)**

**A2**

ANOVA		Lote 1				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,319094533	0,3190945	977,24956	1,28056E-13	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	<b>0,0042448</b>	<b>0,0003265</b>			
lack-of-fit	3	0,0021068	0,0007023	3,2846897	0,066725884	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
erro puro	10	0,002138	0,0002138			
<i>total</i>	14	0,323339				

**A3**

ANOVA		Lote 2				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	0,309880033	0,30988	1675,4684	3,98113E-15	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	<b>0,002404367</b>	<b>0,000185</b>			
lack-of-fit	3	0,0009217	0,0003072	2,0721673	0,167675837	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
erro puro	10	0,001482667	0,0001483			
<i>total</i>	14	0,312284				

**A4**

ANOVA		Lote 3				
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p	
regressão	1	<b>0,328025633</b>	<b>0,3280256</b>	<b>2175,7172</b>	<b>7,36452E-16</b>	<b>p&lt;0,05:coef. angular não nulo: ok</b>
resíduos	13	0,001959967	0,0001508			
lack-of-fit	3	0,000455967	0,000152	1,0105644	0,428090364	<b>p&gt;=0,05:reta ok</b>
<i>erro puro</i>	10	0,001504	0,0001504			
<i>total</i>	14	0,329986				

#### 5.4.4. Precisão

##### 5.4.4.1 Repetibilidade (precisão intraensaio)

Todos os resultados obtidos no ELISA com as médias dos três lotes de cada vacina (Euvax, Engerix-B, Hepavax-gene, Butang e Quinvaxem) apresentaram CVs variando de 2 a 3% para todas as vacinas utilizadas, menores que 10% (Tabela 9).

**Tabela 9. Resultados de Repetibilidade (precisão intraensaio)**

<b>Repetibilidade (média das triplicatas)</b>		
<b>Vacina</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)*</b>
<b>Euvax</b>		
<b>Lote 1</b>	0,019	3,5
<b>Lote 2</b>	0,018	2,8
<b>Lote 3</b>	0,024	2,6
<b>Engerix-B</b>		
<b>Lote 1</b>	0,011	2,2
<b>Lote 2</b>	0,012	2,3
<b>Lote 3</b>	0,010	2,2
<b>Hepavax-gene</b>		
<b>Lote 1</b>	0,012	2,2
<b>Lote 2</b>	0,013	2,3
<b>Lote 3</b>	0,012	2,2
<b>Butang</b>		
<b>Lote 1</b>	0,010	2,5
<b>Lote 2</b>	0,010	2,1
<b>Lote 3</b>	0,010	2,3
<b>Quinvaxem</b>		
<b>Lote 1</b>	0,013	2,0
<b>Lote 2</b>	0,014	2,1
<b>Lote 3</b>	0,013	2,0

\* Desvio padrão e CV% das médias das triplicatas de cada lote, limite de CV(%) <10

##### 5.4.4.2. Reprodutibilidade (precisão interensaio).

Todos os resultados obtidos com as médias dos três lotes de cada vacina (Euvax, Engerix-B, Hepavax-gene, Butang e Quinvaxem) apresentaram CVs de 2 a 5 (%) menores que 20% (Tabela 10).

**Tabela 10. Resultados de Precisão intermediária (precisão interensaio)**

<b>Reprodutibilidade (média das triplicatas)</b>		
<b>Vacina</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)*</b>
<b>Euvax</b>		
<b>Lote 1</b>	0,010	2,6
<b>Lote 2</b>	0,018	3,9
<b>Lote 3</b>	0,014	2,7
<b>Engerix-B</b>		
<b>Lote 1</b>	0,017	4,0
<b>Lote 2</b>	0,021	4,2
<b>Lote 3</b>	0,017	4,1
<b>Hepavax-gene</b>		
<b>Lote 1</b>	0,013	3,0
<b>Lote 2</b>	0,014	2,5
<b>Lote 3</b>	0,010	2,0
<b>Butang</b>		
<b>Lote 1</b>	0,010	3,0
<b>Lote 2</b>	0,010	5,8
<b>Lote 3</b>	0,015	3,2
<b>Quinvaxem</b>		
<b>Lote 1</b>	0,014	1,8
<b>Lote 2</b>	0,013	2,4
<b>Lote 3</b>	0,010	2,0

\* Desvio padrão e CV% das médias das triplicatas de cada lote, limite de CV(%) <20

#### 5.4.5. Limite de Detecção-LD

O valor de absorbância encontrado como limite de detecção foi aproximadamente 0,076 (Tabela 11). Foram também realizados ensaios utilizando para a sensibilização o MAb anti-interferon beta 1a, frente amostras de vacinas contra a hepatite B e os resultados foram todos iguais aos encontrados com o controle negativo (PBS) sem sinal de reatividade (dados não mostrados).

**Tabela 11. Limite de Detecção-LD do ensaio.**

<b>Amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>LD*</b>
<b>PBS</b>	0,064	0,004	0,076

\*LD= X+3DP

\*(LD) Limite de detecção, X= média , (DP) Desvio Padrão

#### 5.4.6. Limite de Quantificação-LQ

A titulação das diversas vacinas mostrou que a concentração que dá uma DO igual ou superior a 0,2 corresponde a 0,2µg/mL conforme (Tabela 12).

**Tabela 12 – Limite de Quantificação-LQ do ensaio.**

Amostra	Média	Desvio padrão (DP)	LQ
PBS	0,064	0,004	0,104

\*LD= X+10DP

\*(LD) Limite de detecção, X= média , (DP) Desvio Padrão

#### 5.4.7. Avaliação da Exatidão

Foram encontrados coeficientes de variações de 2 a 15% e valor de exatidão de 84 a 110% nas diferentes concentrações para cada lote de vacina analisada (Tabelas 13 A1-E3).

**Tabela 13 (A1-E3). Resultados da Exatidão  
A1**

Euvax - Lote 1 Diluição	Conc. ng/mL	Concentração (ng)/mL			CV%	Exatidão %
		1	2	3		
1	200	223,99	184,20	204,09	9,75	102
2	400	433,39	399,88	416,64	4,02	104
3	600,0	619,75	538,09	516,45	9,76	93
4	800,0	787,27	915,01	750,28	10,57	102
5	1000,0	1017,61	967,36	1025,99	3,16	100
					Média	100

#### A2

Euvax - Lote 2 Diluição	Conc. ng/mL	Concentração (ng)/mL			CV%	Exatidão %
		1	2	3		
1	200	218,32	220,67	253,54	8,53	115
2	400	314,60	321,64	378,00	10,28	85
3	600,0	601,10	676,24	626,93	6,01	106
4	800,0	831,23	777,22	770,18	4,21	99
5	1000,0	913,42	1042,58	1054,32	7,79	100
					Média	101

**A3**

<b>Euvax - Lote 3</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng)/mL</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200,00	233,59	253,75	220,16	7,17	118
2	400,00	392,61	370,21	428,44	7,40	99
3	600,00	511,31	520,27	553,86	4,24	88
4	800,00	836,06	809,18	780,07	3,46	101
5	1000,00	1053,30	959,24	1077,94	6,08	103
					Média	102

**B1**

<b>Hepavax-gene Lote 1</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng)/mL</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	207,73	211,90	179,95	8,69	100
2	400	397,38	391,13	360,57	5,14	96
3	600,0	634,97	597,45	659,28	4,94	105
4	800,0	807,94	805,86	757,23	3,63	99
5	1000,0	957,99	1035,10	995,51	3,87	100
					Média	100

**B2**

<b>Hepavax-gene Lote 2</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng)/mL</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	149,26	159,38	195,82	14,56	84
2	400	448,85	418,49	454,93	4,43	110
3	600,0	596,63	659,38	608,77	5,35	104
4	800,0	776,79	760,59	748,45	1,87	95
5	1000,0	1037,92	963,02	1021,73	3,91	101
					Média	99

**B3**

<b>Hepavax-gene Lote 3</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng)/mL</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Ponto</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	188,39	206,53	213,79	6,45	101
2	400	402,48	371,64	373,45	4,52	96
3	600,0	643,79	603,87	625,64	3,20	104
4	800,0	832,48	763,53	779,86	4,55	99
5	1000,0	959,48	1015,72	1019,35	3,36	100
					Média	100

**C1**

<b>Engerix Lote 1</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	184,51	211,77	185,81	7,92	97
2	400	422,04	390,89	438,27	5,77	104
3	600,0	603,12	564,18	610,90	4,22	99
4	800,0	758,88	813,39	789,38	3,47	98
5	1000,0	973,04	1017,83	1036,00	3,21	101
					Média	100

**C2**

<b>Engerix Lote 2</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	164,40	183,86	205,48	11,13	92
2	400	423,86	393,59	371,96	6,57	99
3	600,0	633,59	668,18	616,29	4,13	107
4	800,0	813,05	821,69	746,02	5,22	99
5	1000,0	1014,13	996,83	947,10	3,53	99
					Média	99

**C3**

<b>Engerix Lote 3</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	215,21	225,49	184,38	10,27	104
2	400	428,98	412,54	383,76	5,60	102
3	600,0	529,70	576,98	562,59	4,36	93
4	800,0	794,86	846,25	844,19	3,51	104
5	1000,0	1023,02	953,13	1018,91	3,93	100
					Média	100

**D1**

<b>Butang Lote 1</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200,00	199,72	178,42	176,29	7,01	92
2	400,00	406,32	434,01	419,10	3,30	105
3	600,00	576,71	610,79	604,40	3,03	100
4	800,00	798,23	796,10	825,91	2,06	101
5	1000,00	962,23	1015,48	996,31	2,72	99
					Média	99

**D2**

<b>Butang Lote 2</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	202,63	179,31	209,81	8,08	99
2	400	390,97	412,50	416,08	3,34	102
3	600,0	609,81	616,98	582,90	2,98	101
4	800,0	796,35	799,94	758,68	2,91	98
5	1000,0	1004,42	1036,71	982,90	2,69	101
					Média	100

**D3**

<b>Butang Lote 3</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	177,44	203,14	183,86	7,11	94
2	400	413,07	387,36	378,79	4,54	98
3	600,0	678,69	661,55	633,70	3,45	110
4	800,0	783,65	800,79	843,63	3,82	101
5	1000,0	1002,14	944,31	993,57	3,19	98
					Média	100

**E1**

<b>Quinvaxem Lote 1</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	167,20	203,49	185,35	9,79	93
2	400	407,12	415,19	368,82	6,24	99
3	600,0	600,67	643,01	610,75	3,58	103
4	800,0	804,30	850,67	838,58	2,89	104
5	1000,0	949,46	997,85	957,53	2,68	97
					Média	99

**E2**

<b>Quinvaxem Lote 2</b>	<b>Conc.</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>			<b>CV%</b>	<b>Exatidão</b>
<b>Diluição</b>	<b>ng/mL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>%</b>
1	200	215,11	184,28	200,60	7,71	100
2	400	392,87	378,36	407,38	3,69	98
3	600,0	612,33	581,50	635,91	4,47	102
4	800,0	831,80	766,51	806,41	4,11	100
5	1000,0	973,28	1014,99	998,67	2,11	100
					Média	100

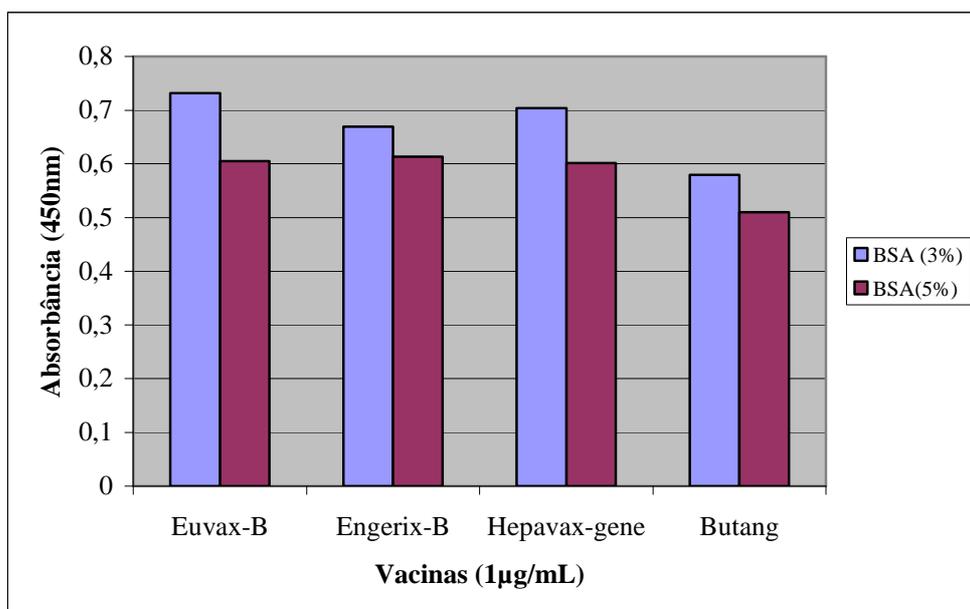
### E3

Quinvaxem Lote 3 Diluição	Conc. ng/mL	Concentração (ng)/mL			CV%	Exatidão %
		1	2	3		
1	200	180,01	212,65	226,93	11,65	103
2	400	379,94	422,78	396,26	5,41	100
3	600,0	539,07	612,51	590,07	6,48	97
4	800,0	800,20	798,16	843,05	3,11	102
5	1000,0	1002,18	949,13	1047,06	4,90	100
					Média	100

#### 5.4.8. Robustez

Os resultados encontrados com a utilização da solução de saturação (PBS contendo BSA a 3%) foram superiores a solução de saturação a 5%, para todas as vacinas. Entretanto, essa diferença não foi significativa para nenhuma das vacinas ( $p > 0,05$ ).

**Figura 24. Resultados da robustez variando a concentração do BSA no tampão de saturação (PBS/BSA)**



## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação de um ensaio ELISA *in house* do tipo “sanduíche” com o uso de anticorpos monoclonais anti-HBsAg usados como anticorpo de captura e como anticorpo detector, produzidos pelo LATAM- Biomanguinhos pelo método convencional para ser utilizado nas avaliações de potências das vacinas contra a hepatite B. O ELISA é um ensaio usado para uma variedade de análises, devido à sua alta sensibilidade e versatilidade (ENGVALL & PERLMAN, 1971; ENGVALL, et al., 1971; HAGE, 1999; BORREBALCK, 2000). O desenvolvimento de um ensaio ELISA como o pretendido neste projeto envolve passos que incluem: imobilização do anticorpo, saturação, lavagem e incubação com o Ag, lavagem, incubação com o conjugado (anticorpo ligado à enzima), lavagem, substrato mais cromógeno e a intensidade da cor desenvolvida é proporcional à concentração de Ag que se liga ao anticorpo de captura ligado na fase sólida.

Nos ensaios iniciais para a padronização, a principal avaliação foi com relação à escolha do MAb a ser usado como anticorpo de captura através da avaliação das reatividades dos MAbs com o HBsAg das diferentes vacinas cuja potência deve ser avaliada.

A descrição de ensaios ELISA direcionados para quantificação de HBsAg de vacinas recombinantes contra a hepatite B de diferentes produtores são limitadas a poucas publicações (GIFFROY, et al., 2006; CUERVO & HUERTA, 2002; CUERVO & YANES, 2004; CUERVO, et al., 2008). Ambos grupos, desenvolveram um ensaio de inibição, medindo o conteúdo de HBsAg indiretamente, usando anticorpo policlonal humano anti-HBs, com uso de amostras de HBsAg adsorvidas ao hidróxido de alumínio (adjuvante). Ensaios esses, que diferem em alguns parâmetros da nossa proposta de desenvolvimento de ensaio ELISA, onde foram usados MAb para captura e detecção, obtidos através da imunização de camundongos a partir do *pool* de plasma humano contendo os subtipos do HBsAg *ayw3* e *adw2*, mais comumente encontrados no Brasil, previamente caracterizados produzidos pelo LATAM (VIANNA, et al., 2006). Por isso, a comparação dos resultados obtidos nesse estudo com os de outros pesquisadores acaba sendo dificultada.

## **6.1. Padronização do ensaio *in house* para HBsAg**

### **6.1.1 Antígeno**

As vacinas recombinantes contra a hepatite B avaliadas são compostas somente de proteína *small S* de um dos subtipos de HBsAg conforme mostrado no quadro 2 (*adw2* ou *adr*).

### **6.1.2. Controles**

Foram utilizados inicialmente como controle positivo uma amostra de soro humano positivo para HBsAg, subtipo desconhecido e como controle negativo um soro humano HBsAg negativo obtidos de *kit* comercial para detecção de HBsAg em amostras clínicas.

Durante a fase de otimização outros reagentes foram sendo avaliados e conforme os resultados encontrados, o PBS foi selecionado como controle negativo e não usamos mais o controle positivo pelo fato de não existir um controle positivo recombinante (uma vacina de referência internacional) para ser usado como referência para as amostras de HBsAg das vacinas de diferentes produtores.

### **6.1.3. Saturação e diluição**

Vários reagentes, classicamente utilizados em ensaio ELISA, usados como bloqueadores de reações inespecíficas, foram avaliados em diferentes concentrações e combinações como tampão de saturação ou como diluentes de amostras e do conjugado. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se como solução de saturação, PBS contendo 3% de BSA, pois a inclusão de BSA na solução é uma estratégia comum para a eliminação de alguns tipos de interferência analítica (KRICKA, 1999). Como diluente das amostras de vacinas e do conjugado anti HBs (AG9-HRP) usamos o PBS e para solução de lavagem PBS-T 0,05%. A utilização de MAbs purificados provavelmente contribuíram para a redução das inespecificidades.

### **6.1.4. HBsAg das vacinas**

A pureza dos diferentes subtipos de HBsAg das vacinas utilizadas foi confirmada pela análise do SDS-PAGE em condições redutoras apresentando cada agente vacinal uma banda de

aproximadamente 24 kDa como esperado para monômeros de HBsAg e em algumas amostras apresentando, também, uma banda de 46 kDa, correspondente ao tamanho de dímeros de HBsAg (HYUK-SEONG, et al., 2008). As bandas de 24 kDa foram confirmadas no *Western blot* através de anticorpo anti-HBsAg e as formas diméricas apresentadas no SDS-PAGE aparecem devida à redução parcial da partícula. A análise e a caracterização de partículas de HBsAg sintetizadas usando a levedura metilotrófica *Hansenula polymorpha* mostra que dentro de condições redutoras podem estar presentes moléculas monômeras, dímeras ou trímeras pela força intermolecular das pontes dissulfídicas entre os monômeros (HYUK-SEONG, et al., 2008), a qual difere de partículas sintetizadas em *S. cerevisiae*. A formação de pontes dissulfídicas entre moléculas de HBsAg são mais ativas em *Hansenula polymorpha* (DIMINSKY, et al 1997).

#### **6.1.5. MAb para HBsAg das vacinas**

Nesse trabalho foram utilizados oito MAbs específicos para HBsAg caracterizados como sendo da subclasse IgG1. O isotipo IgG1 tem sido a subclasse mais encontrada a nível celular em humanos e em modelos de camundongos (SHOKRGOZAR & SHOKRI, 2002). Durante a fase inicial da padronização todos os oito MAbs avaliados foram específicos para o HBsAg das vacinas analisadas, entretanto, diferenças de reatividades foram encontradas entre cada vacina analisada. O HBsAg das cinco vacinas utilizadas dos diferentes produtores foram produzidas em diferentes leveduras (*S. cerevisiae*, *H. polymorpha* e *P. pastoris*).

#### **6.1.6. Especificidade**

As amostras sem o HBsAg não mostraram reatividade, o que podemos considerar que este método de ensaio é específico. A alta pureza do MAb utilizado para a sensibilização, da placa sem presença de outros componentes protéicos indefinidos também contribui para especificidade.

Os resultados obtidos na robustez demonstraram que pequenas modificações no ensaio não levam a variações consideráveis.

Todos os oito MAbs mostraram reatividades, entretanto, três MAbs (CH6, CH7 e CG2) mostraram afinidades superiores aos outros MAbs para todas as amostras de HBsAg analisadas. Entretanto, dos três MAbs selecionados, o CG2 mostrou ser mais específico para o HBsAg de

todas as vacinas. Nenhuma diferença significativa foi observada quando usamos os MAb sozinho ou em combinação (CH6, CH7 e CG2) para a estimativa da quantidade de HBsAg.

#### **6.1.7. Adjuvante**

A estimativa direta do HBsAg nas amostras complexadas ao hidróxido de alumínio não foi efetiva, devido à queda nos valores de absorvância. As reatividades foram muito melhores quando realizada a retirada do hidróxido de alumínio, usado nestas vacinas como adjuvante complexado ao HBsAg para estimulação contínua do sistema imunitário (GLENNY, et al., 1926; WHITE, 1967; GUPTA, 1998).

#### **6.1.8. Incubação**

O procedimento de agitação das microplacas a 63 x g foi muito importante para a melhora dos resultados devido provavelmente, à ocorrência de melhor interação entre o MAb e o HBsAg das amostras de vacinas ou devido a proporcionar uma distribuição mais homogênea dos reagentes ligantes (GIFFROY, et al., 2006). As sensibilidades obtidas com o tempo de incubação de 120 minutos, quando comparados aos outros tempos avaliados (60 e 90 minutos), foram superiores para todas as vacinas. Entretanto, mesmo sendo significativas as diferenças encontradas, o tempo de 60 minutos foi o escolhido durante o processo de padronização porque todas as vacinas analisadas contêm 20µg/mL de HBsAg e portanto pequenas diferenças na sensibilidade do teste não impactam na proposta do uso do ELISA.

#### **6.1.9. Armazenamento**

O ELISA foi capaz de detectar alterações ocorridas com a situação de estresse induzida pela manutenção das amostras de vacinas a 60°C por uma semana, levando à redução da reatividade com o HBsAg de algumas vacinas, como a Butang. Essa redução pode ter sido causada pela desnaturação da molécula da proteína HBsAg. Entretanto, essa variação não foi observada para a vacina Euvax, talvez por uma maior estabilidade das partículas de HBsAg.

A estabilidade do MAb foi avaliada no dia “zero” e seis meses após estocagem a duas temperaturas diferentes (4°C e -20°C) e a comparação dos resultados mostraram que as reatividades encontradas com o uso da temperatura de 4°C por seis meses e o as obtidas no dia “zero” foram semelhantes para as vacinas Euvax-B, Hepavax-gene e Butang.

A reatividade obtida a 4°C foi superior à encontrada no ensaio do dia “zero” para vacina Engerix B, porém não significativa indicando que um período maior de recobrimento da placa poderia ser usado. Também indica que a estocagem por período de 6 meses a 4°C é perfeitamente adequada para o armazenamento das placas do kit *in house* produzido.

A estocagem das placas recobertas com o MAb CG2 estabilizadas em tampão de estabilização indicou ótima estabilidade das placas. Ensaio para avaliar a estabilidade dessas placas por períodos maiores, que fogem à alçada desta tese, serão realizados. Os resultados indicam que o kit *in house* para o HBsAg atende todas as exigências para uso contínuo de lotes preparados semestralmente.

Os resultados encontrados com o uso de amostras de vacinas combinadas mostraram que o ELISA proposto pode medir especificadamente o HBsAg na presença de outros antígenos como no caso do uso de vacinas combinadas. A vacina contra a Hepatite B é atualmente aplicada em combinação com as vacinas para *Haemophilus influenza* tipo b, vacina tríplice (D,T e coqueluche) e é necessária a quantificação do HBsAg em uma mistura de 4 outras proteínas, complexadas ao hidróxido de alumínio. O teste feito verificou ser específico para o HBsAg, que não houve interferência das outras proteínas, após retirada do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>.

#### **6.1.10. Comparação do ensaio *in house* com os ensaios comerciais**

Embora a sensibilidade do ensaio *in house* tenha sido menor que a dos kits comerciais, a base do teste tendo sido estabelecida, a melhoria na sensibilidade, poderia ser através das mudanças de alguns parâmetros tais como, a ligação covalente do Ac de captura à placa (usando sistema avidina –biotina, p.ex.) e talvez a introdução de mais uma etapa no ensaio usando conjugado policlonal,, produzindo um policlonal anti HBsAg p. ex., em coelho e usar conjugado anti-coelho IgG-HRP. Esses resultados subsidiariam na continuidade do desenvolvimento de um kit com ampla aplicação para o país.

#### **6.1.11. Validação do ensaio *in house***

Estudos de validação foram conduzidos seguindo os seguintes parâmetros: Especificidade, Limite de Detecção-LD (sensibilidade), Limite de Quantificação-LQ, Linearidade, Precisão, Exatidão e Robustez (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001; ANVISA, 2003). As características de desempenho do ensaio foram satisfatórias para todas as vacinas analisadas.

#### **6.1.12. Limite de Detecção - LD**

Para a avaliação da estimação do limite de detecção se observou que a absorbância mínima detectada para cada uma das repetições da amostra supostamente negativa “branca” foi baixa, indicando pouca inespecificidade, geralmente ocasionada por componentes secundários ou contaminantes dos reagentes usados. O limite de detecção foi calculado adicionando o valor médio de absorbância da amostra “branca” à triplicata do desvio padrão (0,076). O resultado mostrou que o ensaio ELISA é capaz de detectar quantidades mínimas de HBsAg pela reação com MAb CG2.

#### **6.1.13. Limite de Quantificação - LQ**

O limite de quantificação foi calculado pela soma do valor médio do valor de absorbância DO da amostra “branca” a dez desvios padrão 0,104. O limite de detecção permitiu a determinação de concentração 100 vezes menor da usada para a vacina.

#### **6.1.14. Linearidade do ensaio**

As linearidades avaliadas através dos coeficientes de determinação  $R^2$  próximos do valor de 1,0, representando a estimativa da regressão linear, foram todas acima de 0,99, para os diferentes analistas, resultado dentro do limite de aceitação usado para a definição da mesma faixa de concentração de trabalho para todas as cinco vacinas analisadas.

#### **6.1.15. Precisão intraensaio**

As precisões intraensaios avaliadas pela análise dos resultados obtidos com as repetibilidades dos ensaios ELISA recomendam que o valor do desvio padrão não deve exceder a 10%, do valor da amostra. Dentro desse critério, o ensaio avaliado mostrou-se satisfatório para as concentrações dentro da faixa de trabalho selecionada (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1µg/mL) para todas as vacinas.

#### **6.1.16. Precisão interensaio**

Os resultados encontrados com as amostras de três lotes de cada uma vacina usadas na avaliação da precisão interensaio (reprodutibilidade) mostraram coeficientes de variação-CVs menores que 10%. O CV para esse parâmetro não deve exceder a 20%. Estes resultados estão dentro do limite de aceitação para o ensaio desse tipo, considerados altamente satisfatórios ((INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001; ANVISA, 2003).

Pelos resultados obtidos é possível concluir que a variabilidade dos resultados foi devida, basicamente, às características das vacinas e à execução do ensaio. De acordo com Ward e Morgan (1991), os principais fatores que podem diminuir a precisão dos ensaios ELISA incluem: pipetagem, preparações dos reagentes imprecisas, erros no procedimento da análise, diferenças no revestimento dos anticorpos na fase de sensibilização e a diferença entre os reagentes usados.

Como os CVs foram menores que 15% para todas as vacinas avaliadas, podemos considerar que o ensaio desenvolvido mede a concentração real do HBsAg presente na amostra, dentro de um erro experimental. A exatidão depende da reação imunoenzimática, da amostra em estudo e a especificidade do método.

## 7. CONCLUSÃO

A utilização contínua e dispendiosa de kits comerciais para o ensaio ELISA para quantificação do HBsAg de amostras clínicas adaptados para o controle da potência de vacinas contra a hepatite B pelo INCQS, levou ao estabelecimento de um ELISA *in house* utilizando MAbs produzidos por BioManguinhos. O HBsAg contido nas vacinas contra a hepatite B monovalentes ou em vacinas combinadas com outros antígenos, pode ser quantificado por ensaio ELISA como uma opção metodológica que pode substituir os ensaios *in vivo* (camundongos).

Para permitir o uso de um ensaio ELISA *in house* para HBsAg com qualidade comparável à dos *kits* comerciais, vários parâmetros devem ser avaliados. O trabalho apresentado permite as seguintes conclusões:

### 1. Padronização do ensaio

- 1.1. Escolha da placa Maxisorb
- 1.2. Escolha do MAb CG2 como anticorpo de captura
- 1.3. Escolha da concentração do MAb de captura
- 1.4. Condições para incubação
  - 1.4.1. Tempo: 60 min é suficiente
  - 1.4.2. Agitação 63 x g aumenta a sensibilidade do ensaio
- 1.5. Preparação dos antígenos: retirada do Al(OH)<sub>3</sub>
- 1.6. Concentração ideal do conjugado

### 2. Qualidade do ensaio produzido

- 2.1. Especificidade boa
- 2.2. Linearidade satisfatória
- 2.3. Precisão satisfatória
- 2.4. Limite de detecção muito bom
- 2.5. Exatidão boa
- 2.6. Robustez adequada

## 2.7. Estabilidade na estocagem ótima

O ELISA para avaliação da potência das vacinas contra a hepatite B foi estabelecido e validado com sucesso.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Report of the Committee on Infectious Diseases. **Red Book**, 25ed., 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA (BRASIL). Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/index\\_re\\_mai.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/index_re_mai.htm). Acesso em 15 jul. 2008.

ALAN, K.; FABIEN, Z. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. **Virus Research**, v. 127, p. 164-176, 2007.

ANDRE, F.E. Summary of safety and efficacy data on a yeast-derived hepatitis B Vaccine. **Am. American Journal of Medicine**, Arizona, v.67, n. S3, p.14-20, 1989.

ARAUJO, N. M, et al. High proportion of subgroup A (genotype A) among brazilian isolates of hepatitis B virus. **Archives of Virology**, v.149, n.7, p.1383-1395, 2004.

ARAUZ-RUIZ, P, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **Journal of General Virology**, v.83, n.8, p.2059-2073, 2002.

BANKER, D.D. Viral hepatitis (part II). **Indian Journal of Medical Sciences**, v.57, n.9, p.415-424, 2003.

BENENSON, A.S. Control of communicable diseases in man. **American Public Health Association. Viral hepatitis**, p. 217-233, 1995.

BLUMBERG, B.S.; SUTNICK, A.L; LONDON, W.T. Hepatitis and leukemia: their relation to Australian antigen. **Bulletin of New York Academy of Medicine** v.44, n. 12, p. 1566-1586, 1968.

BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. 1965. A “New” antigen in Leukemia sera. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.191, n. 7, p. 541-546, 1965.

BORREBAECK, C.A.K. antibodies in diagnostics-from immunoassays to protein chips. **Immunology Today**, v.21, p.379-382, 2000.

BOWYER, S.M.; STADEN, L.V.; KEW, M.C.; SIM, J. G. M. A unique segment of the hepatitis B vírus group A genotype identified in isolates from South África. **Journal of General Virology**, v.78, p. 1719- 1729, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual dos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais, **Fundação Nacional de Saúde**, Brasília, p. 59-63, 2001.

\_\_\_\_\_, PNI 30 anos. **Programa Nacional de Imunizações**, Brasília, 2003.

\_\_\_\_\_, Avaliação da Assistência as Hepatites Virais no Brasil. **Programa Nacional de Hepatites Virais**, Brasília, p. 1-61, 2002.

BRASIL. Portaria n. 597 de 8 de abril de 2004. Institui, em todo território nacional, os calendários básico de vacinação. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, n. 69, 12 de maio de 2004. Seção 1.

CANTELLI, C.P. et al. Generation of Monoclonal Antibodies Against Human Recombinate Interferon Beta Using genetic Immunization with Simultaneous Expression of IgM and IgG Isotypes. **Hybridoma**, v.28, n.3, p.211-214. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Hepatitis B virus: A comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination (ACIP) Management. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.40, n. RR-13, p. 1-25, 1991.

\_\_\_\_\_, Update expanded availability of thimerosal preservative – free hepatitis B vaccine. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 28, p. 642-651, 2000.

\_\_\_\_\_, Guidelines for Viral hepatitis Surveillance and Case Management. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta p.1-43, 2002a.

CEREGHINO, G.P.L.; J.M. CREGG, J.M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology** , v. 10, n.5, p. 422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p.45-66, 2000.

CHISARI, F.V; FERRARI, C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 29-60, 1995.

COOPER, A; PARAN, N; SHAUL, Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. **Biochim Biophys Acta**, v.1614, p.89-96, 2003.

COUROUCÉ, A.M, et al. HBs antigen subtypes: Proceedings of the International Workshop on HBs antigen subtypes. **Bibliotheca Haematologica**, v. 42, p.1-158, 1976.

COUROUCÉ-PAUTY, A.M; LEMAIRE, J.M.; ROUX, J.F. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the *ad* category. **Vox Sanguinis**, v.35, p. 304-308, 1978.

CUERVO, M.L.; HUERTA, N.R. Validation of an In vitro Potency Test for the Cuban hepatitis B Vaccine. **Developments in Biological, Basel. Karger**, v.111, p.305-312, 2002.

CUERVO, M.L.C.; YANES, A. F. C. Comparison between in vitro potency tests for Cuban Hepatitis B vaccine: contribution to the standardization process. **Biologicals**, v. 32, p. 171-176, 2004.

CUERVO, M.L.C., et al. Validation of new alternative for determining in vitro potency in vaccines containing Hepatitis B from two different manufacturers. **Biologicals**, v. xx, p.1-8, 2008.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v.19, p.119-138, 2005.

DANE, D.S.; CAMERON, C.H; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. **Lancet**, v. 1, p. 695-698. 1970.

DE CASTRO, L. et al. Western-blot analysis of the reactivity between envelope proteins of hepatitis B viruses from Brazilian carriers and antibodies raised against recombinant hepatitis B vaccines. **Acta Virologica**, v.40, p. 251, 1996.

DELIUS, H., et al. Structure of the hepatitis B virus genome. **Journal of Virology**, Washington, v.47, n. 2, p. 337-343, 1983.

DESCAMPS, J.; MARY, A.; ROMMEL, E. Release potency tests of hepatitis vaccines. In : Brown, F.; HENDRILSEN, C.F.M.; SESARDIC, D (editors), Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. **Developments in Biological Standardization**, v. 101. p. 289-294,1999.

DEVESA, M., et al Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. **Journal Medical Virology**, v. 72, p. 377–384, 2004.

DIMINISKY, D. et al. Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. **Vaccine**, v.15, p.637-647, 1997.

DIMINSK, Y. et al. "Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. **Vaccine**, v. 18, n. 1-2, p. 3-17, 1999.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p.871-874, 1971.

ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. **Biochim Biophys Acta**, v. 251, p.427-434, 1971a.

FARMACOPÊIA Brasileira. **4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. pt. 2 fac. 5.**

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. **Center for Drug Evaluation and Research**, maio de 2001.

GALIBERT, F, et al. Nucleotide sequence of hepatitis B vírus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. **Nature**, v. 281, p. 646-650, 1979.

GALLE, P. R. et al. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis b virus. **Gastroenterology**, v.106,p. 665-673, 1994.

GANEM, D.; VARMUS, H.E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. **Annual Review of Biochemistry**, v.56, p. 651-694, 1987.

GASPAR, A.M.C.; YOSHIDA, C.F.T. Geografic distribution of HBsAg subtypes in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82 p.253-58, 1987.

GAVILLANES, F.; GONZALEZ-ROS, J.M.; PETERSON, D.C. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 7770-7777, 1982.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GELLISSEN, G. et al. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* a comparison. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 1079-1096, 2005.

GERIN, J. et al. Biophysical properties of Australian antigen. **Journal of Virology**, Washington, v.36, p. 787-795, 1980.

GERIN, J.L.; HOLLAND, P.W.; PURCELL, R.H. Australia antigen: large-scale purification from human serum and biochemical studies of its proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 7, p. 569-576, 1971.

GIFFROY, D.; MAZY, C.; DUCHENE, M. Validation of a new ELISA Method for *in vitro* Potency Assay of Hepatitis B-containing Vaccines. **Pharmeuropa Bio**, 2006-1.

GHANY, M; LIANG, T.J. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v.132, n.4, p.1574-1585, 2007.

GLENNY, A. T. et al. Antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **Journal of Pathology & Bacteriology**, v. 29, p. 38-45, 1926.

GRIPON, P. et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n.24, p.15655-15660, 2002.

GROB, P.J. Hepatitis B: virus, pathogenesis and treatment. **Vaccine**, v.16, Suppl. S11-16, 1998.

GROSHEIDE, P.; VAN DAMME, P. Prevention and control of hepatitis B in the community. In: Hallauer, J.; Kane, M.; McCoy, E.; Meleus, A.; Moure, C. (Editors), **Communicable Diseases Series**, Geneva, n.1, 1996.

GROTTO I, et al. Major adverse reactions to yeast-derived hepatitis B vaccines - a review. **Vaccine**, v.16, p. 329-34, 1998.

GUPTA R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Advanced Drug Delivery** , v. 32, p.155–172 , 1998.

HAGE, D.S. Immunoassays. **Analytical Chemistry**, v. 71, p.294-304, 1999.

HEERMANN, K. H. et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. **Journal of Virology**, Washington, v.52,n.2, p. 396-402, 1984.

HUY, T.T. et al. Genotype C of hepatitis b virus can be classified into at least two subgroups. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 283-292, 2004.

HYUK-SEONG,S. et al. Analysis and characterization of hepatitis B vaccine particles synthesized from *Hansenula polymorpha*. **Vaccine** v.26, p.4138-4144, 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Topic Q 2 B Validation of analytical procedures (methodology ICH 281/95). Harmonised Tripartite Guideline, **European Medicines Agency**, 1996.

JEANTET, D. et al.. Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient. **Hepatology**, v. 35, p. 1215-1224, 2002.

JORI, A.K. et al. An open label, non-comparative, multicentric, single group study to evaluate the immune response of recombinant hepatitis B vaccine obtained from genetically engineered

*Saccharomyces cerevisiae* in healthcare workers in India. **Journal Indian Academy of Clinical Medicine**, v.7, n. 2, p.123-129, 2006.

KRAMVIS, A. et al. Analysis of the complete genome of subgroup A hepatitis B virus isolates from South Africa. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 835-839, 2002.

KRICKA, L. J. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. **Clinical Chemistry**, v, 45, p.942, 1999.

KURBANOV, F. et al. A new subtype ( subgenotype) AC (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. **Journal General Virology**, v. 86, p. 2047-2056, 2005.

LAEMMLI, U. K. **Nature**, v. 227, p. 680, 1970.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **Journal of Viral Hepatitis**, v.11, p.97-107, 2004.

LE BOVIER. The heterogeneity of Australia antigen. **Journal of Infections Diseases**, v.123, n. 6, p.671-675, 1971.

MACHIDA, A. et al. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. **Gastroenterology**, v. 86, n.5, p. 910-918, 1984.

MALIK, A.H; LEE, W.M. Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millennium. **Annals of Internal Medicine**, v 132, p.723-731, 2000.

MARLIES, H. Three Rs Potential in the development and Quality Control of Immunobiologicals. **Altex**, v. 18, suppl. 01, p.13-46, 2001.

MARTÍNEZ, J.C. et al. Validation de un ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas humanas anti polisacárido capsular de *Salmonella typhi*. **Vaccine Monitor**, Havana, v.8 n.8, p. 7-10, 1999.

MELLO, F.C.A, et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BioMed Central Microbiology**, v.7, p.103, 2007.

MICHAEL, J. D. Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels by Silver Staining. **The Protein Protocols Handbook**, 2<sup>o</sup>ed., 2007.

MORAES, M.T.B.; GOMES S.A.; NIEL, C. Sequence analysis of pré-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A,D and F isolated in Brazil. **Archives of Virology**, v.141, p.1767-1773, 1996.

MOUTA JUNIOR, J. S .S. et al. Simple immunoaffinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells. **Journal of Chromatography B**, v.787, p. 303-311, 2003.

NEREY, M. et al. Validation de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti-polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C. **Biotecnología Aplicada**, Havana, p. 113-115, 1999.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A.M.; MAGNIUS, L. O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within four major subtypes. **Journal General Virology**, v. 73, p. 3141-3145, 1992.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A.M.; MAGNIUS, L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v, 198, p. 489-503, 1994.

NORDER, H. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derives worldwide: genotypes, subgenotypes, and HB(s)Ag subtypes. **Intervirolgy**, v.47 (6) p.289-309, 2004.

NGUYEN T. H. et al. Comparative efficacy, safety and immunogenicity of Hepavax-Gene and Engerix-B, recombinant hepatitis B vaccines, in infants born to HbsAg and HbeAg positive mothers in Vietnam: an assessment at 2 years. **Vaccine**, v. 20, p. 1803-1808, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Requirements for hepatitis B vaccines made by recombinant DNA techniques in yeast. **Technical Report Series**, v.786, 1989.

\_\_\_\_\_, Anex 4, Requirements for hepatitis B vaccines made by recombinant DNA techniques. **Technical Report Series**, v. 889, p.106-138, 1999.

\_\_\_\_\_, Hepatitis B. **Fact sheet 204**. 2001. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/html>. Acesso em 29 de abril de 2009.

\_\_\_\_\_, Immunization in Practice: A practical resource guide for health workers 2004 update, **WHO/IVB/04.06**, Geneva: 2004. Disponível em <http://www.who.int/vaccinesdocuments/DocsPDF01/www613.pdf>

\_\_\_\_\_, immunization topics Hepatitis B. 2009. Disponível em [http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis\\_b\\_/htm](http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_b_/htm). Acesso em 29 de abril de 2009.

OKAMOTO, H. et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **Journal General Virology**, v. 69, p. 2575-2583, 1988.

ONO, Y. et al. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. **Nucleic Acids Research**, v.11, p.1747-1757, 1983.

PASEK, M. et al. Hepatitis B virus genes and their expression in E.coli. **Nature**, v. 282, p. 575-579, 1978.

PERSING, D.H.; VARMUS, H.E.; GANEM, D. A frameshift mutation in the pre-S region of the human hepatitis B virus genome allows production of surface antigen particles but eliminates binding to polymerized albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 3440-3444, 1985.

PETERSON, G. L. **Methods in Enzymology**, p. 91- 95, 1983.

REBEDEA, I. G. et al. Comparison of thiomersal-free and thiomersal-containing formulations of a recombinant hepatitis B vaccine (Hepavax-gene) in healthy adults. **Vaccine**, v. 24, p. 5320-5326, 2006.

SATTLER, F.; ROBINSON, W.S. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. **Journal of Virology**, v.32, p. 226-233, 1979.

SELLS, M.A.; ZELENT, A. Z.; SHVARTSMAN, M.; ACS, G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. **Journal of Virology**, v.62, p.2836 – 2844, 1988.

SHELDON, J. et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. **Journal of Viral Hepatitis**, v.13 , n. 7, p.427-434, 2006.

SHOKRGOZAR , M. A.; SHOKRI, F. Subtype specificity of anti-HBs antibodies produced by human B-cell line isolated from normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine. **Vaccine**, v.20, p.2215, 2002.

SOUTO, F. J. D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **Gastroenterology Endoscopy Digestive**, v. 18, p. 143-150, 1999.

SITNIK, R.; et al. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **Journal Clinical of Microbiology**, v.42, p. 2455-60, 2004.

SITNIK, R. et al. Hepatitis B virus genotype E detected in Brazil in an African patient who a frequent traveler. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p. 1689-1692, 2007.

SOULIER, J.P.; COUROUCÉ-PAUTY, A.M. New determinants of hepatitis B antigen (Au or HB antigen). **Vox Sanguinis**, v. 25, p. 212-235,1973.

STUYVER, L. et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetics relatedness. **Journal General Virology**.,v. 81, p. 67-74, 2000.

SUGAUCHI, F. et al. Epidemiological and sequence differences between two subtypes ( Ac and Aa) of hepatitis B virus genotype A. **Journal General Virology**, v.85, p.811-820, 2004.

TABOR, E, et al. Horizontal transmission of hepatitis B virus among children and adults in five rural villages in Zambia. **Journal Medical Virology**, v.15, p. 113-120, 1985.

TELES, S. A. et al. Hepatitis B Virus: Genotypes and subtypes in Brazilian Hemodiálisis Patients. **Journal of Artificial Organs**, v.23, p.1074-1078, 1999.

TIJSSEN, P. The immobilization of immunoreactants on solid phases. In: BURDON, R.H.; VAN KNIPPENBERG, P.H. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam, London, New York, Tokyo, **Elsevier**, p.297-328, 1993.

TSURIMOTO, T.; FUJIYAMA, A.; MATSUBARA, K. Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.84, p. 444 – 448, 1987.

VALENZUELA, P. et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. **Nature**, 298, p.347-350, 1982.

VIANNA, C. O. A. et al. Evaluation of murine monoclonal antibodies targeting different epitopes of the hepatitis B virus surface antigen by using immunological as well as molecular biology and biochemical approaches. **Journal of Immunological Methods**, v.313, p.38-44, 2006.

WHITE R. G. Concepts relating to the mode of action of adjuvants. **Symposium Series Immunobiology Standardization**, v. 6, p. 3–12, 1967.

WARD, C.M.; MORGAN, M.R.A. Reproducibility of a commercially available kit utilizing enzyme-linked immunosorbent assay for determination of aflatoxin in peanut butter. **Food Additive Contamination**, v. 8, p. 9-15, 1991.

WONG, D.T.; NATH, N.; SNINSKY, J. J. Identification of hepatitis B virus polypeptides encoded by the entire pre-S open reading frame. **Journal of Virology**, v.55, p. 223-231, 1985.

YOKOSUKA, O; ARAI, M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. **Medical Molecular Morphology**, v.39, p.113-120, 2006.

ZURINA, et al. Immunogenicity and safety assessment of the Cuban recombinant hepatitis B vaccine in healthy adults. **Biologicals**, v. 35, 2, p. 115-122, 2007.

ZY, L. C. B.; FRANCIS, D. P. Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage

using vaccine: preliminary report of a randomized, double-blind placebo-controlled and comparative trial. **Pediatrics**, v. 76, p.713-718, 1985.

### 9. ANEXO 1 A - Parâmetros para otimização do ELISA - ANO 2007

Placas de 96 poços das marcas Nunc e Microton 600	Protocolo 01	Protocolo 02	Protocolo 03	Protocolo 04	Protocolo 05	Protocolo 06	Protocolo 07 (avaliação do conjugado)
<b>Concentração do captura(MAbs)</b>	AE3,AG9,BD12,IC2,IA4,CH6,CH7 e CG2 (10µg/mL)	CH6, CH7 e CG2 - 5µg/mL e combinação (5µg/mL)	CG2 (2,4 e 6µg/mL)	CG2 (2µg/mL)	CG2 (2µg/mL)	CG2 (2µg/mL)	CG2 (2, 5 e 10µg/mL)
<b>Diluyente do MAbs de captura</b>	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6
<b>Incubação temperat./temp</b>	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C
<b>Saturação</b>	PBS-T 0,05% adicionado de 5% leite desnatado+3% de SFB e 0,5% de BSA	PBS-T 0,05% adicionado de 5% leite desnatado+3% de SFB e 0,5% de BSA	PBS adicionado de 5% de BSA	PBS adicionado de 5% de BSA	PBS adicionado de 5% de BSA	PBS adicionado de 5% de BSA	PBS adicionado de 5% de BSA
<b>Lavagens</b>	PBS-T 0,05% a 0,05% (4X)	PBS-T a 0,05% (4X)	PBS-T a 0,05% (3X)	PBS-T a 0,05% (3X)	PBS-T a 0,05% (3X)	PBS-T a 0,05% (3X)	PBS-T a 0,05% (3X)
<b>Concentração da amostra da vacina com Al(OH)<sub>3</sub></b>	Euvax, Hepavax-gene e Butang (10µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, heparvax-gene e Heberbiovac-HB (1µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, heparvax-gene e Heberbiovac-HB (0,05,0,25,0,5, 1,2,4,6,12µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B e Heberbiovac-HB (5 e 2µg/mL)			
<b>Concentração da amostra vacinas sem Al(OH)<sub>3</sub></b>					Euvax, Hepavax-gene, Butang, heparvax-gene e Heberbiovac-HB (0,02, 0,05,0,25,0,5, 1,2,4,6,12µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, heparvax-gene e Heberbiovac-HB (0,02, 0,05,0,25,0,5, 1,2,4,6,12µg/mL)	Butang (0,04, 0,4 e 4µg/mL)
<b>Controle positivo</b>	Soro humano HBsAg positivo ( amostra do Kit Murex da Abbott subtipo (?))	Soro humano HBsAg positivo (amostra do laboratório subtipo adw2 e ayw3 diluído de 1:10)					
<b>Controle negativo</b>	Soro humano HBsAg negativo (amostra do Kit murex da Abbott)	PBS adicionado BSA a 0,2%	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)

<b>Parâmetros para otimização do ELISA - ANO 2007 - continuação</b>							
	<b>Protocolo 01</b>	<b>Protocolo 02</b>	<b>Protocolo 03</b>	<b>Protocolo 04</b>	<b>Protocolo 05</b>	<b>Protocolo 06</b>	<b>Protocolo 07 (avaliação do conjugado)</b>
<b>Diluyente da amostra</b>	PBS adicionado de BSA a 0,2%	PBS adicionado de BSA a 0,2%	PBS (pH 7,2)				
<b>Incubação (tempo e temperatura)</b>	37°C/120min	37°C/120min	37°C/120min	37°C/120min	37°C/120min	37°C/90min	37°C/120min
<b>Agitação da placa</b>	Não	Não	Não	(13,7 x g)	(13,7 x g)	(13,7 x g)	(13,7 x g)
<b>Lavagens</b>	PBS-T a 0,05% (4X)	PBS-T a 0,05% (4X)	PBS-T a 0,05% (3X)				
<b>Conjugado</b>	MAb AG9-HRP (1:5000)	MAb AG9-HRP (1:5000)	MAb AG9-HRP (1:2500)	MAb AG9-HRP (1:2500)	MAb AG9-HRP (1:2500)	MAb AG9-HRP (1:2500)	MAb AG9-HRP (1:500; 1000; 2500 e 5000)
<b>Diluyente do conjugado</b>	PBS-T 0,05%	PBS-T a 0,05% (4X)	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
<b>Incubação (tempo e temperatura)</b>	37°C/120min	37°C/120min	37°C/120min	37°C/120min	37°C/120min	37°C/90min	37°C/120min
<b>Lavagens</b>	PBS-T a 0,05% (4X)	PBS-T a 0,05% (4X)	PBS-T a 0,05% (3X)				
<b>Substrato</b>	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB
<b>Incubação (tempo e temperatura)</b>	30min	30min	30min	30min	30min	30min	30min
<b>Saturação</b>	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N
<b>Leitura</b>	450nm	450nm	450nm	450nm	450nm	450nm	450nm

<b>9. ANEXO 1B - Parâmetros para otimização do ELISA - ANO 2008</b>							
	<b>Protocolo 1</b>	<b>Protocolo 2</b>	<b>Protocolo 3</b>	<b>Protocolo 4</b>	<b>Protocolo 5</b>	<b>Protocolo padronizado</b>	<b>Protocolo estabilidade</b>
<b>Concent do Mab de captura</b>	CG2 (2, 4 e 8µg/L)	CG2 (8µg/mL)	CG2 (8µg/mL)	CG2, CH6 e CH7 utilizado individual (8µg/mL) e em combinação (2,68µg de cada MAb)	CG2 (8µg/mL) - Estabilização dos MAb	CG2 (8µg/mL)	Estabilidade: placas guardadas 4°C e -20°C revestidas e estabilizadas com CG2 (8µg/mL) 6 meses
<b>Dilúente do MAb de captura</b>	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH 9,6	Tampão carbonato bicarbonato(50mM) pH9,6	
<b>Incubação (temperatura/tempo)</b>	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	37°C/30min e 18hs/ 4°C	
<b>Saturação</b>	PBS adicionado de 5% de BSA	PBS adicionado de 3% e 5% de BSA	PBS adicionado de 3% de BSA	PBS adicionado de 3% de BSA	Tampão para estabilização de anticorpos	PBS adicionado de 3% de BSA	
<b>Lavagens</b>	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)		PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)
<b>Concent. da amostra de vacina sem Al(OH)3</b>	Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B e Quinvaxem (0,2,0,4,0,6,0,8 e 1µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B e Quinvaxem (0,2,0,4,0,6,0,8 e 1µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B, Quinvaxem e vacina combinada contra DTP e Hib (0,2,0,4,0,6,0,8 e 1µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B (1 e 10µg/mL)		Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B e Quinvaxem (0,2,0,4,0,6,0,8 e 1µg/mL)	Euvax, Hepavax-gene, Butang, Engerix-B e Quinvaxem (0,2,0,4,0,6,0,8 e 1µg/mL)
<b>Controle negativo</b>	PBS (pH 7,2) e anti interferon beta IgG1a	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)		PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)

<b>Parâmetros para otimização do ELISA - ANO 2008 - continuação</b>							
	<b>Protocolo 01</b>	<b>Protocolo 02</b>	<b>Protocolo 03</b>	<b>Protocolo 04</b>	<b>Protocolo 5</b>	<b>Protocolo padronizado</b>	<b>Protocolo estabilidade</b>
<b>Diluyente da amostra</b>	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)		PBS (pH 7,2)	PBS (pH 7,2)
<b>Incubação (tempo e temperat.)</b>	37°C/60, 90 e 120min	37°C/60min	37°C/60min	37°C/60min	37°C/45min	37°C/60min	37°C/60min
<b>Agitação da placa</b>	63,0 x g	63,0 x g	63,0 x g	63,0 x g		63,0 x g	63,0 x g
<b>Lavagens</b>	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)		PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)
<b>Conjugado</b>	MAb AG9-HRP(1:2500)	MAb AG9-HRP(1:2500)	MAb AG9-HRP(1:2500)	MAb AG9-HRP(1:2500)		MAb AG9-HRP(1:2500)	MAb AG9-HRP(1:2500)
<b>Diluyente do conjugado</b>	PBS	PBS	PBS	PBS		PBS	PBS
<b>Incubação (tempo e temperatura)</b>	37°C/60, 90 e 120min	37°C/60min	37°C/60min	37°C/60min		37°C/60min	37°C/60min
<b>Lavagens</b>	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)		PBS-T à 0,05% (3X)	PBS-T à 0,05% (3X)
<b>Substrato</b>	TMB	TMB	TMB	TMB		TMB	TMB
<b>Incubação (tempo e temperatura)</b>	30min	30min	30min	0min		30min	30min
<b>Saturação</b>	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N	H2SO4-2N		H2SO4-2N	H2SO4-2N
<b>Leitura</b>	450nm	450nm	450nm	450nm	Descarte do sobrenadante - guardadas 4°C e -20°C	450nm	450nm