

**Pós-Graduação em Biotecnologia
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia**

IURY OLIVEIRA SOUZA

**Validação de Ensaio Imunocromatográfico para a detecção Múltipla de
Anticorpos Específicos Contra HIV, HBV e HCV.**

**SALVADOR
2011**

IURY OLIVEIRA SOUZA

**VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA A DETECÇÃO
MÚLTIPLA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA HIV, HBV E HCV.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

**SALVADOR
2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

S729 Souza, Iury Oliveira

Validação de ensaio imunocromatográfico para a detecção múltipla de anticorpos específicos contra HIV, HBV e HCV / Iury Oliveira Souza. – Salvador, 2011.

64 f.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

1. HIV. 2. Anticorpos. 3. Imunologia. I. Portela, Ricardo Wagner Dias. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 616.98



TERMO DE APROVAÇÃO

IURY OLIVEIRA SOUZA

VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECÇÃO MÚLTIPLA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA HIV, HBV E HCV

Salvador, Bahia, 16 de dezembro de 2011.

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. DR. RICARDO WAGNER DIAS PORTELA (Orientador)

PROF. DR. ABELARDO SILVA JUNIOR (Examinador Externo)

PROFA. DRA. SILVIA INES SARDI (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela providência, pela vida e por ter permitido que este momento acontecesse.
- A minha família pelo incentivo, em especial a minha esposa Halide Brasília Trindade Souza, por ter estado sempre presente ao meu lado.
- Ao Professor Ricardo Wagner Portela por ter aceitado a orientação desse trabalho, pelo exemplo de pessoa, profissional, pesquisador e por sua paciência e perspicácia demonstrada.
- Aos professores, Fernanda Washington Lima, Robert Eduard Schaer e Roberto Meyer, os quais contribuíram ativamente em nosso trabalho.
- Aos amigos do laboratório LABIMUNO-ICS-UFBA, Senhora Francisca, Dan Loureiro, José Tadeu, Bruno Bastos, Ludmila Sena, Thiago Sousa, Bianca Cardeal, Aretha Silva, e em especial a Maria Tereza Guedes, por ter me apresentado a este grupo de pesquisa e ter acompanhado minha carreira acadêmica desde a graduação.
- Aos amigos do SIDI - Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas, André Roque, Adriano Serva, Sócrates Bezerra, Helen Sodré, Kelly Cristine Pedroza, Jucicleide Bastos, Daniel Moura, Lucinalva, e Virgínia Avelar pela colaboração com este trabalho e afeto.
- Aos colegas mestrandos das turmas 2010.2 e 2011.1 pela força e incentivo nos momentos compartilhados no decorrer dos semestres.
- Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

- A CAPES pela concessão de bolsa.
- A empresa Medmira pela doação dos kits rápidos.
- Dedico este trabalho a meu filho Arthur Trindade Souza.

*“Devemos nos questionar sempre onde estamos
e aonde queremos chegar,
sabendo que quanto mais curta for a estrada,
menores serão as conquistas.”
(Autor desconhecido)*

RESUMO

Cerca de 33,3 milhões de pessoas apresentam infecção pelo Human Immunodeficiency Virus (HIV) no mundo; 180 milhões estão infectados pelo Hepatitis C Virus HCV e estima-se que 360 milhões apresentem infecção ativa pelo Hepatitis B Virus (HBV). Outra realidade mundial é a co-infecção entre esses vírus. Os dados mostram a importância global dessas viroses e a urgência do desenvolvimento de novos ensaios de diagnóstico sensíveis, específicos, rápidos e de baixo custo, que possam atender à demanda de entidades públicas inseridas em programas para prevenção e diagnóstico dessas doenças. O presente trabalho consiste em validação relativa de um novo teste imunocromatográfico desenvolvido pela empresa canadense Medmira para detecção de anticorpos específicos contra HIV, HCV e HBV. Os resultados encontrados foram extremamente favoráveis para a detecção de anticorpos específicos para HIV, apresentando 98,6% de sensibilidade e 100% de especificidade. Para o anti-HBV a sensibilidade e especificidade encontradas foram de 90,0% e 98,6%, e de 86,3% e 100%, para anti-HCV, respectivamente. Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada e a reprodutibilidade e repetitividade foram de 100%. O índice kappa e a acurácia global do teste foram de 0,91 (0,88-0,94) e 95,5% (93,5-97,5), respectivamente. Conclui-se que o ensaio imunocromatográfico é clinicamente útil em triagens rápidas para detecção de anticorpos anti-HIV, HCV e HBV.

Palavras-chave: HBV. HCV. HIV. Imunocromatografia. Diagnóstico. Validação.

ABSTRACT

About 33.3 million people present Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection in the world, 180 million are infected with Hepatitis C Virus (HCV), and it is estimated that 360 million have active infection by Hepatitis B Virus (HBV). Another reality is the global co-infection with these viruses. These data show the overall importance of these viruses and the urgency in developing new sensitive, specific, rapid and low cost diagnostic tests, which can meet the demand of public prevention programs. This work consists of a relative validity of a new immunocromatographic assay developed by the Canadian enterprise Medmira, for the detection of specific antibodies against HIV, HCV and HBV. Results were extremely favorable for the detection of specific antibodies against HIV, with 98.6% sensitivity and 100% specificity. For the anti-HBV, sensitivity and specificity were 90.0% and 98.6%, and 86.3% and 100% for anti-HCV, respectively. No cross-reactivity was found and repeatability and reproducibility were 100%. The overall and kappa index and accuracy were 0.91 (0.88 to 0.94) and 95.5% (93.5 to 97.5), respectively. It is concluded that the immunochromatographic assay is clinically useful in rapid screening for antibodies to HIV, HCV and HBV.

Keyword: HBV. HCV. HIV. Immunochromatography. Diagnosis. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES – MAPAS

| | | |
|----------|---|----|
| Mapa 1 - | Distribuição global da prevalência estimada para o vírus HIV, população entre 14-49 anos, ano 2007..... | 20 |
| Mapa 2 - | Distribuição global da prevalência da hepatite B crônica, ano 2006..... | 25 |
| Mapa 3 - | Cobertura por imunização com 3 doses de vacina contra hepatite B em crianças, ano 2010..... | 26 |
| Mapa 4 - | Distribuição global dos genótipos do HCV, 2009..... | 28 |
| Mapa 5 - | Distribuição mundial da prevalência da hepatite C, ano 1999..... | 31 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES - FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1 - | Interpretação dos resultados para testes sorológicos para hepatite B..... | 24 |
| Figura 2 - | Identificação de fatores de risco para o HBV, Estados Unidos, 2009..... | 29 |
| Figura 3 - | Esquematização de Imunocromatografia de fluxo lateral..... | 33 |
| Figura 4 - | Esquematização de Imunocromatografia de fluxo vertical..... | 33 |
| Figura 5 - | Esquematização do corte lateral do Ensaio Imunocromatográfico Medmira, para detecção múltipla de anticorpos anti-HIV, HCV e HBV..... | 34 |
| Figura 6 - | Representação dos possíveis resultados com o teste Medmira..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1- | Soros utilizados no estudo de determinação da sensibilidade e especificidade relativa do ensaio imunocromatográfico múltiplo, com seus respectivos ensaios comerciais de ELISA utilizados como referência, e seus parâmetros..... | 49 |
| Tabela 2- | Soros utilizados no ensaio para determinação de reatividade cruzada, com seus respectivos ensaios utilizados como referência..... | 50 |
| Tabela 3- | Tabela de contingência dois por dois, com os resultados dos soros testados previamente em ensaios referência, após realização de ensaio imunocromatográfico..... | 51 |
| Tabela 4- | Análise dos parâmetros de validação: sensibilidade, especificidade, índice kappa e acurácia, após realização de ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência.... | 51 |
| Tabela 5- | Análise dos parâmetros de Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), Reprodutibilidade e Repetitividade, após realização de ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência..... | 52 |

SIGLAS E ABREVIações

| | |
|----------|--|
| AgHBe | Antígeno do Envelope do HBV |
| AgHBs | Antígeno de Superfície do HBV |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| ALT | Alanina Aminotransferase |
| Anti-HBc | Anticorpo anti-Core do HBV |
| AST | Aspartato Aminotransferase |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| ELISA | Imunoensaio Enzimático |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| IFA | Imunofluorescência Indireta |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RIBA | Ensaio Immunoblot Recombinante |
| RIPA | Radioimunoprecipitação |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RT-PCR | Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase |
| WB | Western-Blot |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) | 16 |
| 2.1.1 Transmissão do HIV | 16 |
| 2.1.2 Quadro clínico/patogênese | 17 |
| 2.1.3 Diagnóstico laboratorial..... | 18 |
| 2.1.4 Epidemiologia | 19 |
| 2.2 HEPATITIS B VIRUS (HBV) | 20 |
| 2.2.1 Transmissão do HBV..... | 21 |
| 2.2.2 Quadro clínico/patogênese | 21 |
| 2.2.3 Diagnóstico laboratorial..... | 23 |
| 2.2.4 Epidemiologia | 25 |
| 2.3 HEPATITIS C VIRUS (HCV)..... | 27 |
| 2.3.1 Transmissão do HCV..... | 28 |
| 2.3.2 Quadro Clínico/ patogênese | 29 |
| 2.3.3 Diagnóstico laboratorial..... | 30 |
| 2.3.4 Epidemiologia | 30 |
| 2.4 CO-INFECÇÃO ENTRE HIV, HCV E HBV. | 32 |
| 2.5 IMUNOCROMATOGRAFIA | 32 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 35 |
| 4 OBJETIVOS | 36 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL..... | 38 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 38 |
| 5 ARTIGO A SER SUBMETIDO | 37 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 55 |
| REFERÊNCIAS..... | 56 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a implementação do Sistema Único de Saúde (SUS) e o crescente aumento do acesso da população brasileira a planos de saúde particulares e corporativos vêm incrementando a demanda por ensaios de imunodiagnóstico em laboratórios clínicos.

Nesse sentido, o mercado de produtos voltados ao imunodiagnóstico sofreu um progresso significativo nos últimos quinze anos, representado pelo aumento da participação de empresas brasileiras e pela chegada ao Brasil de diversos produtos de fabricantes internacionais. Isso se reflete atualmente na indústria biotecnológica internacional através do aumento do número de opções de ensaios sorológicos disponíveis para a utilização em laboratórios clínicos, bem como da variedade de tipos de testes.

Ensaio que utilizam anticorpos como marcadores da infecção por agentes microbianos, virais e também protozoários, possuem a vantagem de poderem identificar o status infeccioso de indivíduos através do uso de amostra que pode ser obtida com procedimento pouco invasivo. Além disso, um resultado confiável nestes testes não depende da localização natural do microrganismo no corpo do hospedeiro, visto que os anticorpos produzidos podem estar localizados nos mais diversos líquidos corporais.

A detecção da infecção através de testes com alta sensibilidade e especificidade pode acarretar um tratamento mais eficaz da doença, por significar um diagnóstico mais precoce e preciso da doença, melhorando o prognóstico da enfermidade. Deve-se citar também que um diagnóstico mais preciso pode tornar estudos epidemiológicos mais confiáveis e servirem de base para a confecção de programas de controle e erradicação de patologias mais eficazes.

Nesse contexto, os ensaios Imunocromatográficos possuem grande importância, por se tratarem de procedimentos laboratoriais de fácil realização, associados a baixo custo e que podem ser realizados em diversos lugares, sem a necessidade de equipamentos de alto custo e de difícil manipulação, levando a possibilidade da identificação do contato com o agente infeccioso para mais próximo dos pacientes.

O presente trabalho teve o objetivo de validar o Ensaio Imunocromatográfico Reveal Medmira[®] (Halifax, Canadá) para detecção de anticorpos anti-HBV, HCV e HIV. Para justificar a importância desse novo ensaio foi feita uma breve revisão literária da situação atual das infecções causadas por esses vírus e as principais ferramentas usadas em seus respectivos diagnósticos.

Neste ensaio de validação, foram avaliados os parâmetros; sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, índice kappa, acurácia e a existência de reação cruzada com marcadores de outras infecções e fator reumatóide, tendo como padrão de referência ensaios de ELISA imunoenzimáticos automatizados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para melhor entender a situação atual e impacto das infecções virais abordadas neste estudo (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana, Hepatite B e Hepatite C) e justificar a necessidade de novos ensaios rápidos para diagnóstico dessas infecções, tornam-se necessário revisar alguns conceitos.

Para isso, procede-se em um primeiro momento a uma revisão sucinta, abordando a característica molecular de cada vírus, formas de transmissão, patogênese, diagnóstico laboratorial, epidemiologia, co-infecção e, por fim, apresenta-se o teste imunocromatográfico como alternativa para o diagnóstico dessas infecções virais.

2.1 HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV)

O HIV é membro do gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*. Esse gênero é responsável por uma variedade de doenças neurológicas e imunológicas. Seu genoma é caracterizado pelas estruturas gênicas *gag*, *pol*, *env*, e uma combinação complexa de outros genes (GARDNER *et al.*, 1994; LUCIW, 1996). O genoma do retrovírus é único entre os vírus sob vários aspectos, incluindo suas propriedades físicas de organização, síntese, e funções durante a replicação; seu genoma é diplóide, composto de duas cópias idênticas de um único filamento de ácido ribonucléico (RNA), o qual é sintetizado e processado pelas células hospedeiras (REQUEJO, 2006).

2.1.1 Transmissão do HIV

A principal forma de transmissão do HIV dá-se através do contato sexual por meio das mucosas do trato genital e retal, seja por relação homossexual (BARAL *et al.*, 2011), ou por relação heterossexual (HLADIK; MCEL RATH, 2008). Outras formas de contato com o vírus é através de transfusão sanguínea, terapia renal substitutiva ou acidente com perfuro-cortantes (UNAIDS, 2009).

A maioria das mulheres infectadas pelo HIV é jovem e em idade fértil. O aumento da transmissão no grupo heterossexual foi um fator importante para elevar

a incidência de casos de AIDS em mulheres e, conseqüentemente, o número de casos em crianças como resultado da transmissão vertical. Um considerável percentual de casos de infecção por HIV em mulheres são diagnosticados durante a gravidez, refletindo a importância do pré-natal para triagens sorológicas do HIV (BRITO *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2011).

Outro grupo de risco para infecção pelo HIV é aquele formado pelos usuários de drogas injetáveis (UDI). Estimativas mostram que 10% dos casos de HIV/AIDS em todo o mundo são atribuídos aos UDI (UNAIDS, 2003). Mais de dez milhões de pessoas no mundo estariam enquadradas neste grupo de risco (ACEIJAS *et al.*, 2004; UNAIDS, 2002).

2.1.2 Quadro Clínico/patogênese

A principal ação do HIV é a destruição gradual de linfócitos T CD4+ auxiliares e subsequente perda da competência imunológica, uma vez que essas células são os reservatórios do vírus tanto no estado assintomático quanto no estado ativo (STEVENSON, 2003). Alguns estudos mostram que o tropismo do HIV pela célula CD4+ é justificado pela interação do vírus com co-receptores de quimiocinas CCR5 e CXR4 localizados na membrana destas células (FENG *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1996). A distribuição desses receptores permite a infecção de outras células, como macrófagos e células dendríticas (STEVENSON, 2003).

A infecção aguda pelo HIV é de difícil diagnóstico, sendo seus sinais e sintomas inespecíficos, podendo persistir por dias ou anos (KAHN & WALKER, 1989). O curso normal da infecção é caracterizado por uma perda progressiva de linfócitos CD4+, que leva a severa imunodeficiência depois de um intervalo de tempo variável (KAHN & WALKER, 1989). Após a infecção por HIV, a maioria dos indivíduos apresenta-se com uma síndrome semelhante à mononucleose, que é caracterizada pela perda de linfócitos CD4+ e subsequente recuperação até valores próximos da normalidade (MUNOZ *et al.*, 1989). O tempo médio para o desenvolvimento dos sinais clínicos da AIDS é de aproximadamente 8 a 10 anos, mas pode variar entre indivíduos e depende da complexidade da interação do vírus com o hospedeiro. Infecções oportunistas que ocorrem dentro dos primeiros meses após a infecção com HIV são extremamente raras ou mal diagnosticadas (SILVA *et al.*, 2009).

2.1.3 Diagnóstico Laboratorial

O método laboratorial direto para detecção do HIV em amostras clínicas é a cultura do vírus em células mononucleares do sangue periférico, plasma ou células ganglionares (KELLER & MANAK, 1990). Este método tem um alto custo, e pressupõe a necessidade de uma equipe de técnicos treinados e condições laboratoriais de isolamento e biossegurança (GRANATO, 1996; METCALF *et al*, 1997); além de ser demorado, com a obtenção dos resultados entre 15 a 30 dias após o início do cultivo (MACHADO, 1999).

Outras técnicas baseiam-se na detecção de anticorpos específicos contra esse vírus. Para pesquisa de anticorpos anti-HIV, as mais utilizadas são: teste imunoenzimático (*ELISA*), imunofluorimetria, imunoquimioluminescência, radioimunoprecipitação (*RIPA*), aglutinação de partículas de látex, imunofluorescência indireta (*IFA*) e *Western-Blot* (*WB*).

O atual procedimento para diagnóstico da infecção por HIV, em uso por mais de 20 anos, consiste da confirmação de resultados repetidos e confirmados por imunoensaio com teste western blot ou imunofluorescência (CDC, 1989).

A primeira geração de imunoensaio foi aprovada em 1985. Imunoensaio de primeira geração detecta anticorpos IgG usando lisado viral como antígeno em formato de imunoensaio indireto. Este ensaio detecta infecção por HIV no mesmo período de tempo que a técnica de Western blot, aproximadamente 45-60 dias após a infecção (Fiebig *et al*, 2003; Owen *et al*, 2008). A segunda geração também detecta IgG no formato de *ELISA* indireto, tendo sido desenhada para aumentar a especificidade por incorporação de peptídeos ou proteínas recombinantes como antígenos para detecção dos respectivos anticorpos. A segunda geração de imunoensaio detecta IgG anti-HIV em aproximadamente 5-7 dias mais cedo que a primeira geração (Owen *et al*, 2008). A terceira geração de imunoensaio detecta IgG para HIV, e também detecta IgM para HIV usando proteínas e peptídeos recombinantes em um formato sandwich, além de melhorar a detecção da infecção recente por HIV em cerca de 7-10 dias, em comparação com a segunda geração de imunoensaios (Owen *et al*, 2008; Parry *et al*, 2003). A terceira geração de imunoensaios consegue detectar positivos mesmo antes da detecção de quaisquer bandas no western blot (Branson, 2010; Owen *et al*, 2008; Parry *et al*, 2003). A quarta geração de ensaio, que detecta antígeno p24, além dos anticorpos IgM e IgG

para HIV, pode detectar a infecção pelo HIV em aproximadamente 15 dias após o início da infecção (Parry *et al*, 2003).

Outras opções para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV são os testes rápidos, sendo que estes tem sensibilidade e especificidade comparáveis aos imunoenaios de primeira e secunda geração (Branson, 2010; Delaney *et al*, 2011). Vários testes rápidos para HIV detectam ambos HIV-1 e HIV-2, e outros podem diferenciar infecção pelo HIV-1 da infecção pelo HIV-2 (O'Connell & Peel 2007).

2.1.4 Epidemiologia

O Human Immunodeficiency Virus (HIV) está disseminado em todo o mundo. Cerca de 85% dos isolados de humanos estão divididos em duas espécies: HIV-1 e HIV-2, mas o principal responsável pela doença é o HIV-1, enquanto a ocorrência do HIV-2 está restrita a algumas regiões da África Ocidental e Central (REQUEJO, 2006). O Mapa 1 representa a distribuição mundial da prevalência das infecções causadas pelo HIV, demonstrando que a Ásia e África são os continentes aonde se tem as maiores prevalências.

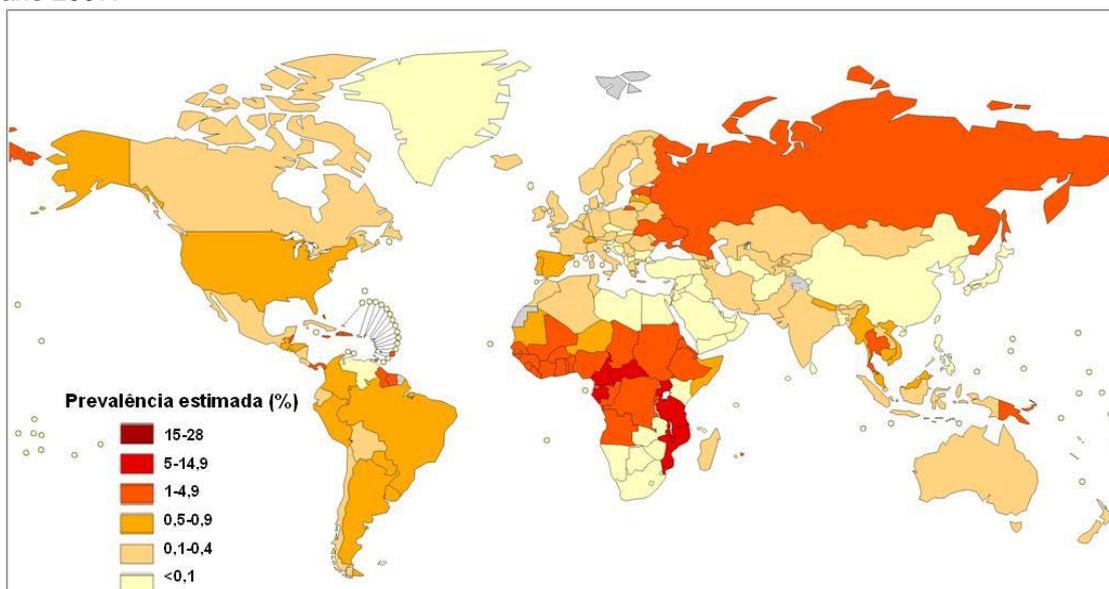
A epidemiologia mundial da AIDS revela que, em 2008, 33,4 milhões de pessoas eram portadoras do vírus em todo o mundo. A melhoria tecnológica e a facilidade de acesso aos serviços de prevenção e tratamento tem feito com que o número de mortes tenha decrescido de 3,1 para 2 milhões entre os anos 2005 a 2008 (UNAIDS & WHO, 2009). Entretanto o impacto dessas melhorias não foi homogêneo, haja vista que ocorreram principalmente em países desenvolvidos (UNAIDS & WHO, 2010). Desde seu surgimento, só após o ano 2000 houve uma pequena queda referente ao número anual de novos casos da doença: de 3,1 milhões de casos em 2001 para 2,7 milhões em 2008 (UNAIDS & WHO, 2009).

Atualmente relatórios sobre a epidemiologia global da AIDS revisam a estimativa de pessoas soropositivas para o HIV em todo mundo para um número próximo de 32,8 milhões de pessoas (intervalo de confiança 30,9 milhões-34,7 milhões) (UNAIDS & WHO, 2010).

No Brasil, vários estudos mostram a prevalência da infecção pelo HIV entre os diversos grupos populacionais. A prevalência encontrada entre doadores de sangue da cidade de Curitiba foi de 0,149% (Neto *et al*, 2002). Por outro lado, outro estudo caracterizou o perfil dos usuários que procuraram os Centros de Testagem

Anônima em Santa Catarina, Brasil, em 2005, encontrando taxas de prevalência de 2% no sexo feminino e 5,6% no masculino (Schneider *et al*, 2008). Em gestantes de Vitória, Espírito santo, a prevalência encontrada foi de 0,44% e a taxa de transmissão vertical foi de 9,7% (Vieira *et al*, 2011). Por fim, entre presidiários de Ribeirão Preto, São Paulo, a prevalência global encontrada foi de 5,7% (Coelho *et al*, 2007).

Mapa 1 - Distribuição global da prevalência estimada para o vírus HIV, população entre 14-49 anos, ano 2007.



Fonte: WHO, 2009.

2.2 HEPATITIS B VIRUS (HBV)

O Hepatitis B virus (HBV) pertence à família *Hepadnaviridae*, seu genoma é formado por DNA de dupla fita incompletas com 3200 pares de bases (HATZAKIS *et al.*, 2006). Os vírus pertencentes a esta família compartilham características comuns, tais como: tamanho, ultraestruturas do vírion, organização da molécula de DNA e um mecanismo de replicação por transcrição reversa (HATZAKIS *et al*, 2006). Esta família é dividida em dois gêneros, *Orthohepadnavirus* e *Avihepadnavirus*, representando os vírus cujos hospedeiros são mamíferos e aves, respectivamente. O HBV apresenta tropismo pelas células hepáticas. O hospedeiro natural do HBV é o ser humano, porém outros vírus similares foram isolados em animais, tais como marmotas (WHV), esquilos (GSHV), patos (DHBV), garças (HHBV), gansos (GHBV) e outros tipos de pássaros (CHBV). Apesar dos Hepadnavírus terem uma

preferência pelas células hepáticas, suas partículas de DNA foram isoladas em rins, pâncreas e células mononucleares (KIDD-LJUNGGREN *et al.*, 2002).

2.2.1 Transmissão do HBV

A transmissão do HBV pode ser horizontal ou vertical, entendendo-se como vertical a passagem do vírus diretamente da mãe para o recém nascido, usualmente no parto ou através do contato que se estabelece depois (DINIS; PASSOS, 2003). Já a transmissão horizontal decorre do contato com fluidos orgânicos, contendo a partícula viral, de modo especial com sangue, sêmen e saliva (FERNANDES *et al.*, 2009; FORTES *et al.*, 2006). Justifica-se, desta maneira, a maior prevalência da doença entre indivíduos submetidos a determinados riscos, dentre os quais se destacam: pacientes em terapia renal substitutiva que confere alto risco de contato com superfícies contaminadas ou máquinas de hemodiálise; poli-transfusão de sangue; trabalho com sangue humano; acidente com perfuro-cortantes com material contaminado; convivência íntima com infectados; asseio pessoal insatisfatório; uso de drogas injetáveis através do compartilhamento de seringas; exposição a múltiplos parceiros sexuais (DINIS; PASSOS, 2003; FERNANDES *et al.*, 2009; FERRAZ, 2007; FERREIRA, 2004; FORTES *et al.*, 2006).

2.2.2 Quadro Clínico/patogênese

Hepatite é uma inflamação do fígado caracterizada por uma necrose focal ou difusa que afeta os ácinos. Vírus hepáticos específicos, álcool, ou drogas podem causá-la (ANZOLA, 2004). A hepatite viral tem emergido como problema de saúde pública que afeta centenas de milhares de pessoas em todo mundo. Acredita-se que o HBV não exerça um efeito citopático direto sobre os hepatócitos. A hepatite B pode, no entanto, variar desde uma doença aguda auto-limitada, até uma forma grave como hepatite fulminante (BONILLA & ROBERTS, 2005). Pode ainda, apresentar um curso crônico, com evolução para a cirrose hepática e hepatocarcinoma. (ANZOLA, 2004; BONILLA GUERRERO & ROBERTS, 2005).

A história da infecção natural pelo HBV compreende três fases distintas: a primeira é definida como fase de imunotolerância, ocorre após o período de transmissão peri-natal e é caracterizada pela presença sérica do antígeno de

superfície do HBV (AgHBs) e do antígeno do envelope do HBV (AgHBe); altos títulos de HBV-DNA; transaminases normais ou discretamente elevadas; mínima lesão hepática histológica e curso assintomático (FATTOVICH, 2003; HUI et al, 2007). Os pacientes que se infectam quando adultos normalmente não passam por esta fase ou, se a apresentam, são considerados de baixo risco de progressão. A segunda fase é denominada de imuno-ativa ou de hepatite B crônica, caracterizada pela presença no soro do AgHBe ou do anti-HBe (BONINO *et al*, 2003). A referida fase ocorre após a transmissão horizontal entre crianças ou na fase adulta (FUNG & LOK, 2005; FATTOVICH, 2003; CONJEEVARAM, 2003). A terceira fase é conhecida como não replicativa ou de portador inativo do HBV, que se nota pela presença no soro do AgHBs, anti-HBe, títulos baixos ou indetectáveis do HBV-DNA, níveis normais de alanina aminotransferase (ALT), mínima lesão histológica hepática, curso assintomático e bom prognóstico, muitos portadores permanecem inativos por toda a vida (FERRAZ, 2007).

Após um período de incubação inicial de 1 a 4 meses, 30 a 80% dos adultos expostos desenvolvem hepatite B aguda, apresentando sintomas de fadiga, náuseas e, ocasionalmente, icterícia (JANSSEN *et al*, 2005). Testes de laboratório revelam elevações significativas na ALT e aspartato aminotransferase (AST), que normalizam dentro de 1 a 4 meses em pacientes que se recuperam (GUPTA & FREDERICK, 2009). A progressão para hepatite crônica é definida como a persistência de elevados níveis de AST/ALT ou AgHBs por mais de 6 meses, e é observada em apenas 5% dos adultos imunocompetentes infectados com HBV (GUPTA & FREDERICK, 2009). A persistência de AgHBs, marcador de risco de transmissão da infecção, aumenta notavelmente com a positividade para AgHBe (LOK *et al*, 2007). Durante a fase inicial de imunotolerância, os marcadores sorológicos de replicação viral, incluindo AgHBs, AgHBe, DNA-HBV são encontrados, enquanto que AST/ALT encontram-se ligeiramente elevados (FUNG & LOK, 2005 ; FATTOVICH, 2003; CONJEEVARAM, 2003). Posteriormente, há uma fase prolongada de hepatite crônica ativa, com redução de AST/ALT e do nível de DNA-HBV (LOK *et al*, 2007). A persistência para AgHBe-positivo (marcador de infecção crônica) ocorre em uma taxa de 10 a 20% em adultos saudáveis, e é marcada pela elevação da AST/ALT, com piora clínica (CHEMIN; ZOULIM, 2009; FERREIRA, 2004; GUPTA; ALTICE, 2009).

A infecção pelo HBV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de hepatocarcinoma em todo o mundo. Existem evidências crescentes a respeito dos dois principais mecanismos específicos do HBV que contribuem para o desenvolvimento deste tipo de câncer. O primeiro é a integração do genoma viral dentro do cromossomo do hospedeiro, causando ativação ou silenciamento de alguns genes, podendo até mesmo resultar na perda de supressores tumorais (CHEMIN; ZOULIM, 2009). O segundo mecanismo envolve a expressão de fatores ativadores derivados a partir do genoma do HBV, os quais têm potencial para influenciar padrões de transdução de sinal intracelular e alterar a expressão de genes do hospedeiro (ANZOLA, 2004; CHEMIN; ZOULIM, 2009).

2.2.3 Diagnóstico laboratorial

O AgHBs é o primeiro marcador sorológico para a identificação da infecção aguda pelo HBV (LEE, 1997). Normalmente, o AgHBs pode ser detectado após 6 a 10 semanas após exposição ao vírus (PFEIFER *et al*, 2003). Durante a resolução da infecção pelo HBV, os níveis de anti-HBs aumentam em relação aos de AgHBs após 4-6 meses (CDC, 1993). Anti-HBs garante imunidade vitalícia à maioria das pessoas (CDC, 1993). Anticorpos anti-HBs também aparecem no soro dos indivíduos vacinados contra o HBV (LEE, 1997). A correlação entre a presença de anti-HBs e desenvolvimento de imunidade protetora é de 97,6% (CDC, 1993).

Outro marcador imunológico de fase aguda, que foi utilizado durante muito tempo, é a IgM (imunoglobulina M) anti-HBc, que também é detectada durante as crises de hepatite crônica (HADZIYANNIS & VASSILOPOULOS, 2001; LOK & MCMAHON, 2007). Níveis de IgM anti-HBc aparecem logo após o AgHBs e persistem por 6-24 meses, quando dá lugar à IgG anti-HBc, durante a resolução da infecção (HADZIYANNIS & VASSILOPOULOS, 2001; LOK & MCMAHON, 2007). Ensaio comerciais detectam anticorpos anti-HBc total, IgM anti-HBc e a presença de IgG anti-HBc. Os pacientes que são negativos para o AgHBs, mas positivos para DNA-HBV, com ou sem a presença de anticorpos para HBV, correspondem à fase "oculta" da infecção (HATZAKIS *et al.*, 2006). Na infecção oculta pelo HBV, ensaios ultra-sensíveis de PCR com limites de detecção de menos de 10 cópias de DNA-HBV por reação devem ser empregados (LOK, 2004).

O AgHBs, antígeno de fase inicial da hepatite B, é uma proteína secretada no soro que é detectada pelos imunoenaios comerciais durante a infecção aguda pelo HBV, entre a sexta e a décima segunda semana após a exposição ao HBV e está relacionado com alta transmissibilidade, infectividade e replicação viral ativa (LOCARNINI *et al.*, 2003). A diminuição dos níveis de AgHBe está associada à soroconversão para anti-HBe. A persistência do AgHBe durante três a quatro meses significa um avanço para hepatite B crônica (HADZIYANNIS & VASSILOPOULOS, 2001). Quando a soroconversão para o anti-HBe ocorre em infecção crônica, os níveis de DNA-HBV podem cair (LOK & MCMAHON, 2007).

O ensaio de detecção do DNA-HBV com base na tecnologia Real Time-PCR tem uma maior sensibilidade e, portanto, fornecem melhor avaliação da replicação do HBV (LOCARNINI *et al.*, 2004).

Figura 1 - Interpretação dos resultados para testes sorológicos para hepatite B.

| Parâmetro | Resultado | Condição |
|--------------|-----------|--|
| AGHBs | Negativo | |
| Anti-HBc | Negativo | Negativo e susceptível |
| Anti-HBs | Negativo | |
| AGHBs | Negativo | |
| Anti-HBc | Positivo | Imune devido à infecção natural |
| Anti-HBs | Positivo | |
| AGHBs | Negativo | |
| Anti-HBc | Negativo | Imune devido à vacinação contra hepatite B |
| Anti-HBs | Positivo | |
| AGHBs | Positivo | |
| Anti-HBc | Positivo | Infecção Aguda |
| IgM anti-HBc | Positivo | |
| Anti-HBs | Negativo | |
| AGHBs | Positivo | |
| Anti-HBc | Positivo | Infecção Crônica |
| IgM anti-HBc | Negativo | |
| Anti-HBs | Negativo | |

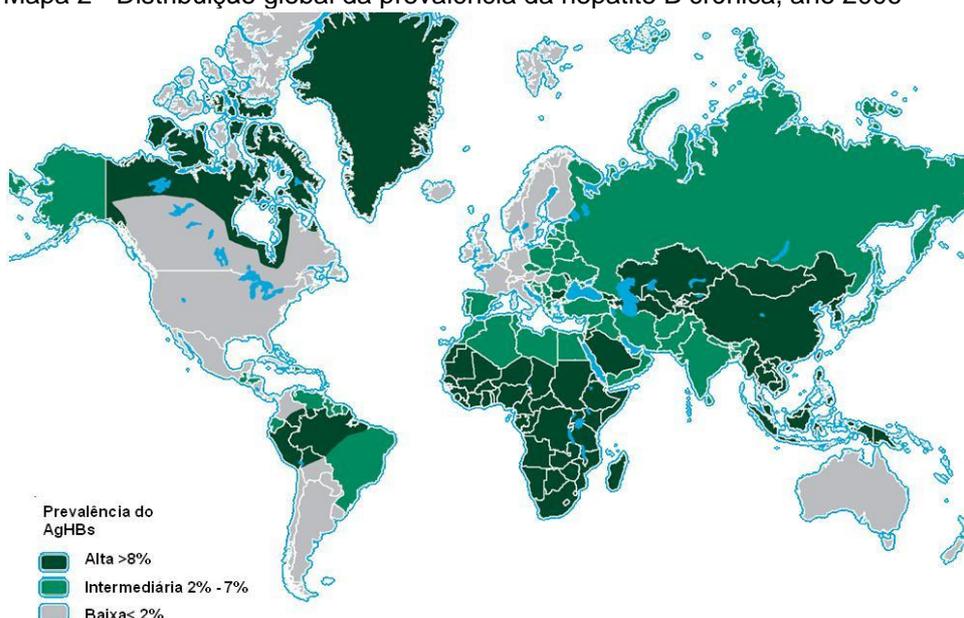
Fonte: CDC, 2005.

A Figura 1 resume a interpretação dos possíveis resultados dos testes sorológicos para hepatite B.

2.2.4 Epidemiologia

Estima-se que dois bilhões de pessoas no mundo estejam expostas ao Hepatitis B vírus (HBV), e que 400 milhões apresentem a infecção ativa (MAST, 1998). Mundialmente, a prevalência do HBV varia conforme a localidade estudada (OCAMA *et al.*, 2005). Em áreas hiperendêmicas, como a China, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e África Subsaariana, a taxa é superior a 8%, como demonstrado no Mapa 2, e a transmissão ocorre, principalmente, de mãe para filho no momento do parto, bem como por transmissão horizontal entre crianças menores de 5 anos, e em menor proporção da forma sexual entre adultos. Na América do Norte e na Europa, menos de 1% da população são portadores crônicos do vírus, como resultado do uso de drogas injetáveis, transmissão sexual, infecção hospitalar, ou a emigração de indivíduos de áreas endêmicas. Em 30% dos infectados, o modo de transmissão não está bem definido (MCQUILLAN *et al.*, 1999). Nos Estados Unidos, 1,25 milhões são portadores crônicos do HBV, e metade dos quais são americano-asiáticos (OCAMA *et al.*, 2005).

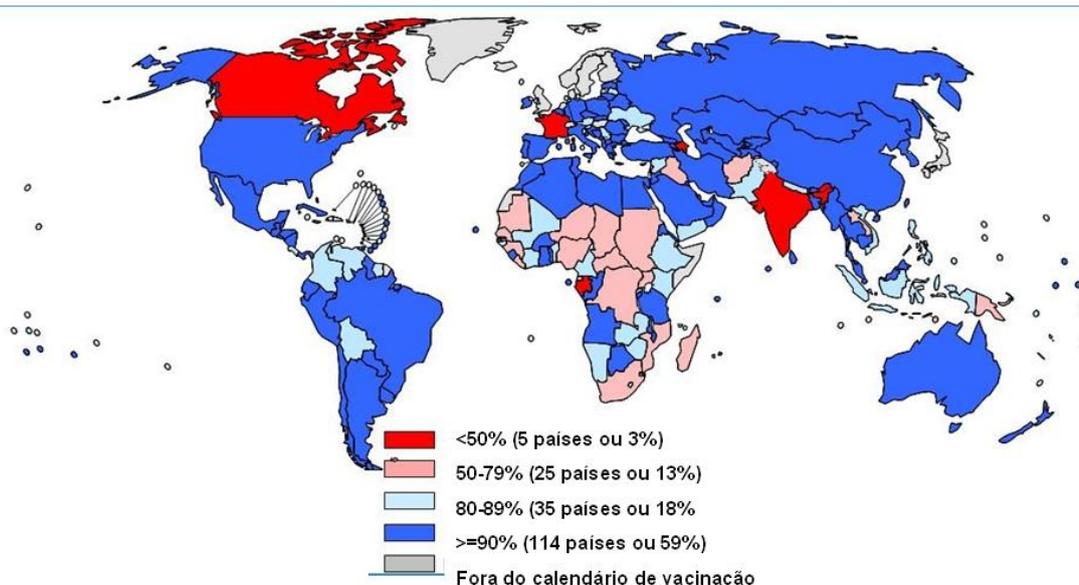
Mapa 2 - Distribuição global da prevalência da hepatite B crônica, ano 2006



Fonte: CDC, 2006. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b.htm>> Acesso em: 20 out. 2011.

Ocama *et al*, 2005 concluíram em seu trabalho que, devido à enorme carga do vírus da hepatite B em todo mundo e inúmeros avanços nos últimos anos, é surpreendente que mais progressos em limitar a infecção não tenham sido realizados. O número de casos de hepatite B aguda diminuiu 76% nos Estados Unidos entre 1987 e 1998, em grande parte devido às mudanças em grupos com comportamento de alto risco (OCAMA *et al*, 2005). No entanto, a hepatite B continuava a se espalhar em áreas endêmicas onde a rotina de vacinação ainda não tinha sido alcançada, destacando a importância da vacinação em massa (CDC, 1991), o Mapa 3 mostra a cobertura por imunização contra hepatite B em crianças, ano de 2010. Tudo isso mostra a importância mundial da infecção pelo HBV, sendo um problema de saúde pública.

Mapa 3 - cobertura por imunização com 3 doses de vacina contra hepatite B em crianças, ano 2010.



Fonte: WHO, 2011. Disponível em:

http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/HepB_map_schedule.jpg. Acesso em 20 out. 2011.

A prevalência da infecção pelo HBV no Brasil varia com a localização e o grupo populacional estudado. No Rio de Janeiro, entre usuários de drogas injetáveis, a prevalência encontrada para AgHBs positivo foi de 7,8% e de 55,8% para Anti-HBC (Oliveira *et al*, 1999). No estado do Paraná, Brasil, a prevalência de marcadores sorológicos para hepatite B em mulheres grávidas foi de 18,5%, variando de 7,2% em Curitiba a 38,5% em Francisco Beltrão (Bertolini *et al*, 2006).

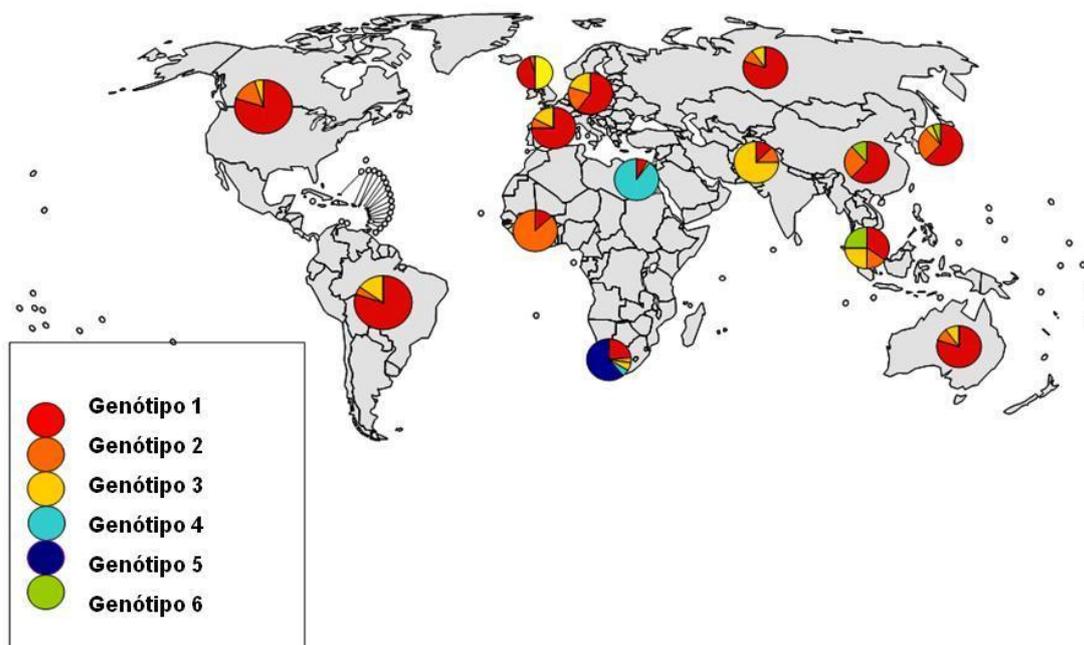
Entre pacientes de hemodiálise, a prevalência dos marcadores sorológicos anti-HBc e AgHBs foi de 34,1% e 15,4% respectivamente (Moreira, 2010).

2.3 HEPATITIS C VIRUS (HCV)

O Hepatitis C Virus (HCV) foi descrito pela primeira vez em 1989, como agente causador da hepatite não-A e não-B, pertence ao gênero *Hepacivirus* e família *Flaviviridae*, e foi reconhecido como um dos principais agentes causadores de doenças crônicas do fígado, incluindo hepatite crônica ativa, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHOO *et al.*, 1989). O HCV é um vírus de RNA com um genoma que contém cerca de 9600 nucleotídeos (TAKAMIZAWA *et al.*, 1991). As proteínas do núcleo de RNA do HCV têm capacidade de ligação com material genômico, sendo já relatado que estas proteínas induzem esteatose hepática em camundongos transgênicos e é um fator importante no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes com infecção crônica por HCV (ANZOLA, 2004). O envelope do HCV é formado pelas proteínas 1 e 2, cujas respectivas massas moleculares são aproximadamente 31 e 70 kDa. Elas interagem entre si podendo formar um heterodímero (CHOO *et al.*, 1991). A região codificante para o envelope 1 é utilizada em genotipagem, com fins clínicos (HOUGHTON *et al.*, 1991; FLORESE *et al.*, 2002). Os primeiros 81 nucleotídeos do envelope 2 são provavelmente a região hipervariável 1 (HVR1) do HCV. Essa região parece induzir a produção de anticorpos neutralizantes e poderia funcionar como um mecanismo de escape do sistema imune (BONKOVSKY & MEHTA, 2001). Já o envelope 2 provavelmente possui regiões de ligação para o CD81, uma proteína expressa nas membranas células de mamíferos, sendo possivelmente envolvida no mecanismo de invasão no hepatócitos (FERREIRA, 2004; LYRA *et al.*, 2004).

Há uma grande variação na seqüência genômica do HCV. Os diferentes genótipos foram reunidos em seis grupos principais e vários subtipos, sendo os mais freqüentes no Brasil os grupos 1, 2 e 3 (WHO, 2009; SIMMONDS, 1994). No Mapa 4 encontramos a distribuição mundial dos genótipos do HCV (WHO, 2009).

Mapa 4 - Distribuição global dos genótipos do HCV, 2009.

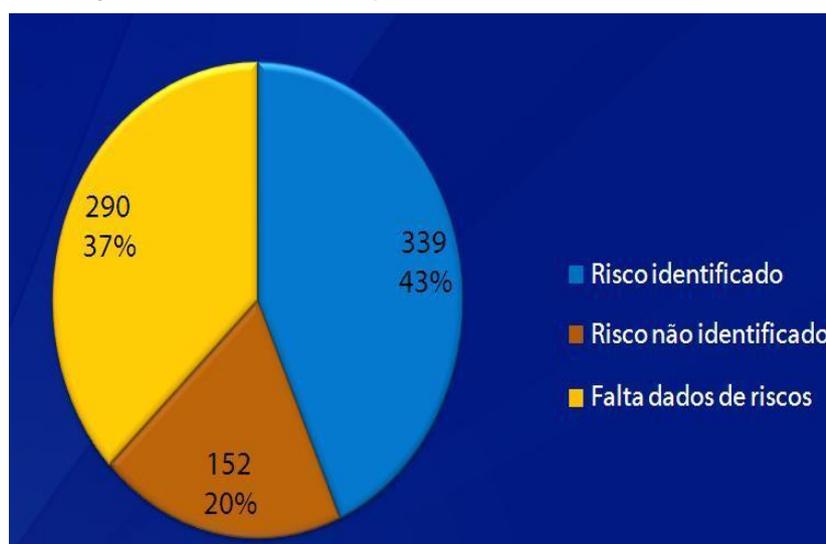


Fonte: WHO, 2009.

2.3.1 Transmissão do HCV

A transmissão da hepatite C faz-se essencialmente por contato com sangue e hemoderivados contaminados com o vírus, sendo de máximo risco os usuários de drogas ilícitas injetáveis, os poli-transfundidos, os pacientes submetidos à hemodiálise e os indivíduos que sofrem acidentes perfuro-cortantes com material contaminado (DINIS; PASSOS, 2003, TENGAN *et al.*, 2001, FERREIRA, 2004). O HCV persiste no sangue, fígado e linfócitos (STRAUSS *et al.*, 2001). O vírus já foi isolado na saliva, urina, sêmen e secreções vaginais, porém a real forma de transmissão através desses fluidos biológicos não está bem elucidada (LEÃO *et al.*, 2006; LEMOS & BENVENIGNÙ, 2004). Sabe-se que a transmissão vertical e a sexual são incomuns e que a transmissão parenteral é a principal rota de transmissão do HCV (DINIS; PASSOS, 2003; FERREIRA, 2004). A Figura 2 demonstra quais parcelas das populações analisadas nos Estados Unidos, em 2009, tinham ou não o risco de contaminação identificado (DINIS; PASSOS, 2003; FERREIRA, 2004).

Figura 2 - Identificação de fatores de risco para o HBV, Estados Unidos, 2009



Fonte: CDC, 2009.

2.3.2 Quadro Clínico/patogênese

A Hepatite C é, na maioria das vezes assintomática, dificultando o seu controle e facilitando sua disseminação na comunidade (ALTER, 1997). Geralmente, o diagnóstico é acidental, durante realização de pesquisa do anti-HCV em doadores de sangue ou quando é feita a avaliação de pacientes com elevação das aminotransferases. Porém, diagnósticos tardios são feitos em fases de descompensação da doença hepática (BONKOVSKY; MEHTA, 2001). Menos de 20% dos pacientes apresentam sintomas normalmente intermitentes e inespecíficos, sendo por isso também conhecida como “epidemia silenciosa” (BONKOVSKY; MEHTA, 2001).

Apenas 20 a 25% dos pacientes com infecção aguda livrar-se-ão da doença (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006), e o tempo para a depuração viral é de aproximadamente três anos. Nos homens, essa remissão espontânea é menos freqüente (MICALLEF *et al*, 2006). Por outro lado, cerca de 50 a 85% dos infectados evoluem lentamente para o estado crônico (WONG & LEE, 2006). Nas mulheres e crianças, essa evolução é mais lenta (SANTANA *et al.*, 2005). O risco para o desenvolvimento de hepatite C crônica é maior em indivíduos do sexo masculino, maiores de 25 anos, de etnia afro-americana, imunodeprimidos, co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana e assintomáticos (CHEN & MORGAN, 2006).

2.3.3 Diagnóstico Laboratorial

Após a identificação e caracterização molecular da hepatite “não-A e não-B” (CHOO *et al.*, 1989), vários testes diagnósticos baseados na detecção de anticorpos anti-HCV em amostras sorológicas foram desenvolvidos (CZEPIEL *et al.*, 2008). Atualmente, duas categorias de testes são utilizadas para o diagnóstico de pacientes infectados pelo HCV: testes sorológicos, que detectam anticorpos contra o HCV (anti-HCV) e testes moleculares que identificam, quantificam ou caracterizam componentes da partícula viral (JUSZCZYK, 2003). Um diagnóstico preciso da infecção pelo HCV é necessário antes de se tomar qualquer medida terapêutica (CZEPIEL *et al.*, 2008).

A primeira geração do teste ELISA, apresentado em maio de 1990, apresentou uma sensibilidade de 46%; na segunda geração (julho de 1991), a sensibilidade subiu para 60%; o teste RIBA-II (ensaio immunoblot recombinante II) apresentou sensibilidade de 90% sendo estes, até então, os melhores testes comerciais para a investigação da infecção por HCV (JUSZCZYK, 2003). Somados a eles, vieram os testes ELISA de terceira geração, apresentando sensibilidade e especificidade superiores a 99% (JUSZCZYK, 2003). Outro ensaio adicional foi o *Reverse Transcriptase*-PCR para detecção de RNA do HCV, o qual veio limitar ainda mais a chance de transmissão desse vírus por meio das transfusões sanguíneas (BOUVIER-ALIAS *et al.*, 2002; CZEPIEL *et al.*, 2008; GRETCH, 1997).

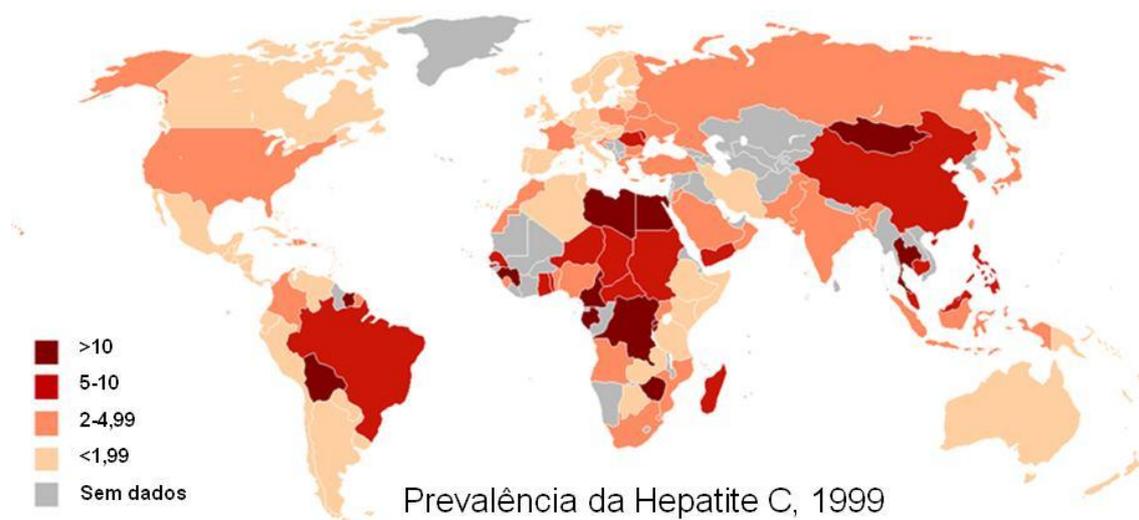
Apesar da alta sensibilidade destes testes, a infecção ainda pode ocorrer em pacientes imunodeprimidos, os quais podem não apresentar anticorpos anti-HCV passíveis de serem detectados. Nestes pacientes, outros tipos de investigações para confirmar a infecção por HCV devem ser realizadas. A pesquisa de material genético do HCV no soro deve ser usada como um dos critérios de diagnóstico. O *Reverse Transcriptase*-PCR possui sensibilidade de 98% e é o mais comumente utilizado com este objetivo (CZEPIEL *et al.*, 2008; GRETCH, 1997; JUSZCZYK, 2003).

2.3.4 Epidemiologia

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo Hepatitis C Virus (HCV), sendo um importante problema mundial de saúde pública e uma das principais causas de doença hepática crônica, cirrose, hepatocarcinoma e transplante hepático

(ANZOLA, 2004; CHEN & MORGAN, 2006). O Mapa 5 mostra a distribuição mundial da infecção pelo HCV, estimando-se que 130-170 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo HCV, o que corresponde a aproximadamente 3% da população mundial e 3-4 milhões sejam infectadas a cada ano. Além do mais, é relevante o número de pessoas que desconhecem a própria infecção, pois o quadro clínico da doença é geralmente assintomático (GABE & LARA, 2008).

Mapa 5 - distribuição mundial da prevalência da hepatite C, ano 1999.



Fonte: WHO, 2003.

No Brasil, vários pesquisadores estudaram a prevalência da infecção pelo HCV. Em Tamboroara, município do noroeste do estado do Paraná, a prevalência encontrada foi de 4,28% (Ivantes *et al*, 2010), esta alta prevalência sendo associada a históricos familiares. Outro estudo avaliou a prevalência desse vírus entre usuários de drogas, encontrando uma prevalência de 6,9% (Lopes *et al*, 2009). Na cidade de Salvador, entre pacientes de hemodiálise, a prevalência encontrada foi de 10,5% (Silva *et al*, 2006). A prevalência da infecção pelo HCV em comunidades quilombolas remanescentes, região central do Brasil, foi de 0,2% (Reis *et al*, 2008). A divergência entre as prevalências encontradas em vários estudos brasileiros pode ser devida as diversas metodologias aplicadas e a diferença no grupo populacional estudado, além do mais o Brasil é um país de proporções continentais, apresentando variações demográficas, sociais e culturais entre as diferentes regiões (Martins *et al*, 2010).

2.4 CO-INFECÇÃO ENTRE HIV, HCV E HBV.

As infecções pelo HBV, HCV e HIV compartilham as mesmas rotas de transmissão. Usuário de drogas injetáveis, pacientes de hemodiálise, receptores de transfusão sanguínea, profissionais da área de saúde, entre outros, fazem parte do grupo de risco, além da transmissão por via sexual e transversal. Com isso, a co-infecção do HIV com HCV ou HBV é comum (Morsica *et al*, 2009; Soriano *et al*, 2006; Alter, 2007; Lazarus *et al*, 2007; Portelinha *et al*, 2009; Rahimi-Movaghar *et al*, 2010).

Um estudo feito no Hospital Universitário da Universidade do Oeste Paulista avaliou a prevalência destes vírus em indivíduos selecionados a partir do ambulatório de infectologia; entre 1228 indivíduos selecionados, 44,9% apresentaram anticorpos contra HIV, HCV ou AgHBs, isolados ou associados. Anticorpos anti-HIV foram encontrados em 24,7% dos pacientes, sendo que 20,3% eram monoinfectados pelo HIV e 4,4% eram co-infectados com os vírus das hepatites C (4%) e B (0,4%) (Portelinha *et al*, 2009), confirmando a existência da co-infecção no Brasil.

2.5 IMUNOCROMATOLOGIA

Os testes de Imunocromatografia são atualmente utilizados para análises qualitativas, semi-quantitativas e para algumas monitorizações em ambientes não laboratoriais ou deficientes de recursos, sem acesso a aparelhos mais sofisticados (LEUVERING *et al.*, 1980; VAN *et al.*, 1993). Suas aplicações incluem pesquisa de antígenos, anticorpos, drogas, hormônios e metabólitos na biomedicina, fitosanitarismo e medicina veterinária (POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2009). Originalmente a técnica foi chamada de imunoensaio em partícula sólida (LEUVERING *et al.*, 1980). A imunocromatografia é importante para o diagnóstico de gravidez, injúria em órgãos internos (infarto do miocárdio, insuficiência renal ou diabetes), infecção ou contaminação com patógenos específicos (incluindo agentes de bioterrorismo), presença de compostos tóxicos em alimentos, ração ou meio ambiente e o abuso de drogas ilícitas (POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2009).

Existem variações nos formatos dos testes imunocromatográficos, podendo ser de fluxo lateral (Figura 3), fluxo vertical (Figura 4), dentre outros (VAN *et al.*, 1993; POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2009).

Figura 3 - Esquemática de Imunocromatografia de fluxo lateral.

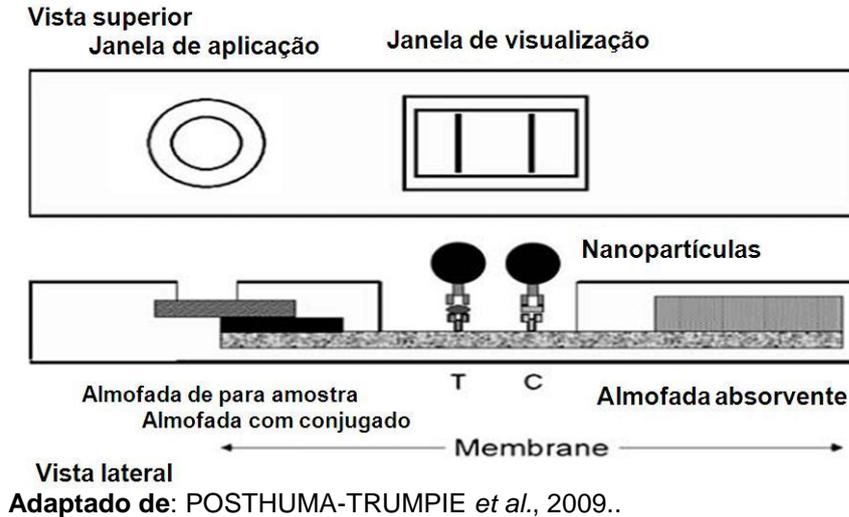
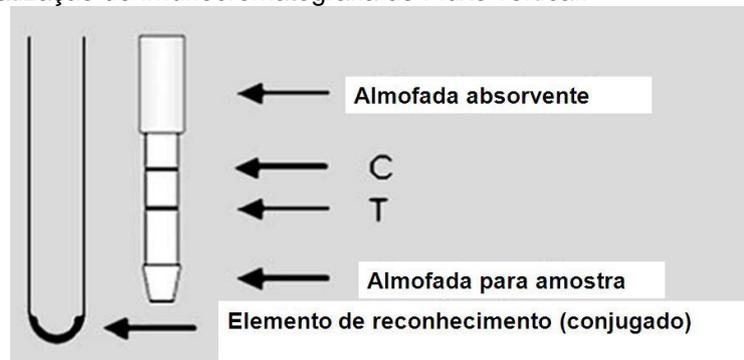


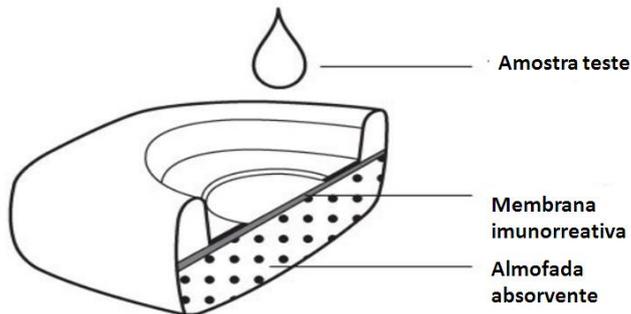
Figura 4 - Esquemática de Imunocromatografia de Fluxo vertical.



Adaptado de: (POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2009)

A empresa canadense Medmira desenvolveu um ensaio imunocromatográfico, que foi projetado para detectar, ao mesmo tempo, anticorpos específicos contra HIV, HCV e HBV. Ele é composto por um cassete imunocromatográfico; uma janela de aplicação da amostra e visualização do resultado; membrana imunorreativa e almofada absorvente. A membrana reativa possui quatro sensibilizações diferentes: uma linha controle sensibilizada com anticorpos anti-IgG humanos, e três pontos nos quais foi feita sensibilização com antígenos de HIV, HCV e HBV (Figura 5), (CHAN, 2003).

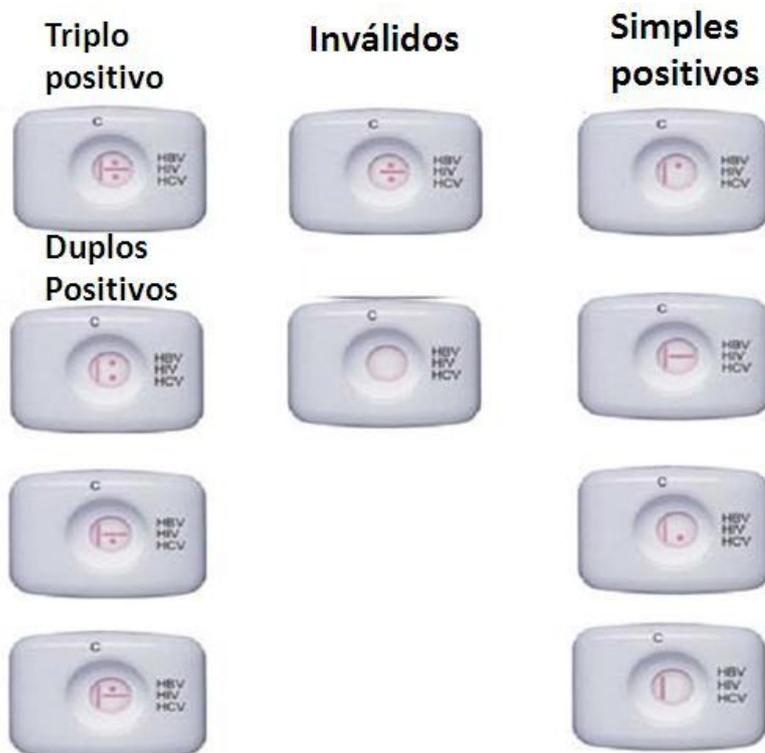
Figura 5 - Esquemática do corte lateral do Ensaio Imunocromatográfico Medmira, para detecção múltipla de anticorpos anti-HIV, HCV e HBV.



Adaptado de: CHAN, 2003.

A revelação do resultado é realizada através da proteína A conjugada com ouro coloidal. Esta proteína possui afinidade pela IgG humana, revelando a interação específica entre os possíveis anticorpos séricos e os respectivos antígenos sensibilizados nas linhas testes e também revela a interação, na linha controle, dos anticorpos anti-IgG com as IgG's encontradas na amostra clínica. Na Figura 6 encontram-se esquematizados diversos resultados possíveis ao se aplicar o ensaio imunocromatográfico Medmira (CHAN, 2003).

Figura 6 - Representação dos possíveis resultados com o teste Medmira.



Adaptado de: CHAN, 2003.

3 JUSTIFICATIVA

Com base nos achados epidemiológicos disponíveis e na importância mundial da AIDS, Hepatite B e Hepatite C e taxa de co-infecção, novos ensaios rápidos e práticos devem ser desenvolvidos para facilitar o diagnóstico dessas patologias, possibilitando o tratamento precoce e evitando a sua transmissão. Entretanto, essas novas tecnologias devem manter a qualidade (sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, valores preditivos), ou até mesmo aprimorá-las. Nesse contexto, estão os pesquisadores que contribuem com a indústria através do processo de validação desses sistemas analíticos, etapa esta de suma importância para que estas novas ferramentas de diagnóstico não ofereçam risco aos usuários, como o de obter falsos resultados negativos, culminando com pior prognóstico.

O Sistema Único de Saúde (SUS) apresenta gastos consideráveis com o transporte de amostras até Laboratórios Clínicos e com a transmissão dos resultados até pacientes e profissionais da saúde. Um ensaio imunocromatográfico, por não exigir equipamentos caros e sofisticados para a sua realização e por fornecer resultados em um curto espaço de tempo, atende à necessidade de diagnóstico sorológico de diversas enfermidades e triagens, devido ao início precoce de tratamento e medidas profiláticas.

O presente trabalho vem contribuir com esses objetivos supracitados, visto que o ensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos contra HIV, HCV e HBV possui uma metodologia de simples execução, além de ser um ensaio rápido, prático e de baixo custo, podendo ser realizado em postos de saúde e centros de atenção à saúde.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Validar o ensaio imunocromatográfico para a detecção múltipla de anticorpos específicos contra HIV, HCV e HBV através da verificação da sensibilidade, especificidade, índice kappa, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade do teste e da ocorrência de reações cruzadas com outros marcadores de doenças infecciosas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- Avaliar a existência de reação cruzada com amostras sorológicas com resultados positivos para os marcadores de outras infecções (Citomegalovírus, Rubéola, Doença de Chagas, Toxoplasmose, Herpes, Sífilis) e fator reumatóide, que tiveram resultados negativos para HIV, HBV e HCV com respectivos ELISA's imunoenzimáticos, com o ensaio imunocromatográfico Medmira.

5 ARTIGO A SER SUBMETIDO

VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOCROMATOGRAFICO PARA A DETECÇÃO MÚLTIPLA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA HIV, HBV E HCV.

Iury Oliveira Souza^{1*}, Robert Eduard Schaer¹, Fernanda Washington Lima², José Tadeu Raynal Filho¹, Thiago de Jesus Sousa¹, Roberto Meyer¹, Ricardo Wagner Portela¹

¹Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA

²Serviço de Investigação de Doenças Infecciosas, Escola de Farmácia, UFBA

Resumo: Cerca de 33,3 milhões de pessoas apresentam infecção pelo Human Immunodeficiency Virus (HIV) no mundo; 180 milhões estão infectados pelo Hepatitis C Virus (HCV), e estima-se que 360 milhões apresentam infecção ativa pelo Hepatitis B Virus HBV. Outra realidade mundial é a co-infecção entre esses vírus. Esses dados mostram a importância global dessas viroses e a urgência do desenvolvimento de novos ensaios de diagnóstico sensíveis, específicos, rápidos e de baixo custo, que possam atender à demanda de entidades públicas inseridas em programas para prevenção e diagnóstico dessas doenças. O presente trabalho consiste em uma validação relativa de teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos contra HIV, HCV e HBV. Os resultados encontrados foram extremamente favoráveis para a detecção de anticorpos específicos para HIV, apresentando 98,6% de sensibilidade e 100% de especificidade. Para o anti-HBV a sensibilidade e especificidade encontradas foram de 90,0% e 98,6%, e de 86,3% e 100%, para anti-HCV, respectivamente. Nenhuma reatividade cruzada foi encontrada e a reprodutibilidade e repetitividade foram de 100%. O índice kappa e acurácia do teste foram 0,91(0,88-0,94) e 95,5(93,5-97,5). Conclui-se que o ensaio imunocromatográfico é clinicamente útil em triagens rápidas para detecção de anticorpos anti-HIV, HCV e HBV.

Palavras-chave: HBV, HCV, HIV, imunocromatografia, diagnóstico, validação.

*Autor Correspondente: Iury Oliveira Souza

Endereço: Instituto de Ciências da Saúde, UFBA - Av. Reitor Miguel Calmon s/n,
Vale do Canela, Salvador, BA, Brasil, CEP 404140-100. Tel.: (+55) 3235-9682.

E-mail: iurao1@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Em 1972, uma partícula semelhante a vírus foi isolada em pacientes com hepatite, os quais apresentavam o então chamado antígeno australiano sérico, sendo que naquela época já era conhecida a relação entre alguns tipos de hepatite e esta proteína (9). Hoje esse vírus é conhecido como Hepatitis B Virus (HBV) e a proteína como antígeno de superfície do HBV (AgHBs). Este vírus pertence à família *Hepadnaviridae*, estimando-se que mais de 360 milhões pessoas seriam portadoras crônicas do vírus, aumentando o risco de seqüelas, tais como cirrose, falha hepática fulminante e carcinoma hepatocelular (16, 20). O conhecimento da estrutura bioquímica do HBV é fundamental para entender as diversas estratégias diagnósticas e seu tratamento; ele é composto por DNA como material genético e elementos estruturais tais como: antígeno core (AgHBc) envolvendo a DNA-polimerase e seu material genético, e o já citado AgHBs (o qual pode, clinicamente, servir como marcador de fase aguda), além do antígeno do envelope (AgHBe, sendo clinicamente reconhecido como marcador de replicação viral) (8). Há diversas formas de realizar o diagnóstico laboratorial da doença, dependendo da fase a ser identificada e do status do paciente com relação à imunoproteção (23).

Em 1974, determinou-se que 75% dos casos de hepatite associados à transfusão sanguínea tinham origem a partir de um vírus causador de hepatite não A e não B (NANBH); após 15 anos, esse vírus foi clonado, seqüenciado e classificado, fato que resultou no desenvolvimento do primeiro teste diagnóstico dessa infecção (1). Este agente ficou conhecido como Hepatitis C Virus (HCV), pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*. O HCV possui como material genético RNA, seu genoma é composto por codificadores de elementos estruturais (codificantes de proteínas do Core, "C"; e do envelope, "E1" e "E2") e elementos não estruturais ("NS1", "NS2", "NS3", "NS4" e "NS5"). O diagnóstico laboratorial para hepatite C é realizado através da pesquisa de anticorpos anti-HCV e pesquisa de seu RNA em amostras clínicas, além da avaliação bioquímica dos níveis séricos das transaminases (ASL/ALT) (6, 15). Estima-se que mais de 3% da população mundial está cronicamente infectada pelo HCV. Esta é a principal causa de dano hepático, cirrose e câncer hepático, levando a falha hepática e morte (17).

O Human Immunodeficiency Virus (HIV) foi descoberto na década de 80, pertence ao gênero *Lentivirus* e família *Retroviridae*, possui genoma diplóide

formado por duas cópias idênticas de RNA, genes estruturais *gag*, *pol*, *env* e uma combinação complexa de outros genes adicionais (23). Estima-se que 33,3 milhões de pessoas no mundo vivem com HIV; no entanto o número total de pessoas infectadas por esse vírus tem aumentado, principalmente porque novas infecções ocorrem a cada ano e o tratamento da AIDS prolonga a sobrevivência. Além disso, enquanto a maioria das pesquisas com HIV ocorrem em países desenvolvidos, o vírus é mais prevalente e menos controlado em contextos de recursos limitados, tais como África Subsaariana e no Sul e Sudeste da Ásia (23, 25, 26).

As infecções virais resultantes dos agentes apresentados acima compartilham rotas similares de transmissão e comportamentos de risco, sendo eles: usuário de drogas injetáveis, receptores de transfusão sanguínea, profissionais da área de saúde, pacientes em terapia renal substitutiva, além da transmissão vertical e sexual. Com isso, o risco de co-infecção é elevado (21). Estudos comprovam existência de pacientes co-infectados com esses vírus no Brasil (21); no Irã (22), e na Itália (19), aonde há alta correlação entre hepatite B oculta e co-infecção com HIV/HBV.

Com base na importância mundial das hepatites e da AIDS, seus impactos sociais e econômicos, complexidade das atuais ferramentas para diagnóstico laboratorial e risco de co-infecção, faz-se necessário a inovação no campo do diagnóstico dessas infecções, com o desenvolvimento de metodologias rápidas, práticas, acuradas, precisas e acessíveis aos governos de países em desenvolvimento. Assim, justifica-se a importância deste trabalho de validação, o qual contribui com os objetivos supracitados, ao avaliar a sensibilidade, especificidade, acurácia, repetitividade, reprodutibilidade e ocorrência de reações cruzadas, quando da utilização do ensaio imunocromatográfico *Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST*, para detecção múltipla de anticorpos anti-HBV, HCV e HIV.

MATERIAIS E MÉTODOS

TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

O ensaio imunocromatográfico *Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST*, desenvolvido pela empresa canadense MedMira®, consiste em um cassete imunocromatográfico contendo uma membrana de nitrocelulose sensibilizada com: uma linha contendo anti-anticorpos anti-IgG humanos (servindo de controle positivo); um ponto contendo antígeno de HIV (gp120), um ponto com antígeno de HCV (antígeno mosaico sintético formado por 6 peptídeos contendo entre 12-19 peptídeos da região Core, número de patente WO02/04484A2) e outro ponto com antígeno de HBV (antígeno sob processo de patenteamento). Resumidamente, o ensaio é confeccionado misturando-se 30ul de amostra de soro com 300ul de Tampão de Eluição. A solução resultante é aplicada no cassete de imunocromatografia, e incuba-se durante cinco minutos. Após esse período, é colocado dentro do cassete um “cap” contendo proteína A conjugada a ouro coloidal, e aplica-se 600ul de Tampão de Eluição para que o complexo proteína A – ouro coloidal se desprenda do cap e se difunda na membrana de nitrocelulose. Após esse procedimento, esperam-se mais cinco minutos, e então é realizada a leitura visual do resultado. A proteína A conjugada a ouro coloidal atua como revelador do teste, pois a proteína A possui afinidade seletiva para a fração FC da IgG humana, revelando a ligação específica antígeno-anticorpo nas respectivas regiões sensibilizadas, ficando essa região marcada de vermelho, no caso do controle e também da existência de anticorpos específicos para cada antígeno. Caso não ocorra o aparecimento da linha controle, o ensaio é considerado inválido e então deve ser repetido.

AMOSTRAS UTILIZADAS

A montagem da soroteca utilizada nesse estudo fez-se a partir de amostras sorológicas obtidas da rotina do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde UFBA, doadas gentilmente pelo Prof. Robert Eduard Schaer, e também amostras doadas pela Profa. Fernanda Washington Lima, do SIDI (Serviço de Investigação de Doenças Infecciosas, Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador). Foram escolhidas amostras com resultados positivos e negativos para presença de anticorpos específicos para HIV, HCV, e resultados positivos e

negativos para o antígeno AgHBs, como descrito na Tabela 1, testadas por ensaios de ELISA utilizados comercialmente, e tidos como ensaios de alta sensibilidade e especificidade. Os pacientes atendidos por esses laboratórios são usuários do Sistema Único de Saúde da cidade de Salvador e região metropolitana, estado da Bahia, Brasil. Escolheu-se o ELISA como ensaio de referência visto a sua utilização em larga escala no âmbito clínico-laboratorial, e também por sua alta especificidade e sensibilidade.

Investigou-se a interferência de anticorpos específicos para outros agentes infecciosos importantes do ponto de vista epidemiológico, além do fator reumatóide, no desempenho do Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST, utilizando-se amostras sorológicas com status positivos para a presença desses anticorpos, de acordo com ensaios comerciais utilizados rotineiramente em diagnóstico laboratorial e com alta especificidade e sensibilidade, e também com resultados negativos para HIV, HBV e HCV, como descrito na Tabela 2. Estas amostras sorológicas foram obtidas da rotina do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde UFBA, doadas gentilmente pelo Prof. Robert Eduard Schaer, e também amostras doadas pela Profa. Fernanda Washington Lima, do SIDI (Serviço de Investigação de Doenças Infecciosas, Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador).

A repetitividade e reprodutibilidade foram verificadas a partir de 1 pool de amostras positivas e 1 pool de amostras negativas para cada parâmetro do teste, totalizando 6 pools (HIV-positivo, HIV-negativo, HCV-positivo, HCV-negativo, HBV-positivo e HBV-negativo). Estas amostras foram testadas em 5 dias consecutivos (reprodutibilidade), e também cinco vezes no mesmo dia (repetitividade). Os resultados para esses parâmetros são expressos em porcentagem (%) de resultados concordantes, tanto para reprodutibilidade, quanto para repetitividade.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

De posse dos resultados no ensaio imunocromatográfico dos soros listados na Tabela 1, pode-se então compor tabelas de contingência dois-por-dois, através das quais podemos constatar a quantidade de amostras que apresentaram resultados Verdadeiramente Positivos (positivas no ensaio referência e positivas no ensaio imunocromatográfico) e Verdadeiramente Negativos (negativas no ensaio referência e negativas no ensaio imunocromatográfico), bem como as amostras Falso Positivas (negativas no ensaio referência e positivas no ensaio

imunocromatográfico) e Falso Negativas (positivas no ensaio referência e negativas no ensaio imunocromatográfico). Com esses resultados, pode-se então determinar os parâmetros Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e Acurácia do ensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti HBV, HIV ou HCV, e do ensaio como um todo, através das seguintes fórmulas:

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

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

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

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

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

Onde:

VP – Verdadeiramente Positivo

VN – Verdadeiramente Negativo

FP – Falso Positivo

FN – Falso Negativo

Para o cálculo do Índice Kappa, o qual representa a correlação estatística entre o conjunto de resultados das amostras nos dois testes diferentes, ou seja, o quanto que os dois testes possuem uma correlação de resultados corrigida estatisticamente, utilizou-se o software SPSS v. 12.0. O nível de concordância foi classificado como descrito por Landis e Koch, em 1977: 0 – sem concordância; 0 – 0,19 – concordância muito baixa; 0,20 – 0,39 – concordância baixa; 0,40 – 0,59 – concordância moderada; 0,60-0,79 – concordância substancial; 0,80-1,00 – alta concordância.

RESULTADOS

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO RELATIVA – HCV

Para o anti-HCV utilizamos 73 amostras sorológicas positivas no ELISA anti-HCV (Quarta Geração), e 70 amostras negativas também no mesmo ELISA (Tabela

1). Os resultados expressos na tabela de contingência (Tabela 3) mostram que, para estes parâmetros, obtivemos 10 resultados discordantes, sendo todos eles falsos negativos. A Sensibilidade encontrada a partir desses resultados foi de 86,3% (78,4-94,2), mas foi vista uma Especificidade de 100%, com Acurácia de 93% (Tabela 4)

Foi encontrado um Índice Kappa de 0,86 (0,80-0,92), considerado de alta concordância (Tabela 4) (Landis e Koch, 1977).

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO RELATIVA – HBV

Para definir os parâmetros de validação para anti-HBV, utilizamos 70 amostras com resultados positivos para AgHBs e 70 amostras com resultados negativos também para AgHBs (Tabela 1), e os resultados apresentados na tabela de contingência (Tabela 3) mostra que obtivemos oito resultados discordantes, sendo um falso positivo e sete falsos negativos, resultando em 90% (82,8-97,2) de Sensibilidade, 98,6% (95,7-101,4) de Especificidade e 94,3% (90,4-98,2) de Acurácia (Tabela 4).

Encontramos um Índice Kappa de 0,89 (0,83-0,94) para a correlação entre o ELISA e o ensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti-HBV (Tabela 4), o que pode ser considerado com alto nível de concordância de acordo com Landis e Koch, 1977.

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO RELATIVA – HIV

A tabela de contingência (Tabela 3) para os resultados de investigação de anticorpos anti-HIV no ensaio imunocromatográfico mostra que, das 140 amostras testadas, apenas 1 apresentou resultado discordante (falso negativo); a partir dessa análise foi obtida uma Sensibilidade de 98,6% (95,7-101,4%), Especificidade de 100%, e 99,3% (97,9-100,7) de Acurácia (Tabela 4)

O índice kappa foi estimado através da análise do grau de concordância entre os resultados obtidos com o *MultiploTM Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST* e os resultados prévios em ELISA para detecção de anticorpos anti-HIV, sendo que esse índice apresentou nível de 0,99 (0,97-1,01) (Tabela 4), sendo considerado de alta concordância.

DESEMPENHO GERAL DO ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO

Agrupando os resultados dos ensaios imunocromatográficos feitos com HIV, HBV e HCV (n=423) e construindo tabela de contingência geral (Tabela 3), encontramos valores para Sensibilidade, Especificidade, Índice Kappa, e Acurácia, os quais representam o desempenho geral do teste MedMira, representados na Tabela 4.

Foi encontrado um total de 19 resultados discordantes, sendo 18 falso negativos e 1 falso positivo. Com isso, pode-se determinar uma Sensibilidade de 91,5% (87,7-95,4), Especificidade de 99,5% (98,6-100,5), Acurácia de 95,5% (93,5-97,5), e um Índice kappa de 0,91(0,88-0,94), representando uma alta correlação entre o ensaio imunocromatográfico e os ensaios de ELISA referência.

REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE.

Todos os resultados dos ensaios realizados para verificação da repetitividade e da reprodutibilidade do ensaio foram concordantes, com isso encontramos 100% de repetitividade e 100% reprodutibilidade para detecção de anticorpos anti-HIV, HCV e HBV no ensaio imunocromatográfico MedMira.

REATIVIDADE CRUZADA

Quando observados os resultados dos soros listados na Tabela 2, verificou-se que nenhum deles apresentou resultado positivo no ensaio imunocromatográfico Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST; como estes soros foram todos testados anteriormente também para a presença de anticorpos anti-HIV, HBV e HCV, apresentando resultados negativos nos ensaios referências, tem-se como resultado então que anticorpos específicos para *Toxoplasma gondii* (IgM e IgG), *Trypanossoma cruzi* (IgG), Cytomegalovirus (IgM e IgG), vírus da Rubéola (IgM e IgG), Human Herpes Virus-1 (IgM e IgG), *Treponema pallidum* (IgG), e Fator Reumatóide não interferem no ensaio imunocromatográfico, não sendo fonte de reatividade cruzada.

DISCUSSÃO

A sensibilidade e especificidade encontradas para a pesquisa de anti-HBV foram respectivamente de 90% (82,8-97,2) e 98,6% (95,7-101,4) (Tabela 4). Em

estudos anteriores (12), os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo de validação, quando avaliaram um ensaio imunocromatográfico para detecção simultânea de AgHBs e AgHBe. Utilizou-se o imunoensaio enzimático para detecção de AgHBs e AgHBe como referência, assim como no presente estudo. A sensibilidade e especificidade encontradas para o AgHBs foram, respectivamente, 95% e 100%; para o AgHBe 80% e 98%, respectivamente.

Outro estudo (24) avaliou a sensibilidade e especificidade de um rapid strip assays (RSA) e enzima imunoensaio (EIA), ambos para detecção de AgHBs. A sensibilidade e especificidade para RSA foram de 43,5% e 95,8%, e de 77,4% e 97,9% para EIA. O valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram 87,1% e 72,2% para RSA, 96,0% e 86,9% para EIA, respectivamente. Os resultados encontrados no presente ensaio, (Tabelas 4 e 5) foram superiores aos encontrados neste estudo, entretanto o padrão ouro utilizado por eles foi a detecção direta do material genético viral, enquanto no presente ensaio utilizou-se a detecção de anticorpos como referência padrão.

Os resultados do ensaio imunocromatográfico Medmira para detecção de anticorpos específicos para HCV também apresentaram valores satisfatórios de especificidade e reprodutibilidade, porém a sensibilidade encontrada foi de 86,3% (78,3-94,3%), menor sensibilidade em comparação aos outros parâmetros (anti-HIV e anti-HBV). Entretanto este resultado é superior aos encontrados nos ELISA's de primeira e segunda geração, e similar ao do RIBA-II (recombinant immunoblot assay II), que apresentam sensibilidade de 46, 60 e 90%, respectivamente (3). Os ensaios atuais (ELISA de 3ª geração) e os atuais RIBA's possuem sensibilidades e especificidades superiores se comparados ao teste Medmira. Os ELISA's de terceira geração utilizam antígenos da região Core, enquanto o antígeno utilizado no Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST é um mosaico composto por 6 peptídeos da também da região core, o que pode limitar o universo de pacientes apresentando anticorpos para um número limitado de epitopos, mas ao mesmo tempo garante uma menor reatividade cruzada.

A menor sensibilidade observada para o parâmetro anti-HCV também pode ser justificada com base na soroteca utilizada, a qual foi composta por amostras com resultados positivos e negativos para anti-HCV utilizando o EIAGEN HCV Ab quarta geração Adaltis® (Bolonha, Itália). Estudos anteriores (2, 5, 27, 28) mostram elevada

freqüência de falso-positivos em testes EAI (enzima imunoenensaio), sendo necessária a confirmação do diagnóstico por métodos de detecção do RNA viral ou RIBA (recombinante immunoblot assay), fato que pode ter influenciado na validação Relativa do teste Medmira , visto que estes falso-positivos poderiam ser reconhecidos pelo teste Medmira como negativos, reduzindo sua sensibilidade.

Os melhores resultados desta Validação Relativa ocorreram com a detecção de anticorpos anti-HIV, a qual apresentou excelente visualização e ótimos valores para sensibilidade, 98,6% (95,7-101,4), e especificidade de 100%. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores (4) com um teste simples imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti-HIV no pré-parto, onde foi encontrada sensibilidade de 100% e especificidade de 99,5%. Duart e colaboradores defenderam o uso do teste rápido no pré-parto, pela possibilidade de agilizar uma série de medidas no sentido de iniciar a profilaxia para transmissão vertical, e iniciar o processo de aderência ao não aleitamento, além de ser uma opção para triagem em países com infra-estrutura laboratorial limitada (4). Alta concordância também foi encontrada em um novo ensaio imunológico envolvendo Imunofluorescência em paralelo a um microarray de antígenos recombinantes para HIV, HCV e sífilis, onde os autores encontraram 100% de concordância para amostras sorológicas HIV positivas e negativas (18).

Outros autores também avaliaram a acurácia dos testes imunológicos usados para triagem do HIV, em uma revisão sistemática (7); a sensibilidade encontrada para 13 diferentes métodos diagnósticos sorológicos utilizados para medir padrões populacionais de incidência variou de 42 a 100%, e a especificidade de 49,5 a 100%.

Outro estudo (13) avaliou a proficiência na interpretação de testes rápidos imunológicos aplicados à triagem do HIV em diversos laboratórios da Austrália, onde quatro (Determine™, Multispot, Uni-Gold™, Capillus™) das cinco ferramentas testadas obtiveram Acurácia entre 80 a 97%. A Acurácia encontrada com o teste Medmira foi de 99,3% (97,9-100,7), evidenciando também a clareza na distinção entre resultados positivos e negativos na metodologia do teste imunocromatográfico desenvolvido pela Medmira.

O índice Kappa para todos os parâmetros do teste imunocromatográfico foi considerado de alta correlação (valores acima de 0,80) (10, 11), (Tabela 4). Os valores de Acurácia também foram considerados excelentes (acima de 90%) sendo

de 93% (88,7-97,3) para anti-HCV; 99,3% (97,9-100,7) para anti-HIV e 94,3% (90,4-98,2) para anti-HBV. Este parâmetro é de grande valor em validação relativa de ferramentas diagnósticas.

A escolha dos marcadores sorológicos no ensaio de reatividade cruzada foi fundamentada na prevalência mundial daquelas infecções, e também na frequência de interferência do fator reumatóide em ensaios imunodiagnósticos. A frequência de resultados falsos positivos para HIV é preocupante na população tropical, sendo que a Doença de Chagas é um dos agentes influenciadores nos baixos valores preditivos positivos nessa população (14), entretanto não se encontrou interferência em soros positivos (IgG) anti-*Trypanossoma* no teste Medmira, os que tiveram resultados negativos no ensaio imunocromatográfico.

A tabela de contingência (Tabela 3) mostra que, no geral, obteve-se 18 resultados falso negativos e apenas 1 resultado falso positivo; isso influenciou a estatística geral do teste, com valor preditivo positivo de 99,5% (98,5-100,5), superando o valor preditivo negativo de 92,1 (88,5-95,7), e Sensibilidade de 91,5% (87,7-95,4), inferior a Especificidade de 99,5% (98,6-100,5). Apesar disso, a acurácia global e o índice kappa foram bastante satisfatórios, refletindo o alto grau de concordância do teste imunocromatográfico com os respectivos testes de referência utilizados (10–12)

O diagnóstico *in vitro* rápido por meio da imunocromatografia já demonstrou ser bastante útil na identificação de doenças entre doadores de sangue, em inquéritos populacionais e na prevenção de transmissão de infecções da gestante para o feto. A praticidade e o baixo custo do método permitiram aos gestores públicos aplicar o diagnóstico em grupos mais extensos e isolados da população, ainda que não apresentem sintomas das doenças. Pela via tradicional, devido à complexidade e ao valor do procedimento, que inviabilizam uma cobertura mais abrangente, o controle de epidemias e endemias é deficiente. Testes convencionais, tais como o ELISA, são mais caros e exigem pessoal treinado e equipamento especializado. A diferença entre o tempo médio necessário para o diagnóstico em comparação com outros métodos também é expressiva. Enquanto a imunocromatografia propicia leitura em 15 minutos, os métodos convencionais como ELISA e Imunofluorescência Indireta apresentam resultado em cerca de três horas, com a desvantagem adicional de que esta interpretação ocorre apenas em laboratórios especializados.

CONCLUSÕES

O ensaio de validação relativa demonstrou que o Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV ANTIBODY TEST, devido à sua rapidez, simplicidade e flexibilidade, e ótimos resultados encontrados, associados a uma ausência de reatividade cruzada, é ideal para triagem múltipla de anticorpos específicos contra o HIV, HCV e HBV em estudos populacionais, epidemiológicos e na prevenção de infecções transversais, em especial nas regiões do mundo onde a AIDS e as hepatites B e C são endêmicas, nos grupos de risco e em países com baixo desenvolvimento, nos quais esse teste viabilizaria uma triagem diagnóstica mais acessível para a população.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Sra. Francisca Soares pelo apoio técnico, à FAPEX pela garantia de recursos para realização dos experimentos, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-ICS, e à empresa Medmira pela cessão dos cassetes imunocromatográficos. Iury Oliveira Souza é bolsista de mestrado da CAPES. Ricardo Wagner Portela é bolsista de pós-doutorado da CAPES.

1 **TABELA 1.** Soros utilizados no estudo de determinação da sensibilidade e especificidade relativa do ensaio imunocromatográfico múltiplo, com seus
 2 respectivos ensaios comerciais de ELISA utilizados como referência, e seus parâmetros.
 3

| NÚMERO DE AMOSTRAS E STATUS SOROLÓGICO | ENSAIO UTILIZADO COMO REFERÊNCIA | SENSIBILIDADE/ESPECIFICIDADE DO ENSAIO REFERÊNCIA |
|---|---|--|
| 70 amostras positivas para presença de Anticorpos anti- HIV | ELISA DETECT-HIV Quarta Geração | 100% / 99,5% |
| 70 amostras negativas para presença de Anticorpos anti- HIV | Adaltis® (Bolonha, Itália) | |
| 73 amostras positivas para presença de Anticorpos anti- HCV | ELISA EIAGEN HCV Ab Quarta Geração | 99,5% / 100% |
| 70 amostras negativas para presença de Anticorpos anti- HCV | Adaltis® (Bolonha, Itália) | |
| 70 amostras positivas para presença de Antígeno AgHBs | ELISA EIAGEN HBSAG | 100% / 99,5% |
| 70 amostras negativas para presença de Antígeno AgHBs | Adaltis® (Bolonha, Itália) | |

4

1 **TABELA 2.** Soros utilizados no ensaio para determinação de reatividade cruzada, com seus respectivos ensaios utilizados como referência. Todas as
2 amostras eram negativas para anticorpos anti-HIV, HCV e HIV, de acordo com os ensaios referidos na Tabela1.

| Número de Amostras e Status Sorológico | Ensaio Referência |
|---|--|
| 10 amostras positivas para presença de IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i> | ELISA EIAGEN Toxo M Adaltis® (Bolonha, Itália) |
| 10 amostras positivas para presença de IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> | ELISA EIAGEN Toxo G Adaltis® (Bolonha, Itália) |
| 10 amostras positivas para presença de IgM anti- Human Cytomegalovirus | ELISA EIAGEN Cytomegalovirus IgM Adaltis® (Bolonha, Itália) |
| 10 amostras positivas para presença de IgG anti- Human Cytomegalovirus | ELISA EIAGEN Cytomegalovirus IgG Adaltis® (Bolonha, Itália) |
| 15 amostras positivas para presença de IgM anti- vírus da Rubéola | EIA WELL Rubeola IgM RADIM® (Pomezia, Italia) |
| 15 amostras positivas para presença de IgG anti- vírus da Rubéola | EIA WELL Rubeola IgG RADIM® (Pomezia, Italia) |
| 15 amostras positivas para presença de IgM anti- Human Herpes Virus-1 | EIA WELL Herpesvírus IgM RADIM® (Pomezia, Italia) |
| 15 amostras positivas para presença de IgG anti- Human Herpes Virus-1 | EIA WELL HERpesvírus IgG RADIM® (Pomezia, Italia) |
| 15 amostras positivas para presença de IgG anti- <i>Treponema pallidum</i> | EIAGEN TMPA IgG Adaltis® (Bolonha, Itália), |
| 10 amostras positivas para presença de IgG anti- <i>Trypanossoma cruzi</i> | ELISA EIAGEN Chagas Adaltis® (Bolonha, Itália) |
| 12 amostras positivas para presença de Fator Reumatóide | Orgentec® (Mainz, Alemanha) |

1 **Tabela 3.** Tabela de contingência dois por dois, com os resultados dos soros testados previamente
 2 em ensaios referência, após realização de ensaio imunocromatográfico.

| Multiplo™ Rapid HBV/HIV/HCV | | ENSAIO REFERÊNCIA | | |
|--|--------------|--------------------------|-----------------|--------------|
| | | POSITIVO | NEGATIVO | TOTAL |
| HIV | POSITIVO | 69 | 0 | 69 |
| | NEGATIVO | 1 | 70 | 71 |
| | TOTAL | 70 | 70 | 140 |
| HBV | POSITIVO | 63 | 1 | 64 |
| | NEGATIVO | 7 | 69 | 76 |
| | TOTAL | 70 | 70 | 140 |
| HCV | POSITIVO | 63 | 0 | 63 |
| | NEGATIVO | 10 | 70 | 80 |
| | TOTAL | 73 | 70 | 143 |
| TESTE GERAL | POSITIVO | 195 | 1 | 196 |
| | NEGATIVO | 18 | 209 | 227 |
| | TOTAL | 213 | 210 | 423 |

3

4

5

6 **Tabela 4.** Análise dos parâmetros de validação: sensibilidade, especificidade, índice kappa e
 7 acurácia, após realização de ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente
 8 testadas em ensaios utilizados como referência. Entre parênteses encontra-se o intervalo de
 9 confiança (95%).

| | SENSIBILIDADE | ESPECIFICIDADE | ÍNDICE | ACURÁCIA |
|--------------|----------------------|-----------------------|---------------|-----------------|
| | (%) | (%) | KAPPA | (%) |
| HIV | 98,6 | 100 | 0,99 | 99,3 |
| | (95,7-100) | (99,5-100) | (0,97-1,01) | (97,9-100) |
| HBV | 90 | 98,6 | 0,89 | 94,3 |
| | (82,8-97,2) | (95,7-100) | (0,83-0,94) | (90,4-98,2) |
| HCV | 86,3 | 100 | 0,86 | 93,0 |
| | (78,3-94,3) | (99,5-100) | (0,80-0,92) | (88,7-97,3) |
| TESTE | 91,5 | 99,5 | 0,91 | 95,5 |
| GERAL | (87,7-95,4) | (98,6-100) | (0,88-0,94) | (93,5-97,5) |

10

11

Tabela 5. Análise dos parâmetros de Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), Reprodutibilidade e Repetitividade, após realização de ensaio imunocromatográfico em amostras sorológicas previamente testadas em ensaios utilizados como referência. As fórmulas utilizadas para os cálculos encontram-se listadas na seção de Materiais e Métodos. Entre parênteses encontra-se o intervalo de confiança (95%).

| | VPP (%) | VPN (%) | REPRODUTIBILIDADE (%) | REPETITIVIDADE (%) |
|--------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| HIV | 100 (99,5-100) | 98,6 (95,8-100) | 100 (99,5-100) | 100 (99,5-100) |
| HBV | 98,4 (95,3-100) | 90,8 (84,2-97,4) | 100 (99,5-100) | 100 (99,5-100) |
| HCV | 100 (99,5-100) | 87,5 (80,1-94,9) | 100 (99,5-100) | 100 (99,5-100) |
| TESTE | 99,5 | 92,1 | 100 | 100 |
| GERAL | (98,5-100) | (88,5-95,7) | (99,5-100) | (99,5-100) |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alter, H.** 1999. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *Am. J. Med.* **107**:16S-20S.
2. **Contreras, A. M., C. M. Tornero-Romo, J. G. Toribio, A. Celis, A. Orozco-Hernández, P. K. Rivera, C. Méndez, M. I. Hernández-Lugo, L. Olivares, and M. a Alvarado.** 2008. Very low hepatitis C antibody levels predict false-positive results and avoid supplemental testing. *Transfusion* **48**:2540-2548.
3. **Czepiel, J., G. Biesiada, and T. Mach.** 2008. Viral hepatitis C. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **118**:734-740.
4. **Duarte, G., C. V. Gonçalves, A. C. Marcolin, M. C. Paschoini, S. M. Quintana, and M. M. Mussi-pinhata.** 2001. Teste Rápido para Detecção da Infecção pelo HIV-1 em Gestantes. *Rev Bras Ginecol Obstet.* **23**:107-111.
5. **Dufour, D. R., M. Talastas, M. D. a Fernandez, B. Harris, D. B. Strader, and L. B. Seeff.** 2003. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin. Chem.* **49**:479-486.
6. **GRETCH, D. R.** 1997. Diagnostic Tests for Hepatitis C. *Hepatology* **26**:43S-47S.
7. **Guy, R., J. Gold, J. M. G. Calleja, A. a Kim, B. Parekh, M. Busch, T. Rehle, J. Hargrove, R. S. Remis, and J. M. Kaldor.** 2009. Accuracy of serological

- assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* **9**:747-759.
8. **Hatzakis, A., E. Magiorkinis, and C. Haida.** 2006. HBV virological assessment. *J. Hepatol.* **44**:S71-S76.
 9. **Huang, S. N., I. Millman, a O'Connell, a Aronoff, H. Gault, and B. S. Blumberg.** 1972. Virus-like particles in Australia antigen-associated hepatitis. An immunoelectron microscopic study of human liver. *Am. J. Pathol.* **67**:453-470.
 10. **Khan, K. S., and P. F. Chien.** 2001. Evaluation of a clinical test. I: assessment of reliability. *BJOG* **108**:562-567.
 11. **Landis, J. R., and G. G. Koch.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**:159-174.
 12. **Lau, D. T.-Y., H. Ma, S. M. Lemon, E. Doo, M. G. Ghany, E. Miskovsky, G. L. Woods, Y. Park, and J. H. Hoofnagle.** 2003. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening. *J. Viral Hepat.***10**:331-334.
 13. **Learmonth, K. M., D. a McPhee, D. K. Jardine, S. K. Walker, T.-T. Aye, and E. M. Dax.** 2008. Assessing proficiency of interpretation of rapid human immunodeficiency virus assays in nonlaboratory settings: ensuring quality of testing. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1692-1697.
 14. **Lejon, V., D. M. Ngoyi, M. Ilunga, G. Beelaert, I. Maes, P. Büscher, and K. Fransen.** 2010. Low specificities of HIV diagnostic tests caused by *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2836-2839.
 15. **Marcellin, P.** 1999. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J. Hepatol. Suppl.* **31 Suppl 1**:9-16.
 16. **Mcmahon, B. J.** 2009. The Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* **49**:S45-S55.
 17. **Melnikova, I.** 2011. Hepatitis C - pipeline update. *Nat Rev Drug Discov* **10**:93-4.
 18. **Moll, K., K. Rowley, K. Vogel, C. Myatt, X.-Q. Zhang, C. Logan, C. Benson, S. Reed, and R. T. Schooley.** 2006. Rapid Multiplexed Immunoassay for Simultaneous Serodiagnosis of HIV-1 and Coinfections. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1-19.
 19. **Morsica, G., F. Ancarani, S. Bagaglio, M. Maracci, P. Cicconi, A. Cozzi Lepri, G. Antonucci, R. Bruno, T. Santantonio, L. Tacconi, F. Baldelli, R. Piscopo, D. Santoro, A. Lazzarin, and A. D'Arminio Monforte.** 2009. Occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients: correlation with

- hepatitis C virus coinfection, virological and immunological features. *Infection* **37**:445-449.
20. **Organization, W. health.** 2004. Weekly epidemiological record / Relevé épidémiologique hebdomadaire. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **79**:253-264. Disponível em: < http://www.who.int/wer/2004/wer7951_52.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011.
 21. **Portelinha Filho, A. M., C. U. D. Nascimento, T. N. Tannouri, C. Troiani, E. L. Ascêncio, R. Bonfim, L. A. Z. D'Andrea, and L. E. Prestes-Carneiro.** 2009. Seroprevalence of HBV, HCV and HIV co-infection in selected individuals from state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**:960-963.
 22. **Rahimi-Movaghar, A., E. M. Razaghi, E. Sahimi-Izadian, and M. Amin-Esmaeili.** 2010. HIV, hepatitis C virus, and hepatitis B virus co-infections among injecting drug users in Tehran, Iran. *Int. J. Infect. Dis.* **14**: e28-e33.
 23. **Requejo, H. I. Z.** 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Epidemiologia molecular do HIV no mundo.* *Aids* **40**: 331-345.
 24. **Seremba, E., P. Ocama, C. K. Opio, M. Kagimu, H. J. Yuan, N. Attar, D. L. Thomas, and W. M. Lee.** 2010. Validity of the Rapid Strip Assay Test for Detecting HBsAg in Patients Admitted to Hospital in Uganda. *J. Med. Virol.* **82**:1334-1340.
 25. **UNAIDS and WHO.** 2010. 2010: global view of HIV infection. Disponível em: <http://www.unaids.org/documents/20101123_2010_hiv_prevalence_map_em.pdf>. Acesso em 10 out. 2011.
 26. **UNAIDS and WHO.** 2009. AIDS epidemic update: December 2009. AIDS analysis Africa. Disponível em: http://data.unaids.org/pub/report/2009/jc1700_epi_update_2009_en.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011.
 27. **Watterson, J. M., P. Stallcup, D. Escamilla, P. Chernay, A. Reyes, and S. C. Trevino.** 2007. Evaluation of the Ortho-Clinical Diagnostics Vitros ECi Anti-HCV Test: Comparison With Three Other Methods. *J. Med. Virol.* **21**:162-166.
 28. **Wu, S., Y. Liu, L. Cheng, B. Yin, J. Peng, and Z. Sun.** 2011. Clinical Evaluation of the Signal-to-Cutoff Ratios of Hepatitis C Virus Antibody Screening Tests Used in China. *J. Med. Virol.* **83**: 1930-1937.

6 CONCLUSÃO

O presente ensaio de validação relativa realizado para o múltiplo teste imunocromatográfico Medmira evidenciou resultados satisfatórios para o mesmo, justificando a habilitação de seu uso em triagens clínicas rápidas em ambientes laboratoriais e não laboratoriais, para a pesquisa de anticorpos específicos contra Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis B Virus (HBV) e Hepatitis C Virus (HCV) sendo útil também em inquéritos epidemiológicos, entretanto resultados negativos obtidos para os parâmetros anti-HBV e anti-HCV não exclui a condição de portador da infecção devendo ser confirmados com outras metodologias.

REFERÊNCIAS

- ACEIJAS, C. STIMSON, G. V. HICKMAN, M.; RHODES, T. Global overview of injecting drug use and HIV infection among injecting drug users. **Aids**. v. 18, p. 2295-2303, 2004.
- ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, p. 625-55, 1997.
- ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal Gastroenterology**. v. 13, p. 2436-2441, 2007.
- ANZOLA, M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. **Journal of viral hepatitis**, v. 11, n. 5, p. 383-93, 2004.
- BARAL, S. BURRELL, E. SCHEIBE, A.; BROWN, B. BEYRER, C.; BEKKER, L. G. HIV Risk and Associations of HIV Infection among men who have sex with men in Peri-Urban Cape Town, South Africa. **BMC public health**, v. 11, n. 766, p 1-8, 2011.
- BERTOLINI, D. A.; PINHO, J. R. R.; SARACENI, C. P.; MOREIRA, R. C. GRANATO, D. F. H.; CARRILHO, F. J. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women form Paraná State, Brazil. **Journal of Medical and Biology Research**. v. 39, n. 8, 2006.
- BONILLA GUERRERO, R.; ROBERTS, L. R. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Journal of hepatology**, v. 42, n. 5, p. 760-77, 2005.
- BONINO, F.; BRUNETTO, M.R. Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, anti-HBe positive hepatitis B: an overview. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. S160-S163, 2003.
- BONKOVSKY, H. L.; MEHTA, S. Hepatitis C: a review and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 159-82, 2001.
- BOUVIER-ALIAS, M. PATEL, K. DAHARI, H. *et al.* Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 36, n. 1, p. 211-8, 2002.
- Branson, B.M. The future of HIV testing. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**. v. 55, n. 2, p. S102–S105, 2010.
- BRITO, A. M. DE; SOUSA, J. L. DE; LUNA, C. F.; DOURADO, I. [Trends in maternal-infant transmission of AIDS after antiretroviral therapy in Brazil]. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 18-22, 2006.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the

United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. Part I: Immunization of Infants, Children, and Adolescents. **Morbidity and Mortality Weekly**, v. 54, n. RR-16, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Sensitivity of the test for antibody to hepatitis B surface antigen— United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, n. 3, p. 393–408, 1993.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 38, n. 7, p. 1–7, 1989.

CHAN, H. K. W. RAPID DIAGNOSTIC DEVICE, ASSAY AND MULTIFUNCTIONAL BUFFER. **WO Pat.** 03/012443 A2. 13 fev. 2003.

CHEMIN, I.; ZOULIM, F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. **Cancer letters**, v. 286, n. 1, p. 52-9, 2009.

CHEN, S. L.; MORGAN, R.T. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **International Journal of Medical Sciences**, v.3 (2), p. 47-52, 2006.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. **International Journal of Medical Sciences**, v. 3 (2), p. 35-40, 2006.

CHOO, Q. L. KUO, G. WEINER, A J. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, 1989.

CHOO, Q. L.; RICHMAN, K. H.; HAN, J. H, BERGER K, LEE C, DONG C, ET AL. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 2451-5, 1991.

COELHO, H. C.; PERDONÁ, G. C.; NEVES, F. R.; PASSOS, A. D. C. HIV prevalence and risk factors in a Brazilian penitentiary. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**. v. 23, n. 9, p. 2197-2204, 2007.

CONJEEVARAM, H. S.; LOK, A. S. Management of chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 38, p. S90-S103, 2003.

CZEPIEL, J. BIESIADA, G.; MACH, T. Viral hepatitis C. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 118, n. 12, p. 734-40, 2008.

DELANEY, K.P; BRANSON, B.M; UNİYAL, A. *et al.* Evaluation of the performance characteristics of 6 rapid HIV antibody tests. **Clinical Infectious Diseases**. v. 52, n. 2, p. 257–263, 2011.

DENG, H.; FARZAN, M. SUN, Y. SULLIVAN, N. ROLLINS, B. PONATH, P. D.; WU, L.; MACKAY, C.R.; LAROSA, G. NEWMAN, W. GERARD, N. GERARD, C. SODROSKI, J. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. **Cell**, v. 85, p. 1135-1148, 1996.

DINIS, A.; PASSOS, C. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. **Medicina**, v. 1973, n. 4, p. 30-36, 2003.

FATTOVICH, G. Natural history of hepatitis B. **Journal of Hepatology**. V. 39, p. S50-S58, 2003.

FENG, Y.; BRODER, C. C.; KENNEDY, P. E.; BERGER, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, v. 272, p. 872-877, 1996.

FERNANDES, M. Z. MILITÃO, C. B.; LUZ, K. G. Incidência pós-transfusional do HBsAg em crianças com doenças neoplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 80-83, 2009.

FERRAZ, C. História natural da hepatite crônica B Natural history of chronic hepatitis B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 672-677, 2004.

FERREIRA, C. T. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, n. 4, p. 473-487, 2007.

FIEBIG, E.W; WRIGHT, D.J; RAWAL, B.D *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**. v. 17, n. 13, p. 1871-1879, 2003.

FLORESE RH, NAGANO-FUJII M, IWANAGA Y, HIDAJAT R, HOTTA H. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. **Virus Research**, v. 90(1-2): 119-131, 2002.

FORTES, H. M. RIBEIRO, L. C. PERAZOLO, G. F.; SOUTO, F. J. D. Hepatitis B virus screening in contacts of blood donors with antibodies against core protein (anti-HBC), but without surface antigen (HBsAg). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 195-9, 2006.

GABE, C.; LARA, G. M. HCV / HIV em um presídio feminino do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 87-89, 2008.

GARDNER, M. B.; ENDRES, M.; BARRY, P. A. The simian retroviruses: SIV and SRV, In: Levy, editor. **The Retroviridae**. New York (NY): Plenum Press: 1994, p. 133-276.

GRANATO, C. F. H. Uso clínico dos marcadores laboratoriais ligados à infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida do tipo 1 (HIV-1). **SBI**, v. 4 (4), 1996.

GRETCH, D. R. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. **Clinics in liver disease**, v. 1, n. 3, p. 543-57, 1997.

GUPTA, S.; ALTICE, F. L. Hepatitis B virus infection in US correctional facilities: a review of diagnosis, management, and public health implications. **Journal of Urban Health**, v. 86, n. 2, p. 263-79, 2009.

HADZIYANNIS SJ, VASSILOPOULOS D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **Hepatology**, v.34, p. 617-624, 2001.

HATZAKIS, A. MAGIORKINIS, E.; HAIDA, C. HBV virological assessment. **Journal of hepatology**, v. 44, n. 1 Suppl, p. S71-6, 2006.

HLADIK, F.; MCEL RATH, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 447-57, 2008.

HOUGHTON M, WEINER A, HAN J, KUO G, CHOO Q. L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, v. 14(2), p. 381-388., 1991.

HUI, C.K.; LEUNG, N.; YUEN, S. T.; ZHANG, H. Y, LEUNG, K. W.; LU, L.; CHEUNG, S. K.; WONG, W. M.; LAU, G. K. Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patients in immune-tolerant phase. **Hepatology**, v. 46, P. 395-401, 2007.

IVANTES, C. A. P.; SILVA, D.; MESSIAS-REASON, I. High prevalence of hepatitis C associated with familial history of hepatitis in a small town of south Brazil. Efficiency of the rapid test for epidemiological survey. **Brazilian Journal of infectious Diseases**. v.14, n. 5, p. 483-488, 2010.

JANSSEN, H. L.; VAN ZONNEVELD, M.; SENTURK, H. ET AL. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomized trial. **Lancet**, v. 365, P.123–129, 2005.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). The 2008 Report on the Global AIDS Epidemic. Geneva: **UNAIDS**; 2009.

JUSZCZY, K. J. Hepatitis C – **Handbook of diagnostics and antiviral treatment**. Poznań, Termedia, 2003.

KAHN, J.O; WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **New England Journal of Medicine**, v.339(1): 33-9, 1989.

KELLER G.H.; MANAK, M. M. Detection of HIV-1 nucleic acid in clinical samples using target DNA amplification and nonisotopic probes. In: KHAN, N. C. & MILNICK, J. L, eds. **Human Immunodeficiency Virus: innovative techniques**. Karger, Basel, p. 28-60, 1990.

KIDD-LJUNGGREN; MIYAKAWA, Y.; KIDD, A.H. Genetic variability in hepatitis B viruses. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1267-1280, 2002.

- LAZARUS, J.V; SHETE, P.B; ERAMOVA, I.; MERKINAITE, S.; MATIC, S. HIV/hepatitis co-infection in Eastern Europe and new pan-European approaches to hepatitis prevention and management. **International Journal of Drug Policy**. v. 18, p. 426-432, 2007.
- LEÃO, J.C.; TEO, C.G.; PORTER, S.R. HCV infection: aspects of epidemiology and transmission relevant to oral health care workers. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35 p. 295-300, 2006.
- LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, 1773-1745, 1997.
- LE MOS, J.; BENVENÙ, S.A. Frequência do vírus da hepatite C na região de abrangência do Hemopasso – Hemocentro Regional de Passo Fundo. **Revista Medica do HSVP**, v. 16 (35), p. 15-18, 2004.
- LEUVERING, J. H.; THAL, P. J.; VAN DER WAART, M. SCHUURS A. H.. Sol particle immunoassay (SPIA). **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**. v.1, p. 77–91, 1980.
- LOCARNINI, S. HATZAKIS, A. HEATHCORE, J. *et al.* Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. **Antiviral Therapy**, v. 9, n. 5, p. 679–693, 2004.
- LOK, A. S. F. Occult hepatitis B virus infection: diagnosis, implications and management. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, p.S114–S117, 2004.
- LOK, A. S. F.; MCMAHON, B J. Practice guidelines for chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 45(2), p. 507–539, 2007.
- LOK, A. S. F.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 45, p. 507-539, 2007.
- LOPES, C. L. R.; TELES, S. A.; LAMPE, E.; RODRIGUES, F. P.; MOTTA-CASTRO, A. R. C.; MARINHO, T. A.; REIS, N. R.; SILVA, A. M. C.; MARTINS, R. M. B. Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. **Revista Saúde Pública**. v.43, n. 1, p. 43-50, 2009.
- LUCIW, P. A. Human immunodeficiency virus and their replication. In: **Field Virology**. Editors, FIELDS, B. N.; KNIPPE, D. M; HOWLEY, P. M. Philadelphia (PA): Lippincott Raven: 1996, p. 1881-952.
- LYRA, A C. FAN, X.; BISCEGLIE, A M. DI. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 37, n. 5, p. 691-5, 2004.
- MACHADO, A. A. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). **Medicina**, n. 13, p. 138-146, 1999.

MARQUES, C. SOEIRO, D. O. MIRANDA, A. E. SARACENI, V.; LUCENA, N. O. D. Article / Artigo Mother-to-child transmission of HIV infection in Manaus , State of. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 933, p. 537-541, 2011.

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

MAST, E. E.; MAHONEY, F. J.; ALTER, M. J.; MARGOLIS, H. S. Progress toward Elimination of Hepatitis B transmission in the United States. **Vaccine**, v.16, p. S48-S51, 1998.

MCQUILLAN, G. M.; COLEMAN, P. J; KRUSZON-MORAN, D.; MOYER, L. A.; LAMBERT, S. B.; MARGOLIS, H. S. Prevalence of hepatitis B virus infection in the United States: the National Health and Nutrition Examination Surveys, 1976 through 1994. **American Journal Public Health**, v. 89, p. 14-18, 1999.

METCALF, J. A.; DAVEY, J. R. R. T.; LANE, H. C. Acquired immunodeficiency syndrome serologic and virologic tests. In : DE VITTA JR VT; HELLMAN S & ROSENBERG SA, eds. **AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention**. 4^a ed., J. B. Lippincott, Philadelphia, cap. 11, p. 177-95, 1997.

MICALLEF, J. M.; KALDOR, J. M.; DORE, G.J. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. **Journal of Viral Hepatology**, v. 13, p. 34-41, 2006.

MOREIRA, R. C.; DEGUTI, M. M.; LEMOS, M. F.; SARACENI, C. P.; OBA, I. T.; SPINA, A. M. M.; NASCIMENTO-LIMA, A. S.; FARES, J. AZEVEDO, T. S. GOMES-GOUVEA, M. S.; CARRILHO, F. J. PINHO, J. R. R. HBV markers in haemodialysis Brazilian patients: a prospective 12-month follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. v. 105, n. 1, p. 107-108, 2010.

MORSICA, G.; ANCARANI, F.; BAGAGLIO, S.; MARACCI, M.; CICCONE, P.; COZZI LEPRI, A.; *et al.* Occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients: correlation with hepatitis C virus coinfection, virological and immunological features. **Infection**, v.37, n. 5, p.445-9, 2009. doi: 10.1007/s15010-008-8194-9.

MUNOZ, A; WANG, M. C; BASS, S. ET AL. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) seroconversion in homosexual men. **American Journal of Epidemiology**, v. 30, p.530-9, 1989.

NETO, J. L. A.; PINTARELLI, V. L.; FELCHNER, P. C. Z.; MORAIS, R. L.; NISHIMOTO, F. L. HIV Prevalence Among Blood Donors in a Blood Bank in Curitiba (Brazil). **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. v. 6, n. 1, p. 15-21, 2002.

O'CONNELL RJ, PEEL SA. Multispot HIV-1/ HIV-2 Rapid Test: advantages over other rapid HIV tests. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v. 7, n. 5, p. 499–505, 2007.

OCAMA, P. OPIO, C. K.; LEE, W. M. Hepatitis B virus infection: current status. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 12, p. 1413, 2005.

OLIVEIRA, M. L. A.; BASTOS, F. I.; TELLES, P. R.; YOSHIDA, C. F. T.; SCHATZMYR, H. G.; PAETZOLD, U.; PAULI, G.; SCHREIER, E. Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 32, n. 9, p. 1107-1114, 1999.

OWEN, S.M; YANG, C; SPIRA, T. *et al.* Alternative algorithms for human immunodeficiency virus infection diagnosis using tests that are licensed in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 5, p. 1588–1595, 2008.

PARRY, J.V; MORTIMER, P.P; PERRY, K.R.; PILLAY, D.; ZUCKERMAN, M. Towards error-free HIV diagnosis: guidelines on laboratory practice. **Communicable Disease and Public Health**. v. 6, n. 4, p.334–350, 2003.

PFEIFER, K.; PELZER, C.; COLEMAN, P.; POPE, M.; KAPPRELL, H. P. Early detection of hepatitis B surface antigen-prototype of a new fully automated HBsAg microparticle enzyme immunoassay (MEIA). **Clinical Laboratory**, v. 49, 161–166, 2003.

PORTELINHA FILHO, A. M.; NASCIMENTO, C. U; TANNOURI, T. N.; TROIANI, C. ASCÊNCIO, E. L; BONFIM, R.; D'ANDREA, L. A. Z.; PRESTES-CARNEIRO, L. E. Seroprevalence of HBV, HCV and HIV co-infection in selected individuals from state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104, n. 7, p. 960-963, 2009.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A; KORF, J.; AMERONGEN, A. VAN. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Biochemistry**, v. 393, n. 2, p. 569-82, 2009.

RAHIMI-MOVAGHAR, A.; RAZAGHI, E. M.; SAHIMI-IZADIAN, E.; & AMIN-ESMAEILI, M. HIV, hepatitis C virus, and hepatitis B virus co-infections among injecting drug users in Tehran, Iran. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 1, p. e28-33, 2010. doi: 10.1016/j.ijid.2009.03.002.

REIS, N. R. S.; MOTTA-CASTRO, A. R. C; SILVA, A. M. C.; TELES, S. A.; YOSHIDA, C. F. T.; & MARTINS, R. M. B. Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in Quilombo Remnant Communities in Central Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 50, n. 6, p. 359-360, 2008. doi: 10.1590/S0036-46652008000600010.

REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV Epidemiologia molecular do HIV no mundo. **AIDS**, v. 40, n. 2, p. 331-345, 2006.

SANTANA, N. P.; FREITAS, L. A. R.; LYRA, A.C.; PARANÁ, R.; SANTANA, G.; TREPO, C.; ET AL. Liver histological alterations in patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels in the city of Salvador, Northeast-Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9 (2), p. 134-141, 2005.

SCHNEIDER, I. J. C.; RIBEIRO, C.; BREDÁ, D.; SKALINSKI, L. M.; d'ORSI, E. Perfil epidemiológico dos usuários dos Centros de Testagem e Aconselhamento do Estado de Santa Catarina, Brasil, no ano de 2005. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 7, p. 1675-1688, 2008.

SILVA, L. K.; SILVA, M. B. S.; RODART, I. F.; LOPES, G. B.; COSTA, F. Q.; MELO, M. E.; GUSMÃO, E.; REIS, M. G. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patient in Salvador, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, p. 595-602, 2006.

SILVA, M. D. O. BASTOS, M. NETTO, E. M. *et al.* Acute HIV infection with rapid progression to AIDS. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 291-3, 2009.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H. J.; BONINO, F.; BRADLEY, D.W.; BRECHOT, C. ET AL. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes [letter]. **Hepatology**. v. 19, p. 1321-4, 1994.

SORIANO, V.; BARREIRO. P.; NUÑEZ, M. Management of chronic hepatitis B and C in HIV-coinfected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 815-818, 2006.

STEVENSON, M. HIV-1 PATHOGENESIS. **NATURE MEDICINE**, V. 9, N. 7, P. 853-60, JUL 2003.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34 (1), p. 69-82, 2001.

TAKAMIZAWA A, MORI C, FUKU I ET AL. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **Journal of Virology**, v.65(3), p. 1105-1113, 1991.

UNAIDS AND WHO. **2010: global view of HIV infection**. Disponível em: <http://www.unaids.org/documents/20101123_2010_HIV_Prevalence_Map_em.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2011.

UNAIDS AND WHO. **AIDS epidemic update: December 2009. AIDS analysis Africa**. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/report/2009/jc1700_epi_update_2009_en.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2011.

UNAIDS, Health Canada, The Open Society Institute & The Canadian International Development Agency. The Warsaw Declaration: A Framework for Effective Action on HIV/AIDS and Injecting Drug Use. **Second International Policy Dialogue on HIV/AIDS**, Warsaw (Poland), 2003. Disponível em: <http://www.data.unaids.org/Publications/External-documents/warsaw_declaration_18nov03_en.pdf>. Acesso em 20 ago. 2011.

UNAIDS. **Report on the Global HIV/AIDS epidemic**. Geneva: UNAIDS; 2002. Disponível em:

<http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/report/2002/br_global_aids_report_en_pdf_red_en.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2011.

VAN, A. A.; WICHERS, J. H.; BERENDSEN, L. B. J. M.; TIMMERMANS, A. J. M.; KEIZER, G. D.; VAN DOORN, A. W. J.; BANTJES, A.; VAN GELDER, W. M. J. Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods—Quantitative computer image-analysis of results. **Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 185-195, 1993.

VIEIRA, A. C. B. C.; MIRANDA, A. E.; VARGAS, P. R. M.; MACIEL, E. L. N. Prevalência de HIV em gestantes e transmissão vertical segundo perfil socioeconômico, Vitória, ES. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 4, p. 644-654, 2011.

WHO. **Global distribution of HCV genotypes**. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/documents/ViralCancer7.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2011.

WONG, T.; LEE, S. S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174 (5), p. 649-659, 2006.