

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**APERFEIÇOAMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA O  
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE A**

**MARIA AMÉLIA DAS VIRGENS DE LIMA**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **APERFEIÇOAMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA O DIAGNÓSTICO DA HEPATITE A**

**MARIA AMÉLIA DAS VIRGENS DE LIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor de Paulo Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Orientador (es):** Dra. Vera de Souza Gouvêa  
Dra. Márcia Leite Baptista

**Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2006**

APERFEIÇOAMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA O  
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE A

Maria Amélia das Virgens de Lima

Orientador (es): Dra. Vera de souzaGouvêa

Dra. Márcia Leite Baptista

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovada por:

---

Presidente, Prof.

---

Prof.

---

Prof.

---

Prof.

---

Prof.

Lima. Maria Amélia das Virgens

Aperfeiçoamento de um teste imunoenzimático para o diagnóstico da hepatite A/ Maria Amélia das Virgens de Lima. Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPG/2005.

xv, 82f.: il.; 31cm

Orientador: Vera de Souza Gouvêa e Márcia Leite Baptista

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ IMPG/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), 2006.

Referências bibliográficas:

1. Introdução. 2. Relevância do Projeto. 3. Objetivos 4. Materiais e Métodos 5. Resultados. 6. Discussão. 7. Conclusões. 8. Perspectivas. 9. Referências Bibliográficas. 10. Anexos. I. Gouvêa, Vera de Souza e Baptista, Márcia Leite. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. III. Título.

Aos meus pais  
Meus irmãos Mônica e George  
Por todo carinho, amor, dedicação  
compreensão, apoio e incentivo.

O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos. (Lao-Tsé)

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Vera de Souza Gouvêa e à Dra. Márcia Leite Baptista pela orientação, atenção e paciência.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ.

Ao Antônio Gomes Pinto Ferreira por todo apoio e incentivo.

Aos meus chefes Raouf Emile Sykora, Emilson Domingos da Silva e Claudia Moraes Molinaro por todo carinho, respeito e compreensão.

À Lourdes pela essencial ajuda, colaboração e carinho.

Aos amigos Messias, Paula e Gerson pela amizade e ajuda.

Às amigas Ilka da Costa Ennes e Edinéa Pastro Mendes pelo apoio e amizade.

À amiga Elis por toda amizade, carinho e paciência.

A todos os amigos de Bio-manguinhos pelo apoio, carinho, amizade, cooperação.

A todos os amigos do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ pelo carinho e amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta dissertação.



## RESUMO

### APERFEIÇOAMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA O DIAGNÓSTICO DA HEPATITE A

Maria Amélia das Virgens de Lima

Orientador (es): Dra. Vera de Souza Gouvêa

Dra. Márcia Leite Baptista

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Microbiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Microbiologia.

A hepatite A constitui um problema de saúde pública, principalmente nas cidades em desenvolvimento, onde o número de jovens e adultos susceptíveis à infecção é grande, portanto emerge como uma nova doença com alto potencial em causar epidemias. A hepatite A é transmitida através de água e alimentos contaminados. O diagnóstico rápido, específico e seguro, utilizando um teste acessível é extremamente importante para o controle de surtos da doença.

Neste trabalho, foi aperfeiçoado um teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos da classe IgM contra o vírus da hepatite A (HAV), desenvolvido na FIOCRUZ, o qual utiliza misturas de soros humanos convalescentes conjugados à peroxidase e antígeno viral, altamente instável, produzido em cultura de células.

O desenho original do teste ELISA IgM ANTI-HAV CAPTURA DIRETO/ IOC foi modificado para um ELISA de captura indireto pela introdução de um conjugado anti-IgG humana comercial e o uso de antígeno viral liofilizado.

Foi também desenvolvido um simples e inteiramente novo ELISA direto que utiliza uma proteína recombinante, produzida em *Escherichia coli*, tendo como vantagens a estabilidade da proteína recombinante e principalmente a não utilização da mistura de soros humanos anti-HAV, como insumo. O novo ELISA

IgM ANTI-HAV – PROTEÍNA RECOMBINANTE/EXPERIMENTAL mostrou ser promissor e a utilização da proteína recombinante otimizou o ELISA para detecção anticorpos anti-HAV IgM.

Palavras-chave: HAV, ELISA.

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2006

## **ABSTRACT**

# **IMPROVEMENT OF AN ENZYME IMMUNOASSAY FOR HEPATITIS A OF THE DIAGNOSIS**

Maria Amélia das Virgens de Lima

Orientador (es): Dra. Vera de Souza Gouvêa

Dra. Márcia Leite Baptista

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Microbiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Microbiologia.

Hepatitis A constitutes a problem of public health, especially in developing cities where the number of youths and adults susceptible to infection is high. It therefore emerges as a new disease with a high potential for causing epidemics. Hepatitis A is transmitted through water and contaminated foodstuffs. The quick, specific and safe diagnosis, using an accessible test, is extremely important for the control of the disease outbreaks.

In this work, we improved an immunoenzymatic test (ELISA) for the detection of IgM class antibodies against the hepatitis A virus (HAV). This test – which was developed in FIOCRUZ – utilizes mixtures of convalescent human sera conjugated with peroxidase and highly unstable viral antigen produced in cell cultures.

The original design of DIRECT CAPTURE ELISA/ IOC IgM ANTI-HAV test was changed into an indirect capture ELISA by means of the introduction of a commercial human anti-IgG conjugate and the utilization of lyophilized viral antigen.

A simple and entirely new direct ELISA which utilizes a recombinant protein produced in *Escherichia coli* was also developed. The advantages of this new test

include the stability of the recombinant protein and, most importantly, the non utilization of the mixture of anti-HAV human sera as insume. The new RECOMBINANT PROTEIN ELISA/ EXPERIMENTAL IgM ANTI-HAV showed promising and the utilization of the recombinant protein optimized ELISA for the detection of anti-HAV IgM antibodies.

Key-words: HAV, ELISA.

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2006

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 - Hepatite.....	1
1.2 - Hepatite A.....	1
1.3 - Identificação do agente infeccioso.....	2
1.4 - Vírus da hepatite A.....	2
1.5 - Replicação viral.....	4
1.6 - Organização genômica.....	5
1.7 - Cepas e genótipos.....	7
1.8 - Cultivo celular do HAV.....	9
1.9 - Características clínicas.....	9
1.10 – Epidemiologia.....	11
1.11 - Prevenção e controle.....	12
1.12 – Diagnóstico.....	14
1.13 - ELISA (Ensaio imunoenzimático).....	16
<b>2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 - Objetivo geral.....	21

3.2 - Objetivos específicos.....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 - Amostras analisadas.....	22
4.2 - Produção do antígeno HAV.....	23
4.3 - Produção do conjugado.....	22
4.4 - Produção do anticorpo IgG anti-HAV.....	23
4.5 - Testagem da estabilidade do antígeno HAV, através do EIE-CD/ IOC.....	24
4.5.1 – Após a adição de criopreservadores.....	24
4.5.2 - Após liofilização.....	24
4.5.3 - Após ciclos de congelamento/ descongelamento.....	25
4.6 - Proteína recombinante.....	25
4.7 - ELISA comercial para pesquisa de anticorpos anti-HAV IgM.....	26
4.8 - ELISA IgM anti-HAV captura direto/IOC (EIE-CD/ IOC).....	27
4.9 - ELISA IgM anti-HAV captura indireto/Experimental (EIE-CI/ EXP).....	28
4.10 - ELISA IgM anti-HAV proteína recombinante (EIE-PTNREC/ EXP).....	30
4.10.1 - Método 1.....	31
4.10.2 - Método 2.....	33
4.10.3 - Método 3.....	35
4.10.4 - Método 4.....	37
4.11 - Dosagem protéica pelo método de Folin-Lowry.....	39
4.11.1 - Cálculos da concentração protéica por orifício da microplaca.....	39
4.11.1.1 - Proteína recombinante.....	39
4.11.1.2 - HAV de cultivo celular.....	39
4.12 - Análise estatística.....	40
4.12.1 - Sensibilidade e especificidade.....	40

4.12.2 - Testes de concordância.....	40
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1 - ELISA IgM anti-HAV captura direto X ELISA IgM anti-HAV captura indireto.....	41
5.1.1 - Comparação dos resultados dos EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.....	42
5.1.2 - Comparação da especificidade e sensibilidade dos EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.....	48
5.2 - Avaliação da estabilidade do antígeno HAV pelo EIE-CD/IOC.....	48
5.2.1 - Avaliação após a adição de crio preservadores.....	48
5.2.2 - Avaliação após o processo de liofilização.....	49
5.2.3 - Comparação dos resultados da análise dos soros por EIE-CD/ IOC utilizando as mesmas alíquotas do antígeno controle e do antígeno liofilizado, submetido a ciclos de congelamento/descongelamento.....	51
5.3. ELISA IgM anti-HAV– proteína recombinante .....	53
5.3.1 - Comparação dos resultados obtidos no EIE-PTNREC/ EXP com os demais testes.....	53
5.3.2 - Dados de discordância entre o EIE-PTNREC/ EXP e os demais testes.....	55
5.3.3 - Sensibilidade e especificidade do EIE-PTNREC/ EXP.....	56
5.3.4 - Estabilidade da proteína recombinante.....	56
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
6.1 - Análise comparativa entre o EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.....	57
6.2 - Análise da estabilidade do antígeno HAV.....	59
6.3 - Análise da utilização da proteína recombinante nos testes imunoenzimáticos.....	60
<b>7 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>8 – PERSPECTIVAS.....</b>	<b>64</b>

**9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....65**

**10 – ANEXOS.....80**



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Hepatite A**

A hepatite A é uma doença de ampla distribuição geográfica sendo uma das maiores causas de hepatites virais agudas em todo mundo, ocorrendo tanto na forma epidêmica como na forma endêmica.

Epidemias desta doença foram descritas na literatura, principalmente durante as guerras, quando grandes concentrações de pessoas contribuíram para a disseminação da doença, mas foi somente no século XX que a hepatite A foi reconhecida como um importante problema de saúde pública (Hollinger & Ticehurst, 1996). Esse fato motivou muitos pesquisadores no estudo da hepatite A, contribuindo para conhecimento da sua etiologia viral, forma de transmissão, e assim como sobre a existência das formas subclínicas e anictéricas, como elo importante na cadeia de transmissão da doença (Holmes e cols, 1969; Lorenz e cols, 1970; Holmes e cols, 1971 e 1973; Maynard e cols, 1975).

### **1.2. Identificação do agente infeccioso**

Em 1973, o vírus da hepatite A foi identificado por Feinstone e cols, que conseguiram visualizar, por imunomicroscopia eletrônica, partículas esféricas de 27nm de diâmetro em fezes de indivíduos voluntários adultos, inoculados com uma cepa MS-1 do vírus da hepatite A (HAV), assim confirmando a relação entre essas partículas e a infecção pelo HAV. Após a identificação do agente etiológico, iniciou-se o desenvolvimento de técnicas e métodos que pudessem detectar e/ou quantificar o antígeno da hepatite A, como fixação de complemento (Provost e cols, 1975) e radioimunoensaio em fase sólida (Hollinger e cols, 1975; Purcell e cols, 1976). Em 1979, o cultivo do HAV em um sistema “in vitro” de cultura celular (Provost & Hilleman), representou um marco importante na história da hepatite A. A cepa MS-1 juntamente com a cepa HM-175, entre outras, passaram a servir como vírus protótipos para estudos da hepatite A no homem, em animais de experimentação, em

culturas de células, na análise molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), no sequenciamento nucleotídico e de aminoácidos e no desenvolvimento de vacinas sejam elas inativadas, atenuadas ou recombinantes.

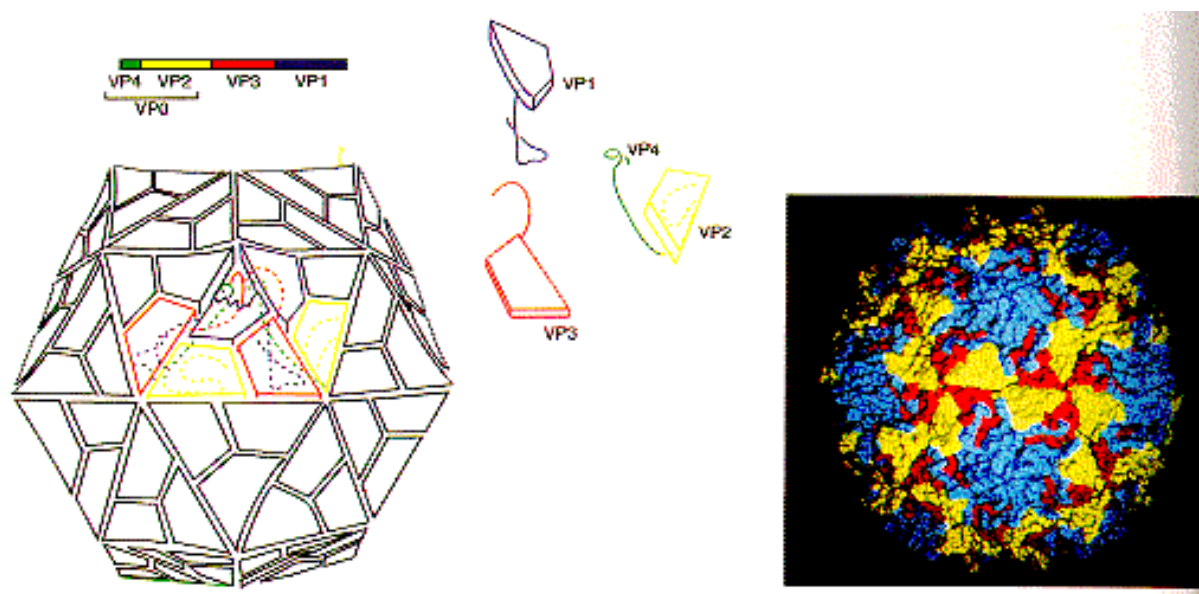
### 1.3. Vírus da hepatite A

O vírus da hepatite A está classificado na família *Picornaviridae*, no gênero *Hepatovirus* (Minor, 1991), sendo caracterizado pelo seu pequeno tamanho. Possui forma esférica, mas por análise estrutural fina, demonstra simetria icosaédrica (Feinstone e cols, 1973), ausência de envelope, com um diâmetro de aproximadamente 27 nm. O capsídeo é composto por 60 capsômeros, constituídos por quatro polipeptídeos distintos denominados VP1, VP2, VP3 e VP4, com pesos moleculares de aproximadamente 33,2 kDa; 24,8 kDa, 27,8 kDa e 14,0 kDa, respectivamente. (Figura 1). O virion possui um coeficiente de sedimentação de 150-160S em solução neutra de sacarose e densidade de 1,33- 1,34 g/cm<sup>3</sup> em cloreto de céσιο (Bradley e cols., 1978; Siegl & Frosner, 1978).

A partícula viral é relativamente resistente à inativação pelo calor a 60°C por uma hora, éter e em meio ácido, a sua infecciosidade podendo ser mantida a -20°C durante anos (Provost & Hilleman, 1979). O vírus mantém sua infecciosidade em pH 1,0 a 38°C por 90 minutos. Ele é inativado pelo formol a 0,02% a 37°C por 72 horas ou 3% por cinco minutos, pelo tratamento com cloro livre em concentração de 1mg/L durante trinta minutos, assim como pelo permanganato de potássio (30mg/L) durante cinco minutos, e solução de glutaraldeído a 2%. A infecciosidade do HAV é diminuída com etanol a 70% a 25°C. Em relação aos agentes físicos, o vírus é destruído pela autoclavação a 120°C durante vinte minutos, pelo aquecimento a 100°C durante cinco minutos (Provost & Hilleman, 1979). Possui ainda a característica de uma difícil propagação em cultura de células, com replicação muito lenta e ausência de efeito citopático (Siegl, 1988 e 1992).

O HAV está presente nas fezes de indivíduos infectados, durante o final do período prodrômico da doença e no início dos sintomas, sendo através dessas eliminado para o meio exterior. É um dos vírus mais resistentes às condições

ambientais, conservando sua infecciosidade nas fezes, por pelo menos duas semanas, e em ambiente seco, por uma semana (Sobsey e cols, 1988). Já foi demonstrado experimentalmente que as partículas virais permanecem estáveis, durante dias ou até mesmo meses, em água doce, água do mar, esgotos, solos, sedimentos marinhos e ostras (Sobsey e cols, 1988).



**Figura 1:** Esquema tridimensional da simetria icosaédrica do HAV e ilustração da micrografia eletrônica das subunidades da partícula viral de um picornavirus (Hollinger & Ticehurst, 1996).

#### 1.4. Organização genômica.

O genoma do HAV é constituído de RNA de fita simples (Coulepis e cols, 1981), com aproximadamente 7500 nucleotídeos de comprimento (Ticehurst e cols, 1983). O RNA genômico possui polaridade positiva (Locarnini e cols, 1981), portanto, funciona como RNA mensageiro, sendo diretamente traduzido nas diferentes proteínas virais necessárias à replicação viral (Hollinger & Ticehurst, 1996).

O RNA genômico pode ser dividido em três regiões distintas. Uma região 5' não codificante (5'NC) que corresponde aproximadamente a 10% do genoma (734 a 740 bases nucleotídicas) e tem uma pequena proteína viral denominada VPg, ligada covalentemente a extremidade 5' da região 5'NC, proteína que tem papel importante na iniciação da transcrição (forma o sítio de entrada do ribossoma) (Cuthbert, 2001).

Uma região 3' curta (40 a 80 nucleotídeos), também não codificante (3'NC), que contém na extremidade 3' uma seqüência poliadenílica (Coulepis e cols, 1981). Essa região possui alta variabilidade, acima de 20%, entre cepas padrões e mutantes do HAV (Hollinger & Emerson, 2001). Entre as extremidades 5'NC e 3'NC situa-se uma única e longa fase de leitura aberta (ORF), com mais de 7000 bases (Hollinger & Ticehurst, 1996), a qual, quando traduzida, origina uma única poliproteína com cerca de 2225 aminoácidos. Uma série de clivagens proteolíticas da poliproteína originará as diferentes proteínas virais maduras (Palmenberg, 1990). Esta poliproteína pode ser dividida, funcionalmente em três regiões designadas P1, P2 e P3.

O segmento P1 origina as quatro proteínas que formam o capsídeo viral VP1, VP2, VP3 e VP4 (Figura 2). VP1 e VP2 foram identificadas como as principais proteínas de superfície (Hughes e cols, 1984). A conformação das proteínas VP1 e VP3 formam um simples e dominante epítipo sorológico que estimula uma resposta de anticorpos neutralizantes (Cuthbert, 2001). A pequena proteína VP4, apesar de mostrar ser essencial para a formação do virion, não pôde ser identificada nas partículas virais maduras (Probst e cols, 1999).

Os segmentos P2 e P3 codificam as proteínas 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D que não fazem parte do capsídeo viral (Rueckert & Wimmer, 1984). Estas proteínas estão envolvidas nos processos de síntese de RNA e formação do virion. A região VP1/2A apresenta alta variabilidade nas seqüências de aminoácidos e nucleotídeos, portanto, é utilizada na classificação genotípica das cepas do HAV (Robertson e cols, 1992). As proteínas 2B e 2C possuem um importante papel na replicação viral (Ticehurst e cols, 1989) sendo encontradas ligadas na forma 2BC. A forma 2BC possui a propriedade de associar-se com aminoácidos nas membranas intracelulares e induzir rearranjos estruturais, nessas membranas. A proteína 2C é considerada uma helicase (Teterina e cols, 1997). A proteína 3A, provavelmente ajuda no ancoramento do complexo replicativo à membrana celular, a 3B (VPg), e está envolvida na iniciação

da síntese de RNA (Weitz e cols. 1986). A proteína 3C é a única protease do HAV (Allaire e cols, 1994) e a proteína 3D possui a função de RNA polimerase, sua seqüência de aminoácidos apresentando uma alta similaridade com a de outros picornavirus (Hollinger & Ticehurst, 1996). (Figura 2).

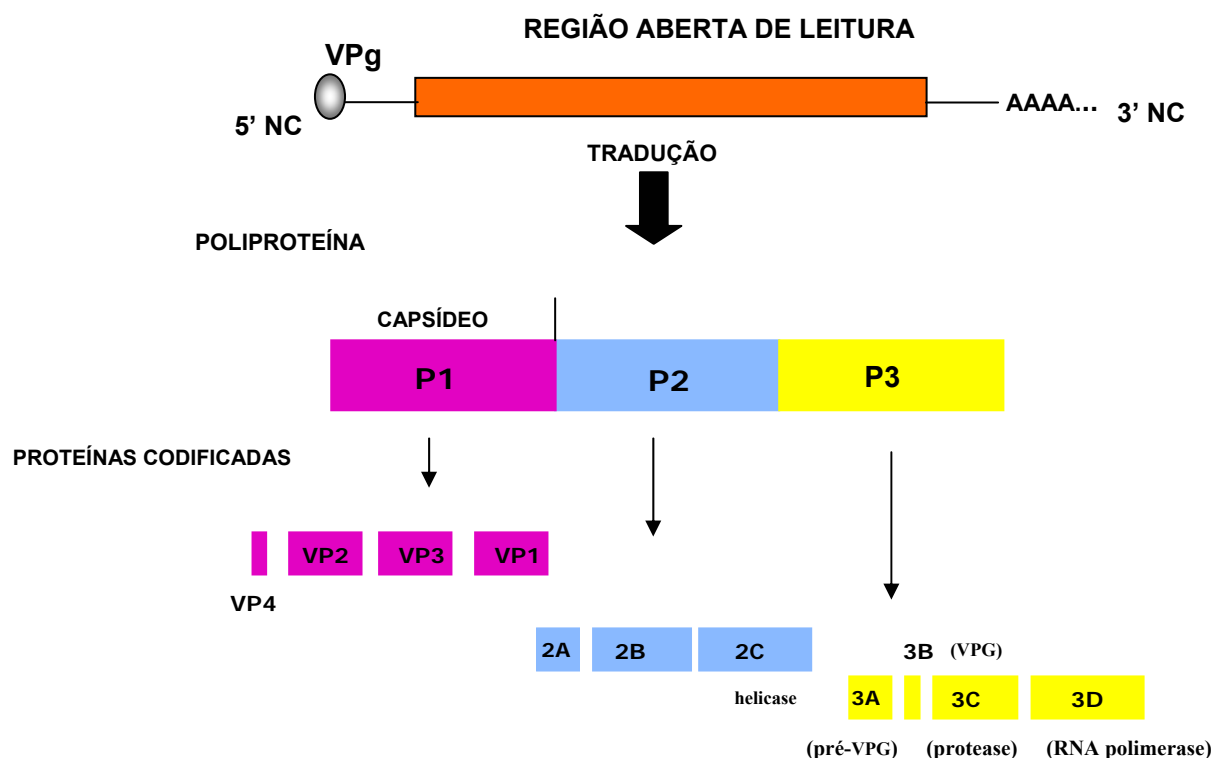
### **1.5. Replicação viral.**

Após a ingestão, o que ocorre com as partículas virais não é ainda bem conhecido (Cuthbert, 2001). Estudos em modelos experimentais mostram que o HAV é absorvido, mas pode infectar células epiteliais da mucosa digestiva onde é replicado (Purcell & Emerson, 2001), cai na corrente sangüínea e chega aos hepatócitos pela circulação portal e sistêmica, ligando-se às células hepáticas via receptor asialoglicoproteína, localizado na superfície basolateral dos hepatócitos humanos (Dotzauer e cols, 2000).

A penetração na célula é realizada, provavelmente, por um mecanismo de endocitose e o genoma viral é liberado no citoplasma. O RNA viral funciona como o próprio RNA mensageiro, portanto, é traduzido em uma única poliproteína precursora de todas as proteínas virais (Palmenberg, 1990). As proteínas que não fazem parte do capsídeo viral têm um importante papel na replicação genômica, promovendo a síntese de fitas negativas que servirão de molde para produção de novas fitas de RNA de polaridade positiva. As moléculas positivas seguem três destinos sendo traduzidas em proteínas virais, servindo como de molde para síntese de novas fitas negativas ou sendo empacotadas para formação de partículas virais.

A montagem do virion no citoplasma começa pela associação das proteínas VP0 (VP2 e VP4), PX (VP1 e 2A) e VP3. Cinco dessas estruturas se associam e formam um pentâmero (Borovec & Anderson, 1993), doze pentâmeros formam o procapsídeo, que, após a clivagem de PX em VP1 e 2A e o envolvimento do RNA genômico, originarão o provírio. Finalmente, para que as partículas virais tornem-se completas e infecciosas, ocorre a clivagem de VP0 em VP2 e VP4, por um processo autocatalítico (Bishop & Anderson, 1993).

O mecanismo de liberação e secreção viral não é bem conhecido, mas parece ser independente de destruição celular (Cuthbert, 2001).



**Figura 2:** Representação esquemática do genoma do HAV. A parte superior da figura representa o RNA viral e logo abaixo estão a poliproteína e as diversas proteínas codificadas pelo vírus (Pereira & Gonçalves, 2003 - adaptado).

## 1.6. Cepas e genótipos.

A cepa MS-1 foi a primeira cepa do vírus da hepatite A identificada, isolada, em Nova York por Krugman e cols, (1962), desde então, outras cepas foram identificadas em diferentes regiões do mundo. Dentre as mais comuns estão: CR 326 (Costa Rica, 1960), HM-175 (isolada na Austrália em 1976), SD 11 (Califórnia, 1976), HAS 15 (Arizona, 1979), MBB (África, 1978), GBM (Alemanha, 1976), PA 21 (isolada do macaco-coruja no Panamá em 1980). Em 1992, Gaspar e cols, isolaram a primeira cepa brasileira denominada HAF-203, que demonstrou infecciosidade em primatas

não-humanos (Vital e cols, 1995 e 2000) e seu genoma foi totalmente seqüenciado (Baptista e cols, 2000 – GENBANK AF-268396 – artigo não publicado).

Com base em estudos de variabilidade genética da seqüência nucleotídica da região genômica localizada na junção VP1/2A, foi possível classificar as diversas cepas do HAV de diferentes regiões do mundo, em sete genótipos (I a VII) com 85% ou mais de identidade nos nucleotídeos (Robertson e cols, 1992). Três genótipos infectam naturalmente primatas não-humanos (genótipos IV, V e VI) e quatro infectam o homem (genótipos I, II, III e VII), os mais frequentemente associados a infecções humanas são os genótipos I e III, que foram, ainda, divididos nos subgenótipos A e B REF. A junção VP1/2A é utilizada na classificação de genótipos por ser uma região de alta variabilidade nas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, quando comparada com as outras regiões do genoma do vírus da hepatite A (Brown e cols, 1989).

Estudos de homologia entre as seqüências nucleotídicas das diversas cepas do HAV podem ajudar a compreender melhor a disseminação do vírus nas diferentes regiões do mundo (Hollinger & Emerson, 2001). Estudos realizados em usuários de drogas na Suécia, sugerem a circulação de uma única cepa nessa população, demonstrando um ambiente fechado (Robertson e cols, 1992). Em outras regiões, como por exemplo, no Japão é observado o inverso, existindo uma grande diversidade genética que sugere uma alta circulação de cepas provavelmente introduzidas por viajantes (Robertson e cols, 1992). No Brasil, alguns estudos demonstram a circulação de cepas do HAV com alto grau de homologia, dentro do mesmo genótipo, pertencendo aos genótipos IA e IB (De Paula e cols, 2002), que sugere que no Brasil essas cepas sejam dominantes.

Substituições em proteínas funcionais podem alterar a função dessas proteínas, enquanto substituições em proteínas estruturais podem modificar os sítios de ligação do vírus ao sistema imunológico do hospedeiro (Yokosuka, 2005). Estudos da seqüência do HAV, em amostras clínicas, mostram a relação entre fatores virais e características clínicas da hepatite A, os diferentes genótipos resultam em maiores alterações na seqüência viral que àquelas mudanças ocorridas dentro de um mesmo genótipo, portanto, os diferentes genótipos devem ter maior influência, no curso clínico da hepatite A (Yokosuka, 2005).

Assim, como os genótipos dos vírus da hepatite B e hepatite C são importantes para determinar os aspectos clínicos da doença e a resposta dos pacientes à utilização da terapia com interferon, acredita-se que o genótipo do HAV está relacionado com a gravidade da doença, mas a associação entre o genótipo do HAV e a apresentação clínica da hepatite A não foi ainda confirmada (Yokosuka, 2005).

### **1.7. Cultivo celular do HAV.**

Ao contrário de outros vírus que causam hepatite, algumas cepas do HAV podem ser propagadas em culturas de células convencionais de mamíferos com eficiência razoável, sem, contudo produzir efeito citopático (Lemon e cols, 1992). Diversos tipos celulares são suscetíveis à infecção pelo HAV, mas células de rim fetal de macaco Rhesus mostram ser uma linhagem celular suscetível, para a produção de antígeno viral (Fleming, 1981). Os vírus produzidos em culturas de células vêm sendo utilizados como inóculo, em infecções experimentais em primatas não-humanos (Vital e cols, 1995; Pinto, e cols, 2002), em testes para o diagnóstico da hepatite A (Santos e cols, 2002) e no desenvolvimento e produção de vacinas (Provost e cols, 1986).

O HAV apresenta replicação lenta em cultura de células, sem apresentar efeito citopático, contrastando com outros picornavírus (Ticehurst e cols, 1989). Uma replicação mais eficiente, ocorre após certo número de passagens, quando o vírus está adaptado à replicação em cultivo celular REF. As mutações observadas nas proteínas 2B e 2C, provavelmente, são responsáveis pela adaptação do HAV “in vitro” (Emerson e cols, 1993).

A quantificação das partículas virais infecciosas em cultura de células pode ser avaliada pelos testes de radioimunoensaio, imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno (Hollinger e cols, 1975), radioimunofoco (Lemon e cols, 1983) e ensaio imunoenzimático “in situ” (Villar e cols, 2004).



## 1.8. Características clínicas.

A infecção natural pelo HAV ocorre geralmente após a ingestão de água e/ou alimentos contaminados. As manifestações da doença são, geralmente, restritas ao fígado, porém envolvimento extra-hepáticos como do sistema nervoso central e dos rins, apesar de serem raros, já foram relatados (Zikos e cols, 1995), assim como hemólise, derrames pleurais e pericárdicos, artrite reativa e pancreatite (Cuthbert, 2001).

A infecção causada pelo vírus da hepatite A pode apresentar a forma assintomática ou sintomática, com um período médio de incubação de 28 dias. Entretanto, a replicação viral é ativa e uma grande quantidade de partículas virais é eliminada pelas fezes (Asher e cols., 1995; Hollinger & Emerson, 2001). A fase prodrômica dura de dois a quinze dias, as manifestações são indistinguíveis daquelas que ocorrem em outras infecções viróticas, tais como febre, mialgia, fadiga, anorexia, náuseas e desconforto abdominal (Havens & Jr, 1944). O início da fase icterícia, normalmente é precedido por relatos de urina escura (colúria), seguido de acolia fecal e icterícia (Zuckerman, 1965), a duração desta fase é variável, sendo mais freqüente e longa em adultos. Há um aumento nos níveis das enzimas hepáticas, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e  $\gamma$ -glutamil transpeptidase (GGTP), assim como no nível de bilirrubina no soro (Hallgren, 1943). Apesar da recuperação lenta e um período prolongado de convalescença, a evolução da hepatite A é, de um modo geral, boa terminando com a cura, na grande maioria dos casos.

As manifestações clínicas estão fortemente relacionadas com a idade, 90% dos casos de hepatite A se apresentam de forma assintomática em crianças com idade inferior a cinco anos, enquanto em adultos, 70% dos casos são sintomáticos (Koff, 1992).

A hepatite A não evolui para a cronicidade e os sinais e sintomas da doença permanecem por menos de dois meses, embora tenha sido descrita uma forma prolongada da doença, podendo levar, nesse caso, seis meses para completa recuperação. (Gordon e cols, 1984). Durante a gravidez a hepatite A também é auto-

limitada, não oferecendo riscos para a grávida ou para o feto. A transmissão intrauterina é extremamente rara (Banker, 2003).

Algumas observações têm mostrado que, nas formas prolongadas da hepatite A, pode existir excreção persistente do vírus, razão pela qual, os pacientes nessa situação, devem ser considerados como potenciais transmissores (Inoue e cols, 1996). A forma grave icterícia, que ocasionalmente culmina na forma fulminante, é caracterizada pela necrose maciça das células hepáticas, podendo comprometer gravemente as funções do órgão e levar a um quadro de coma hepático, resultando em morte, em até 80% dos casos (Koff, 1992). Esta forma da doença, em geral, ocorre em indivíduos com idade superior a 50 anos (Hadler e cols, 1991).

Indivíduos com doença crônica do fígado como hepatite B ou C exibem um aumento nos riscos de desenvolverem formas mais graves de hepatite A ou, até mesmo, um quadro de hepatite fulminante, apresentando uma mortalidade estimada entre 0,14 a 2% (Vento e cols, 1998). O dano causado pela hepatite viral resulta de um envolvimento substancial das funções hepáticas, já comprometidas pelas lesões crônicas (Keeffe e cols, 1998).

As manifestações clínicas do HAV estão fortemente envolvidas com fatores intrínsecos do hospedeiro, como a idade, no entanto a influência da participação de variantes do vírus, atuando numa replicação viral mais ativa ou na resposta do hospedeiro à infecção, não deve ser excluída (Sanchez e cols, 2003b).

## **1.9. Epidemiologia.**

A epidemiologia do HAV está relacionada ao nível de desenvolvimento econômico das populações (Hadler, 1991). Nos países subdesenvolvidos a infecção ocorre precocemente logo após os oito meses de vida quando os anticorpos maternos começam a desaparecer (Robertson e cols., 1992). Nos países e regiões desenvolvidas, o número de adolescentes e adultos jovens suscetíveis é grande facilitando a ocorrência de surtos epidêmicos por uma fonte de água ou alimentos contaminados, como por exemplo, mariscos, ostras e frutas (Niu e cols, 1992).

O período de viremia é curto e a concentração de partículas virais no sangue é baixa. Portanto a transmissão parenteral é rara, mas pode ocorrer se o material injetado (sangue ou soro) for de indivíduos que estiverem no período de incubação ou na primeira semana da doença. Casos esporádicos têm sido relatados após transfusão sanguínea em neonatos (Noble e cols, 1984), transfusão de plasma e plaquetas (Meyers e cols, 1974) e fatores de coagulação (Manucci e cols, 1994), assim como usuários de drogas (Grinde e cols, 1997). Apesar de pouco comum, a transmissão nosocomial já foi relatada (Watson e cols, 1993).

A transmissão do HAV entre os homossexuais masculinos tem sido relatada e alguns surtos epidêmicos foram registrados nessa população REF. Alguns estudos têm mostrado que altos níveis de soro prevalência de hepatite A, em homens, estão mais relacionados com contato oral-anal do que com a orientação sexual (Ballesteros e cols, 1996).

O vírus é extremamente resistente no meio ambiente (Sobsey e cols, 1988), sendo facilmente disseminado na população, sobretudo onde as condições de saneamento e higiene são precárias, justificando seu alto potencial de causar epidemias (Divizia e cols, 1998).

Nos países em desenvolvimento, onde as condições de saneamento básico e fornecimento de água encanada estão sofrendo melhorias significativas, o perfil epidemiológico da infecção está mudando, atingindo faixas etárias cada vez mais elevadas. Estudos realizados no Rio de Janeiro mostram uma mudança na epidemiologia da hepatite A, decorrente das melhorias nos padrões de vida de alguns grupos da população urbana, refletidos pela baixa prevalência de anticorpos entre crianças e adolescentes (Vital e cols, 1998a). Contudo, na população rural, onde as condições sanitárias ainda são precárias, a prevalência destes anticorpos chega a mais de 70% (Trinta e cols, 1998). Essa mudança resulta num aumento da população adulta suscetível ao vírus da hepatite A (Yao, 1991). Este novo padrão de endemicidade traz graves conseqüências pois a morbidade aumenta com o aumento da idade e então observa-se a substituição de infecções subclínicas em crianças para infecções clínicas em adolescentes e adultos (Shapiro & Margolis, 1993). Assim, o que tem sido observado, é que o HAV vem emergindo como uma nova doença, em áreas onde as melhorias sanitárias vêm sendo introduzidas e a média de idade da

infecção tem se deslocado da infância para a adolescência (Purcell, 1994). Assim sendo, uma parcela cada vez maior da população adulta permanece suscetível ao HAV, levando à ocorrência de surtos e casos esporádicos (Villar, 2002).

### **1.10. Prevenção e controle.**

Apesar da hepatite A ser uma doença que não evolui para cronicidade como a hepatite B ou hepatite C, o HAV é responsável por uma significativa morbidade e perda econômica, principalmente em países desenvolvidos, em razão da prolongada convalescença, após a fase aguda da doença REF.

Vários trabalhos mostram um aumento de hepatite A fulminante, em indivíduos com doença hepática crônica (Vento e cols, 1998; Datta, 2000). Um estudo realizado no Hospital das Clínicas em Porto Alegre, entre crianças e adolescentes com doença crônica de fígado, demonstrou que 76% desses pacientes são suscetíveis à infecção pelo HAV, conseqüentemente eles apresentam um maior risco de desenvolverem formas mais graves de hepatite A ou uma hepatite fulminante. A redução da população suscetível com a vacinação pode eliminar a doença e suas complicações, mas é importante monitorar os níveis de imunidade natural desses pacientes e identificar os que são suscetíveis à infecção (Ferreira e cols, 2002).

As principais medidas de controle de uma virose de transmissão entérica como a hepatite A, são as melhorias no saneamento básico associadas a higiene. Como o homem é o único reservatório para o HAV e as crianças possuem um papel crítico na cadeia de transmissão da infecção, medidas de preventivas, tais como higiene pessoal e imunoprofilaxia, representam medidas essenciais na prevenção da infecção, reduzindo a taxa de infecção e conseqüentemente de doença (Centers for Disease Control and Prevention – CDC - 1994).

As vacinas inativadas para hepatite A demonstraram ser seguras e eficazes em várias triagens clínicas, e são utilizadas em vários países (Castillo de Febres e cols, 1999). A primeira vacina para hepatite A foi a HAVRIX (Smith Kline and

Beecham), produzida a partir de culturas celulares de fibroblastos humanos (MRC-5) infectadas com a cepa HM175, com inativação pela formalina (Bader, 1996). Posteriormente, outra vacina inativada foi lançada no mercado, a VAQTA (Merck), produzida a partir da cultura de células MRC-5 infectadas com a cepa CR-326. As duas vacinas são altamente imunogênicas e possuem grande eficácia REF. Os níveis de anticorpos considerados protetores podem persistir, por mais de vinte anos (Van Damme e cols, 1994), após aplicação de duas doses num intervalo de seis meses. A vacina deve ser indicada para viajantes de áreas endêmicas, usuários de drogas intravenosas, pacientes com hepatopatia grave e pessoas que trabalham em ocupação de risco de infecção (Arguedas e cols, 2002). Atualmente, já existe uma vacina que associa os antígenos dos vírus da hepatite A e B, com eficácia comprovada (Ramonet e cols, 2002). O ponto negativo dessas vacinas é o alto custo, devido à baixa produção viral em cultura de células, decorrente da lenta replicação do HAV.

Tentativas para diminuir os custos da vacina contra hepatite A estão sendo realizadas. A avaliação de exposição prévia, antes da vacinação, está relacionada ao custo do exame e da vacina. Somente vacinar os indivíduos comprovadamente suscetíveis à infecção é economicamente mais vantajoso, principalmente em áreas onde o risco de infecção é maior (Arguedas e cols, 2002). Outra alternativa seria a possibilidade de reduzir o uso da vacina para uma única dose, facilitando a implementação de campanhas de vacinação em massa e contribuindo para o controle da doença, mas essa análise tem sido questionada por alguns autores que mostram ausência de custo-eficácia na vacinação em massa (Beutels e cols, 2002). O ideal seria a produção de vacinas atenuadas ou até mesmo vacinas de DNA recombinante ou de subunidades vacinais, tentando reproduzir o sucesso obtido com a vacina contra a hepatite B.

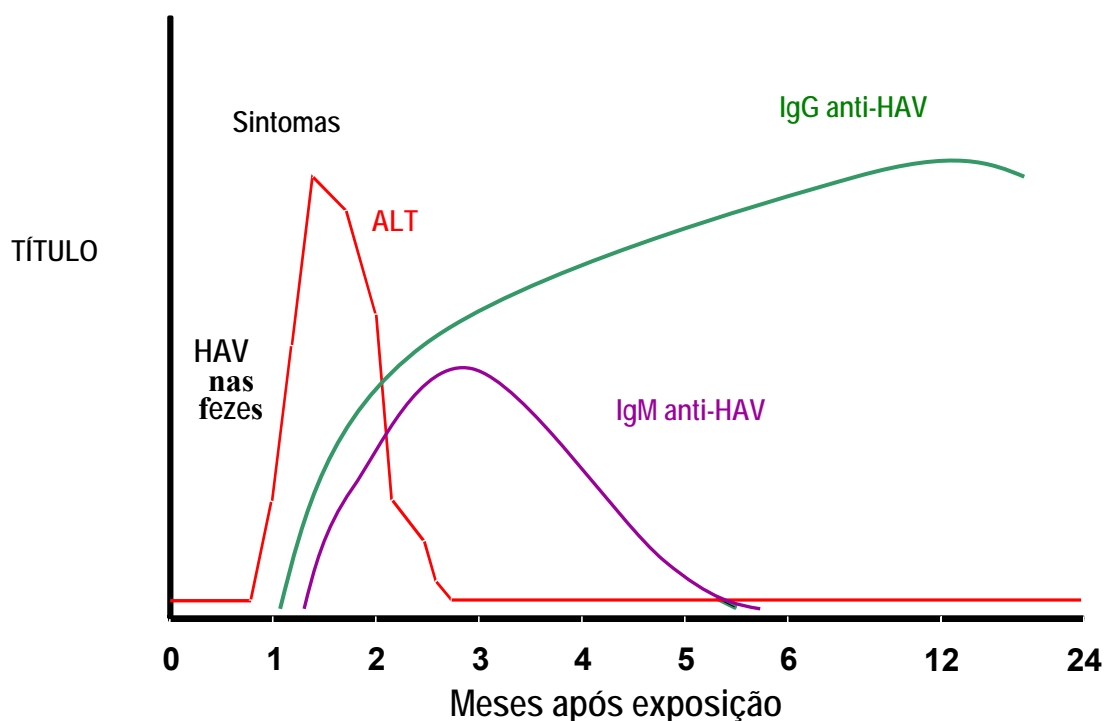
### **1.11. Diagnóstico.**

No aspecto clínico, a hepatite A não pode ser distinguida das outras formas de hepatites virais. As provas bioquímicas de função hepática que incluem dosagens de

bilirrubina sérica total, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), são indicativas de dano no parênquima hepático e caracterizam hepatite, independentemente do agente causador da doença, e assim não são provas específicas da hepatite A (Bianchi e cols., 1971; Ishak, 1976). O diagnóstico laboratorial da hepatite A pode ser definido pela detecção de anticorpos de fase aguda IgM anti-HAV, em amostras de soro, utilizando testes imunoenzimáticos de captura de fase sólida (Locarnini e cols, 1979). Alguns trabalhos mostram o desenvolvimento de métodos ou a adaptação de técnicas já existentes, para detecção de anticorpos contra a hepatite A, utilizando amostras de saliva (Oba e cols, 2000) e urina (Joshi e cols, 2002; Lay e cols, 2003). Essas novas metodologias, utilizando, além do soro, outros fluidos corporais, facilitam e tornam mais rápido o diagnóstico da doença, sobretudo em bebês e em crianças, onde a coleta de sangue é mais trabalhosa, além de necessitar de pessoal bem treinado.

A positividade do IgM anti-HAV, geralmente, dura cerca de três a quatro meses, após exposição ao vírus, podendo chegar a seis meses em 5% dos casos (Kao e cols, 1984). Os anticorpos IgG anti-HAV são detectados simultaneamente ao IgM anti-HAV ou logo após (Figura 3), permanecendo detectável por toda vida e conferindo proteção contra uma reinfecção (Ciocca, 2000).

## Cinética dos marcadores sorológicos na infecção pelo HAV



**Figura 3:** Curso sorológico da infecção pelo vírus da hepatite A.

O isolamento do HAV em cultura de células, a partir das fezes, não é indicado para efeito de diagnóstico, devido a dificuldade de cultivo celular, pois a eliminação viral precede a sintomatologia e a excreção viral é reduzida drasticamente, após o início dos sintomas, na maioria dos casos (Locarnini e cols, 1979). Apesar de ser uma técnica demorada e nem sempre bem sucedida, o isolamento do HAV se justifica para esclarecer casos prolongados da doença, onde a excreção viral é persistente (Gordon e cols, 1984). A biópsia de fígado raramente é utilizada no diagnóstico da hepatite A aguda, pois as alterações morfológicas observadas são muito parecidas àquelas causadas em outras formas de hepatite aguda (Bianchi e cols, 1971).

A detecção do RNA viral em amostras de soro ou fezes, utilizando a técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Polish e cols., 1999; Kwon e cols., 2000), não é comumente utilizada como rotina no

diagnóstico da hepatite A, devido à eficiência e praticidade dos testes imunoenzimáticos. O diagnóstico molecular é utilizado apenas na pesquisa, no esclarecimento de casos graves e persistentes (Polish e cols, 1999) e quando for necessária a determinação precoce da infecção.

### **1.12. ELISA (Ensaio imunoenzimático).**

O termo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi utilizado, pela primeira vez, em 1971, por Engvall e Perlmann. O objetivo do teste é a detecção e/ou quantificação de anticorpos ou antígenos. O teste ELISA foi desenvolvido como uma alternativa ao radioimunoensaio, que foi uma técnica amplamente utilizada nos anos 60, por ser um teste extremamente sensível. Este teste, no entanto, apresenta inúmeras limitações como, por exemplo, o alto custo e, principalmente, o risco operacional por utilizar marcadores radioativos.

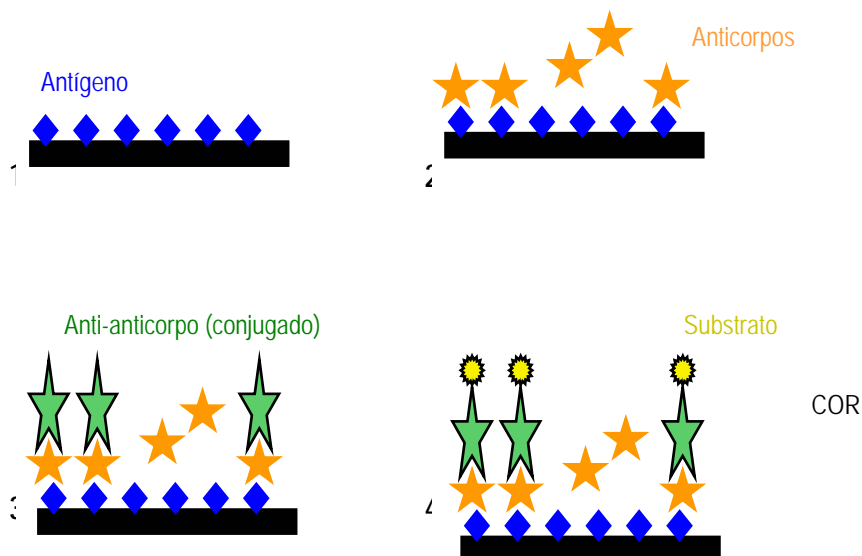
Na pesquisa e principalmente nos laboratórios clínicos, o teste de ELISA é uma ferramenta de grande importância para o diagnóstico de diversas doenças, graças a sua elevada sensibilidade e especificidade, rapidez, baixo custo, praticidade, objetividade na leitura, a possibilidade de automação (Shu e cols., 2003) e principalmente por não utilizar radioisótopos.

O princípio básico do teste é a imobilização de um dos reagentes, que pode ser antígeno ou anticorpo, em uma fase sólida (geralmente placas de poliestireno), enquanto outro reagente, em geral anticorpos purificados, estará ligado a uma enzima (conjugado), com preservação da atividade enzimática e da atividade imunológica do anticorpo.

Existem vários métodos empregados para a pesquisa de anticorpos e antígenos pelo ELISA. Alguns são mais sensíveis outros são mais específicos, todos apresentam vantagens e desvantagens, que devem ser levadas em consideração, na escolha do método empregado para detecção do antígeno ou anticorpo de interesse. Um teste de ELISA bastante empregado para detecção de anticorpos é o ELISA indireto, por ser economicamente vantajoso, já que um único

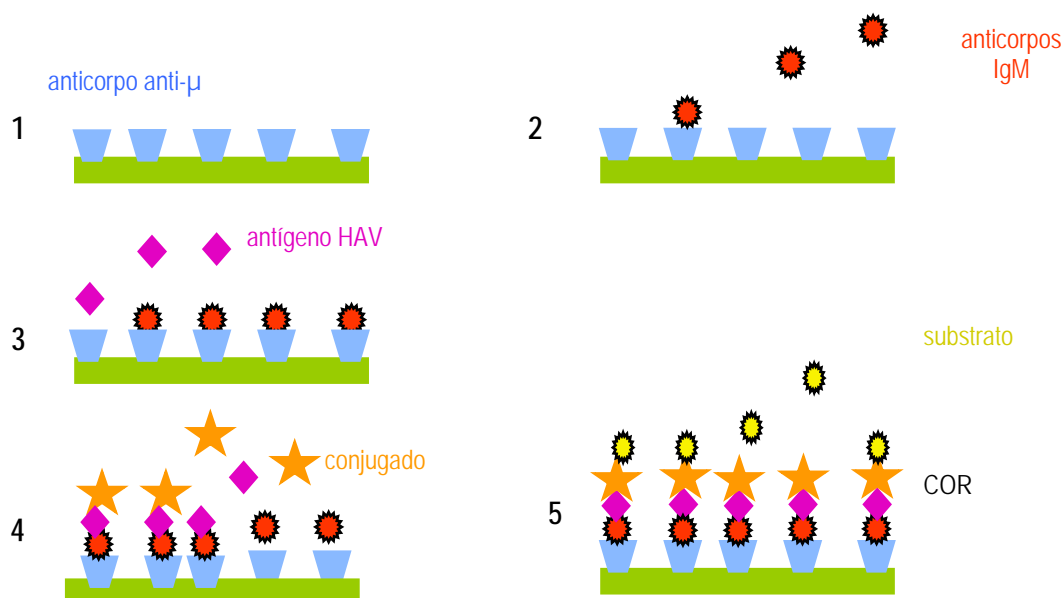


conjugado, um anti-anticorpo humano, pode ser utilizado para detecção de várias doenças (Figura 4).



**Figura 4:** Figura esquemática de um teste ELISA indireto para detecção de anticorpos.

O ELISA de captura é indicado para detecção de anticorpos da classe IgM, pois diminui a probabilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos. Neste teste a fase sólida é sensibilizada com anticorpos anti-IgM, havendo a captura de qualquer IgM dos soros teste, após a incubação. A seguir incuba-se com antígeno marcado ou antígeno não-marcado, seguindo-se adição de anticorpo específico marcado (Figura 5).



**Figura 5:** Figura esquemática de um teste ELISA de captura para detecção de anticorpos IgM.

A utilização de proteínas recombinantes, em testes para o diagnóstico de diversas doenças ou na produção de vacinas, tem sido muito utilizada. Essas proteínas são ferramentas úteis, à medida que podem tornar o diagnóstico mais específico e as vacinas mais seguras (Dawson e cols, 1992; Chen e cols, 2004; Maloney e cols, 2005; Quintana e cols, 2005; Ning e cols, 2005).

Proteínas recombinantes do vírus da hepatite A, principalmente proteína estrutural VP1, têm sido expressas em uma variedade de sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos (Ostermayr e cols, 1987; Johnston e cols, 1988; Rosen e cols, 1993; Sánchez e cols, 2003a), buscando a produção de testes para o diagnóstico da infecção pelo HAV e vacinas eficientes e baratas contra o vírus da hepatite A. A maioria dos estudos utiliza a VP1, pois esta proteína juntamente com a proteína estrutural VP3, formam um simples e dominante epítipo sorológico que estimula uma resposta de anticorpos neutralizantes (Cuthbert, 2001).

A produção de antígeno recombinante, para utilização e otimização de imunoensaio no diagnóstico da hepatite A, já foi demonstrada ser possível em estudos onde se observou resultados similares àqueles apresentados pela utilização

do antígeno HAV, derivado de culturas de células tradicionais (LaBrecque e cols, 1998).

## 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A hepatite A é um importante problema de saúde pública no mundo todo, principalmente nos países em desenvolvimento, pois as melhorias sanitárias provocam um deslocamento da infecção pelo HAV para faixas etárias mais elevadas e conseqüente redução na prevalência de anticorpos anti-HAV, entre crianças e adultos jovens. Este novo padrão epidemiológico pode acarretar surtos e epidemias, devido ao alto potencial de disseminação do HAV entre as populações onde existe um grande número de pessoas suscetíveis à infecção.

Dados de um trabalho realizado em 2002, utilizando amostras de sangue coletadas no Laboratório de Hepatites Virais credenciado como Laboratório de Referência Nacional para as Hepatites Virais (LHV/LRNHV) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ mostraram que, em 2001 a hepatite A foi responsável por mais de 30% dos casos de hepatite aguda diagnosticados no LHV/LRNHV, portanto, um diagnóstico rápido e confiável é essencial para evitar e controlar surtos de hepatite A. Os laboratórios da rede pública e privada, que fazem o diagnóstico da doença, utilizam testes comerciais importados disponíveis no mercado. No entanto, é de interesse do Departamento de Reativos para o Diagnóstico de Biomanguinhos/FIOCRUZ produzir e distribuir testes para a detecção da hepatite A, com menor custo e qualidade similar a dos testes importados.

Assim, o desenvolvimento de um teste imunoenzimático de detecção de anticorpos IgM anti-HAV, com sensibilidade e especificidade similares a dos testes comerciais, que possa ser distribuído para todos os laboratórios da rede pública, seja uma importante ferramenta para diagnóstico da hepatite A.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Aperfeiçoar o teste imunoenzimático IgM anti-HAV para o diagnóstico da hepatite A, desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz /FIOCRUZ.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Diminuir a inespecificidade do teste imunoenzimático IgM anti-HAV;
2. Aumentar a estabilidade do vírus da hepatite A (HAV), utilizado como antígeno viral em cultivo celular;
3. Avaliar o uso de uma proteína recombinante do vírus da hepatite A utilizada como antígeno viral substituto, visando melhorar o desempenho do teste experimental.
4. Desenvolver testes experimentais com a proteína recombinante.
5. Analisar comparativamente os testes desenvolvidos com testes comerciais.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras analisadas**

Foram analisadas 237 amostras de soro, sendo 106 mulheres e 131 homens. Essas amostras são de pacientes que deram entrada no ano de 2001, no Laboratório de Hepatites Virais, credenciado como Laboratório de Referência Nacional para as Hepatites Virais (LHV/ LRNHV)/ Departamento de Virologia/ IOC/ FIOCRUZ, com suspeita de hepatite viral. O Laboratório de Referência Nacional para as Hepatites Virais possui um ambulatório que atende a demanda de pacientes com suspeita de hepatite viral, que são encaminhados para o diagnóstico dos marcadores das hepatites virais, geralmente, por médicos da rede pública de saúde.

O critério de escolha das amostras foi aleatório, levando em consideração os sintomas clínicos de hepatite aguda nos pacientes. Todas as 237 amostras de soro foram testadas na rotina do LHV/ LRNHV e os resultados liberados para os pacientes. As amostras selecionadas foram retestadas nos testes ELISA comerciais HEPANOSTIKA HAV IgM (EIE-BIOMÉRIEUX) e BIOELISA HAV IgM (EIE-BIOKIT) e nos testes ELISA ANTI-HAV IgM CAPTURA DIRETO/ IOC, ELISA ANTI-HAV IgM CAPTURA INDIRETO/ EXPERIMENTAL e ELISA ANTI-HAV IgM RECOMBINANTE/ EXPERIMENTAL.

### **4.2. Produção do Anticorpo IgG anti-HAV**

O anticorpo IgG anti-HAV foi obtido a partir da mesma mistura de soros humanos convalescentes utilizada para produção do conjugado. A mistura foi precipitada com sulfato de amônia (Merck), dialisada e purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE – Sephacel - Amershan Pharmacia Biotech). O anticorpo IgG anti-HAV não foi conjugado à peroxidase, sendo estocado a -20°C.

### **4.3. Produção do conjugado**

O anticorpo IgG anti-HAV foi obtido a partir de mistura de soros humanos convalescentes de pacientes do LRNHV. A mistura de soros humanos foi precipitada com solução de sulfato de amônia a 50%, depois dialisada contra Tris a 50 mM pH 8,0 e purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE – Sephacel – Amershan Pharmacia Biotech). O anticorpo IgG purificado foi conjugado à peroxidase, de acordo com o método de metaperiodato, descrito por Nakane e Kawoi (1974) e modificado por Camargo e cols, 1987. O conjugado foi diluído com PBS/Glicerol 70% e estocado a -20°C.

### **4.4. Produção do antígeno HAV**

A amostra de HAV utilizada para produção de antígeno, denominada HAF-203, foi isolada no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ (Gaspar e cols, 1992), a partir de uma amostra fecal de um paciente com diagnóstico clínico de hepatite aguda e diagnóstico sorológico de hepatite A.

O antígeno foi produzido em células FRhk-4, células provenientes de rim fetal de macaco Rhesus. As células FRhk-4 foram cultivadas em garrafas descartáveis em sistema estacionário, incubadas a 37°C em meio William's E, complementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2% de L-glutamina pH 4,0, 0,1mM de MEM aminoácidos não essenciais, HEPES a 1M, 7,5% de bicarbonato de sódio, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina.

Após a formação do tapete celular, o sobrenadante foi descartado e foram inoculados 5 mL de HAF-203 na 7ª passagem. Para adsorção viral, a garrafa foi incubada sob agitação, durante 60 minutos a 37°C, a seguir, o sistema celular foi complementado com 35 mL de meio William's E, contendo 2% de soro fetal bovino e mantida por 7 dias, a mesma temperatura. Após este período, o sobrenadante celular foi retirado e à monocamada foram adicionados 50 mL de PBS pH 7,2, seguido por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O HAV liberado no sobrenadante e nas

células rompidas, foi então, avaliado quanto ao título antigênico, pelo teste de ELISA HAVAg desenvolvido pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico - Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

#### **4.5. Testagem da estabilidade do antígeno HAV, através do EIE-CD/ IOC**

##### **4.5.1. Após adição de crio preservadores**

Foram adicionados às alíquotas de suspensão viral, glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40% e 50%. As alíquotas de antígeno contendo glicerol (Invitrogen) ou DMSO (Merck) foram estocadas a -20°C por 18 horas em seguida testadas no EIE-CD/IOC (Resultados não apresentados).

##### **4.5.2. Após liofilização**

O antígeno HAV foi submetido ao processo de liofilização. a fim de torná-lo mais estável. Foi utilizado como estabilizador viral cloreto de magnésio a 1.1M, argenina a 0.6M e sacarose a 5%. O estabilizador foi diluído no antígeno HAV nas diluições de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 e 1:10. O estabilizador na diluição de 1:10 foi utilizado nos experimentos pois não comprometeu o desempenho do EIE-CD/IOC. A liofilização foi realizada no equipamento (LABCONCO - modelo LYPH-LOCK 1L) existente no Departamento de Reativos para Diagnóstico, por 16 horas. Após o processamento, as alíquotas foram armazenadas a 4°C por um período de 6 meses, até a realização dos testes ELISA (Quadro 1).



Diluição da suspensão viral no estabilizador  
45 mL da suspensão viral + 5 mL de estabilizador



Envase da suspensão viral em alíquotas de 4mL



Congelamento a -70°C



Liofilização

**Quadro 1:** Etapas do processo de liofilização da suspensão do vírus da hepatite A, cep HAF-203, produzido em cultivo celular.

#### 4.5.3. Após ciclos de congelamento/descongelamento

Uma mesma alíquota do antígeno HAV estocada a -20°C foi congelada/descongelada em banho de gelo 3 vezes, a cada descongelamento o EIE-CD/IOC foi realizado.

#### 4.6. Proteína recombinante

##### 4.6.1. Produção da proteína recombinante

A proteína estrutural VP1 do HAV foi expressa em *Escherichia coli*, cepa BL21DE3. Toda parte de expressão, precipitação com sulfato de amônio e purificação da proteína por cromatografia de afinidade, utilizando íons metálicos imobilizados e

marcação de hexaistidina no terminal N foram realizados no Laboratório de Hepatites Virais do Departamento de Virologia/ IOC/ FIOCRUZ (LHV) e uma alíquota da proteína recombinante foi gentilmente fornecida ao Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-manguinhos, para experimentações iniciais.

#### **4.7. ELISA comercial para pesquisa de anticorpos IgM anti-HAV.**

Os testes comerciais utilizados foram BIOELISA HAV IgM (EIE-BIOKIT) e HEPANOSTIKA HAV IgM (EIE-BIOMÉRIEUX). Ambos utilizam o princípio de captura, onde os anticorpos da classe IgM, presentes nas amostras reagentes, ligam-se aos anticorpos anti-IgM adsorvidos na microplaca. (Anexos II e III)

As cavidades das microplacas foram sensibilizadas com anticorpos anti-imunoglobulina M humana (anti- $\mu$  humana). Após a adição das amostras teste e controles positivos e negativos, formaram-se complexos imunes, com a interação entre a IgM humana e o anti- $\mu$  presente na fase sólida. Após a lavagem, adicionou-se o antígeno e o anticorpo anti-HAV conjugado à peroxidase. O substrato com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) juntamente com a solução reveladora de tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados, depois da lavagem da placa. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, e então, a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico a 2M.

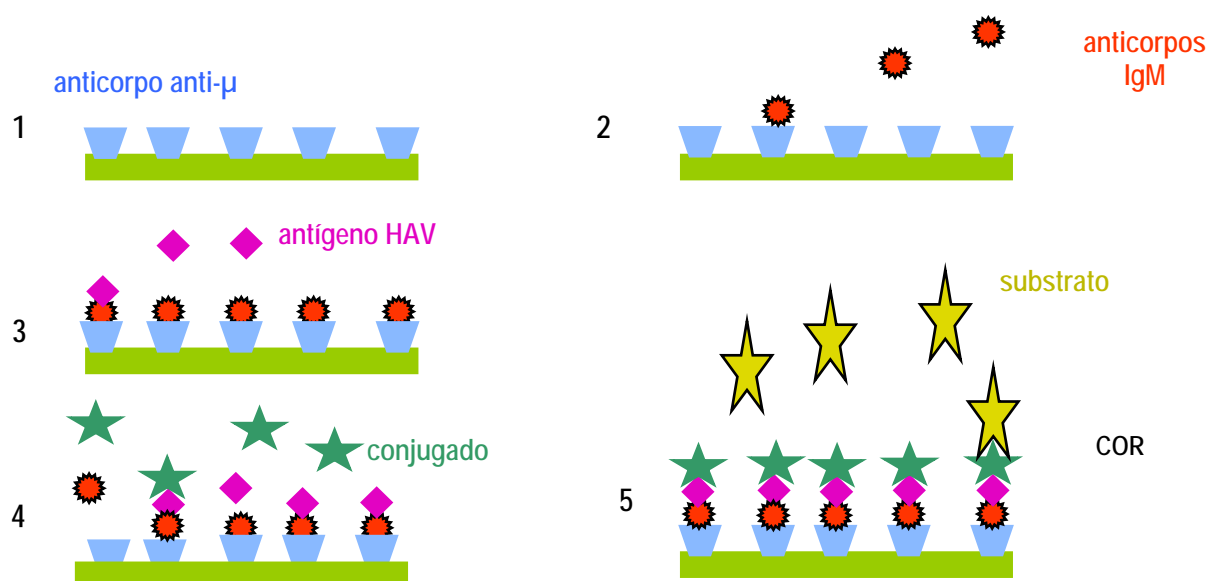
Na leitura visual, as amostras reagentes apresentaram cor amarela e as não-reagentes permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da absorbância (Ab) em espectrofotômetro, utilizando um filtro de 450 nm. O cálculo do ponto de corte (*cut off*) foi realizado de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de absorbância maiores que o *cut off* foram consideradas reagentes enquanto que aquelas com os valores de absorbância menores que o *cut off* foram consideradas não-reagentes.

#### 4.8. ELISA IgM ANTI-HAV CAPTURA DIRETO/IOC (EIE-CD/ IOC).

O EIE-CD/IOC foi o método inicialmente desenvolvido pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico/Departamento de Virologia/ IOC/ FIOCRUZ.

Esse teste utiliza, como fase sólida, microplacas de poliestireno sensibilizadas com anticorpos anti- $\mu$  produzidos em cabra. Para sensibilização, os anticorpos anti- $\mu$  humano foram diluídos a 1:1000 em tampão carbonato pH 9,6 e, então, as placas foram incubadas por 18 horas, a 4°C. Após a incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T, as amostras teste e os controles positivos e negativos diluídos a 1:1000, foram adicionados nos respectivos orifícios da placa. Nesta fase, conhecida como fase de captura, os anticorpos da classe IgM presentes nas amostras reagentes ligam-se aos anticorpos anti-IgM adsorvidos nas microplacas. Após incubação de 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T em seguida o antígeno HAV foi adicionado (125  $\mu$ g/ por orifício) aos orifícios e as placas incubadas 1h a 37°C. Após o período de incubação as placas foram novamente lavadas com PBS-T por seis vezes e o conjugado anti-HAV/ peroxidase (mistura de soros humanos), em diluição final de 1:5000, foi adicionado. A reação foi incubada por 1h, a 37°C. Após nova lavagem, o substrato juntamente com o TMB foram adicionados. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação foi bloqueada, com uma solução de ácido sulfúrico a 2M (Figura 7). As diluições de anti- $\mu$  humano, antígeno HAV e conjugado utilizadas foram previamente padronizadas, tomando suas densidades óticas com padrão.

Na leitura visual as amostras reagentes apresentaram cor amarela e as não-reagentes permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da Ab em espectrofotômetro, utilizando um filtro de 450 nm. O *cut off* correspondia a soma da média dos valores de Ab dos controles negativo e positivo dividida por 2. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de Ab maiores que o *cut off* foram consideradas reagentes, enquanto que aquelas com valores de absorvância menores que o *cut off* foram consideradas não reagentes.



**Figura 6:** Esquema mostrando as etapas do EIE-CD/IOC, desenvolvido pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDT) – Departamento de Virologia/ IOC/ FIOCRUZ.

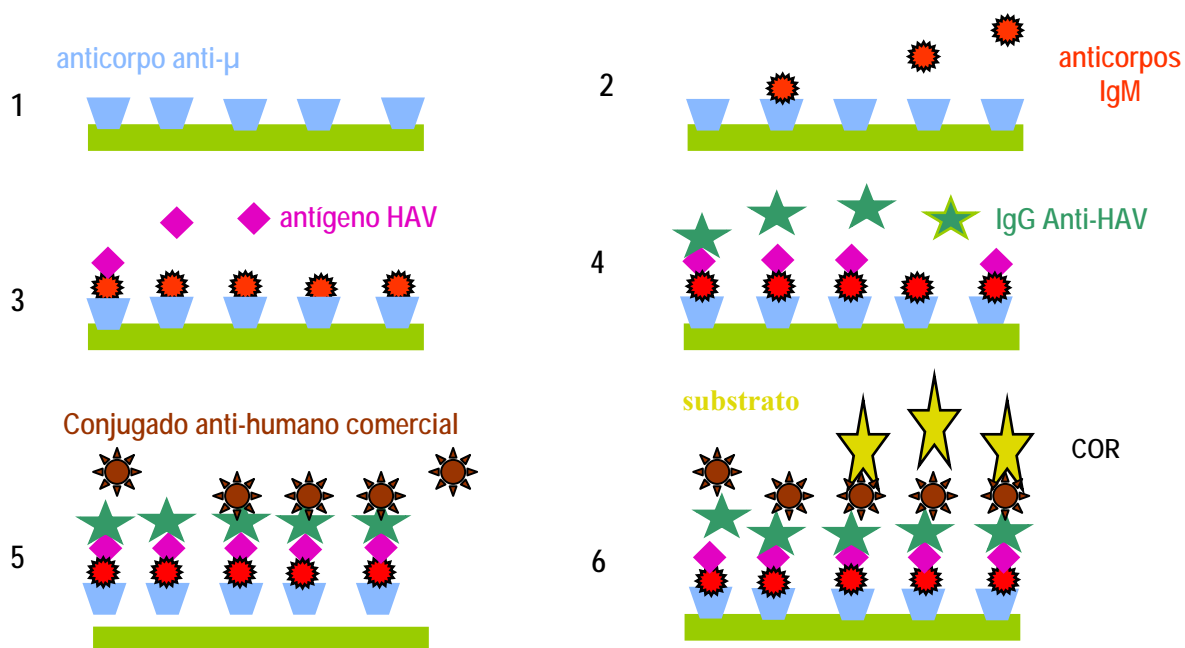
#### 4.9. ELISA IgM ANTI-HAV CAPTURA INDIRETO/EXPERIMENTAL (EIE-CI/ EXP).

Tentando diminuir a reação não específica, foi acrescentada mais uma etapa no teste inicialmente desenvolvido, onde foi colocado um anti- anticorpo humano comercial como conjugado.

Esse teste utiliza, como fase sólida, microplacas de poliestireno, sensibilizadas com anticorpos anti-imunoglobulina M humana (anti- $\mu$ ), produzidos em cabra. Para sensibilização, os anticorpos anti- $\mu$  humano foram diluídos a 1:1000 em tampão carbonato pH 9,6 e então as placas foram incubadas, por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. As amostras teste e os controles positivos e negativos diluídos a 1:1000, foram adicionados e as placas foram incubadas por 1h a 37°C. Após incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T, em seguida o antígeno HAV foi adicionado (125  $\mu$ g/ por orifício) nos orifícios das placas, em seguida a reação foi incubada 1h a 37°C. Após a incubação as microplacas foram lavadas com PBS-T por seis vezes. A etapa seguinte foi a adição do anticorpo anti-HAV (mistura de soros humanos), novamente as placas

foram incubadas por 1h a 37°C. A diferença entre o EIE-CD/IOC para o EIE-CI/EXP, foi a utilização do anti-soro (anti-HAV) detector não conjugado e em seguida do conjugado anti-IgG humana. Nesta nova etapa foi adicionado um anticorpo comercial (SIGMA-ALDRICH), anti-IgG humano (1:20.000) conjugado à peroxidase. Em seguida as placas foram incubadas 1h a 37°C, para que os anti-anticorpos (anti IgG humano marcado) pudessem se ligar aos anticorpos anti-HAV possivelmente presentes na reação. Após nova lavagem, o substrato juntamente com TMB foram então adicionados. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico a 2M (Figura 8). As diluições de anti- $\mu$  humano, antígeno HAV e conjugado utilizadas foram previamente padronizadas, tomando suas densidades óticas com padrão.

Na leitura visual, as amostras reagentes apresentaram cor amarela e as não-reagentes permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da Ab em espectrofotômetro, utilizando um filtro de 450 nm. O *cut off* correspondia à soma da média dos valores de Ab dos controles negativo e positivo dividida por 2. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de absorvância maiores que o *cut off* foram consideradas reagentes, enquanto que aquelas com valores de absorvância menores que o *cut off* foram consideradas não-reagentes.



**Figura 7:** Esquema mostrando as etapas do EIE-CI/ EXP, desenvolvido pelo DERED / Bio-manguinhos. Este teste difere do ELISA pelo IOC por apresentar uma etapa a mais, onde é colocado o anti-HAV, seguido do conjugado anti-IgG humana.

#### 4.10. ELISA IgM ANTI-HAV - PROTEÍNA RECOMBINANTE/EXPERIMENTAL (EIE-PTNREC/ EXP).

A padronização do ELISA utilizando a proteína recombinante foi feita a partir da escolha dos melhores resultados, obtidos em quatro métodos distintos. Três métodos mantiveram o desenho original do teste ELISA de captura para IgM e um foi baseado no teste ELISA direto clássico para sorologia. As diluições de anti- $\mu$  humano, antígeno HAV e conjugado utilizadas foram previamente padronizadas, tomando suas densidades óticas com padrão.

#### 4.10.1. Método 1 (Quadro 2)

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com anticorpos anti-imunoglobulina M humana (anti- $\mu$ ), produzidos em cabra. Para sensibilização, os anticorpos anti- $\mu$  humano foram diluídos a 1:1000 em tampão carbonato pH 9,6 e, então, as placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. As amostras teste e os controles positivos e negativos, diluídos a 1:1000, foram adicionados e as placas incubadas por 1h a 37°C. Após incubação, as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. A etapa seguinte foi a adição da proteína recombinante (0,0011  $\mu$ g/ por orifício), incubando-se a placa por 1h a 37°C. Após a lavagem com PBS-T, foi adicionado o conjugado anti-proteína recombinante, produzido em coelho (também gentilmente cedido pelo LHV), diluído a 1:5000, e a reação foi incubada 1h a 37°C. As placas foram lavadas com PBS-T e, em seguida, o substrato e o TMB foram, então, adicionados. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico a 2M.

Na leitura visual, as amostras reagentes apresentaram cor amarela e as não-reagentes permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da Ab em espectrofotômetro, utilizando um filtro de 450 nm. O *cut off* correspondia à soma da média dos valores de Ab dos controles negativo e positivo, dividida por 2. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de absorvância maiores que o *cut off* foram consideradas reagentes enquanto que aquelas com valores de absorvância menores que o *cut off* foram consideradas não-reagentes.

Sensibilização das placas com anticorpo anti-IgM humana (anti- $\mu$ )



**Incubação a 4°C/ 18 horas**

Amostras teste e controles diluídos a 1:1000



**Incubação a 37°C /1hora**

**Proteína recombinante diluída a 1:3500**



**Incubação a 37°C /1hora**

**Conjugado anti- proteína recombinante marcado com peroxidase diluído a 1:5000**



**Incubação a 37°C /1hora**

Revelação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB

**Quadro 2:** Método 1 - ELISA desenvolvido por Bio-manguinhos utilizando proteína recombinante do HAV como antígeno e o conjugado anti-proteína recombinante produzido em coelho.



#### 4.10.2 – Método 2 (Quadro 3)

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com anticorpos anti-imunoglobulina M humana (anti- $\mu$ ), produzidos em cabra. Para sensibilização, os anticorpos anti- $\mu$  humano foram diluídos a 1:1000 em tampão carbonato pH 9,6 e então as placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. As amostras teste e os controles positivos e negativos, diluídos a 1:1000, foram adicionados e as placas foram incubadas por 1h a 37°C. Após incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. A etapa seguinte foi precedida pela adição do antígeno HAV de cultivo celular estocado a -70°C (125  $\mu$ g/por orifício), incubando-se as placas por 1h a 37°C. Após a lavagem com PBS-T foi adicionado o conjugado anti-proteína recombinante, produzido em coelho, diluído a 1:5000, a reação foi incubada 1h a 37°C. As placas foram lavadas com PBS-T e, em seguida o substrato juntamente com o TMB foram adicionados. Após 10 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico 2M.

Na leitura visual as amostras reagentes apresentaram cor amarela e as não reagentes permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da Ab em espectrofotômetro, utilizando um filtro de 450 nm. O *cut off* correspondia à soma da média dos valores de Ab dos controles negativo e positivo, dividida por 2. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de absorvância maiores que o *cut off* foram consideradas reagentes enquanto que aquelas com valores de absorvância menores que o *cut off* foram consideradas não-reagentes.

Sensibilização das placas com anticorpo anti-IgM humana (anti- $\mu$ )



**Incubação a 4°C /18 horas**

Amostras teste e controles diluídos a 1:1000



**Incubação a 37°C /1hora**

Antígeno HAV estocado a -70°C



**Incubação a 37°C /1hora**

**Conjugado anti- proteína recombinante marcado com peroxidase diluído a 1:5000**



**Incubação a 37°C /1hora**

Revelação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB

**Quadro 3:** Método 2 - ELISA desenvolvido por Bio-manguinhos utilizando o antígeno HAV produzido em cultivo celular convencional e o conjugado anti-proteína recombinante.

#### 4.10.3. Método 3 (Quadro 4).

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com anticorpos anti-imunoglobulina M humana (anti- $\mu$ ) produzidos em cabra. Para sensibilização os anticorpos anti- $\mu$  humano foram diluídos a 1:1000 em tampão carbonato pH 9,6 e então as placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. As amostras teste e os controles positivos e negativos diluídos a 1:1000, foram adicionados e as placas incubadas por 1h a 37°C. Após incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T. A etapa seguinte foi a adição da proteína recombinante (0,0011 $\mu$ g/ por orifício), incubando-se as placas por 1h a 37°C. Após a lavagem com PBS-T, foi adicionado o conjugado anti-HAV (mistura de soros humanos), diluído a 1:5000, e a reação foi incubada 1h a 37°C. As placas foram lavadas com PBS-T, e em seguida, o substrato juntamente com oTMB foram então adicionados. Após 10 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico 2M.

Na leitura visual, as amostras positivas apresentaram cor amarela e as negativas permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da Ab em espectrofotômetro utilizando um filtro de 450 nm. O *cut off* correspondia à soma da média dos valores de Ab dos controles negativo e positivo, dividida por 2. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de absorvância maiores que o *cut off* foram consideradas reagentes enquanto que aquelas com valores de absorvância menores que o *cut off* foram consideradas não-reagentes.

Sensibilização das placas com anticorpo anti-IgM humana (anti- $\mu$ )



Incubação a 4°C /18 horas

Amostras teste e controles diluídos a 1:1000



Incubação a 37°C /1hora

**Proteína recombinante diluída a 1:3500**



Incubação a 37°C /1hora

Conjugado anti-HAV (mistura de soros humanos) marcado com peroxidase diluído a 1:5000



Incubação a 37°C /1hora

Revelação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB

**Quadro 4:** Método 3 - ELISA desenvolvido por Bio-manguinhos utilizando proteína recombinante do HAV com antígeno.

#### 4.10.4. Método 4 (Quadro 5).

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com proteína recombinante (0.0011µg/ por orifício). Para sensibilização a proteína recombinante foi diluída a 1:1000 em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e então as placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com tampão fosfato (PBS) pH 7,2 /Tween 20 a 0,5% (PBS-T), adicionados albumina bovina (BSA) a 1:20. As amostras teste e os controles positivos e negativos diluídos a 1:1000, foram adicionados e as placas foram incubadas por 1h a 37°C. Após incubação as microplacas foram lavadas seis vezes com PBS-T + BSA. A etapa seguinte foi procedida pela adição de anticorpos anti-imunoglobulina M humana (anti-µ) comercial, conjugadas à peroxidase, preparados seguindo o método de metaperiodato descrito por Nakane e Kawoi (1974) modificado por Camargo e cols. (1987). As placas após incubação por 1h a 37°C, foram lavadas com PBS-T + BSA e em seguida o substrato de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a solução reveladora de tetrametilbenzidina (TMB) foram, então, adicionados. Após 10 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico 2M.

Na leitura visual, as amostras positivas apresentaram cor amarela e as negativas permaneceram incolores. O resultado final do teste foi obtido pela leitura da absorbância (ABS) em espectrofotômetro utilizando um filtro de 450 nm. O ponto de corte (*cut off*) correspondia à soma da média dos valores de ABS dos controles negativo e positivo, dividida por 2. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: amostras com valores de absorbância maiores que o ponto de corte (*cut off*) foram consideradas reagentes enquanto que aquelas com valores de absorbância menores que o ponto de corte (*cut off*) foram consideradas não-reagentes.

O método 4 foi o método de escolha para o ELISA utilizando a proteína recombinante, por ser simples e principalmente específico, quando comparado com os demais testes analisados.

**Proteína recombinante diluída a 1:3500**



**Incubação a 4°C /18 horas**

Amostras teste e controlos diluídos a 1:1000



**Incubação a 37°C /1hora**

Anticorpo anti-IgM humana (anti- $\mu$ ) marcado com peroxidase diluído a 1:20.000



**Incubação a 37°C /1hora**

Revelação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB

**Quadro 5:** Método 4 - ELISA utilizando proteína recombinante.

#### **4.12. Análise estatística.**

Os dados foram armazenados inicialmente nos programas Access 2000 e Excel (Microsoft Inc., 2003) e em seguida convertido para o programa Epidat versão 3.0 (OPAS, Xunta de Galicia) para realização da análise estatística.

#### 4.12.1. Sensibilidade e especificidade.

A sensibilidade e a especificidade são as medidas tradicionais básicas de valor de um teste diagnóstico. Medem a discriminação diagnóstica de um teste relacionando a um critério de referência, que é considerado verdadeiro. Estes indicadores permitem avaliar diretamente a eficácia de um teste e esperar resultados semelhantes quando aplicados em países regiões ou ambientes diferentes.

Para análise da sensibilidade e especificidade dos testes EIE-CD/ IOC, EIE-CI/ EXP ou EIE-PTNREC/ EXP, o “padrão de referência” (verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos) foi definido pela concordância entre os valores qualitativos da maioria dos testes, inclusive dos testes comerciais EIE-BIOKIT e EIE-BIOMÉRIEUX. As amostras com “status” indeterminado foram excluídas dos cálculos de concordância em todos os testes.

Os cálculos de especificidade e sensibilidade foram feitos baseados nas fórmulas abaixo:

- **Fórmulas**

a = verdadeiro positivo

b = falso positivo

c = falso negativo

d = verdadeiro negativo

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b + d}$$

#### 4.12.2. Testes de concordância.

Foi utilizado cálculos do índice Kappa, para avaliar a concordância entre os resultados apresentados no EIE-BIOKIT e os resultados dos testes EIE-CD/ IOC,

EIE-CI/ EXP, EIE-PTNREC/ EXP, (Tabela 1). O índice Kappa é uma medida de concordância qualitativa entre dois grupos, o critério de referência (EIE-BIOKIT) e o teste avaliado (EIE-CD/ IOC, EIE-CI/ EXP ou EIE-PTNREC/ EXP), quanto mais próximo de 1, maior a concordância. As amostras com “status” indeterminado, foram excluídas dos cálculos de concordância em todos os testes.

**Tabela 1:** Grau de concordância, segundo o valor do índice Kappa ( $\kappa$ ).

<b>Concordância</b>	<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>
Deficiente	<0,20
Regular	0,21 – 0,40
Moderada	0,41 – 0,60
Boa	0,61 – 0,80
Muito boa	0,81 – 1,00



## **5 – RESULTADOS.**

### **5.1. EIE-CAPTURA DIRETO/ IOC X EIE-CAPTURA INDIRETO/ EXPERIMENTAL.**

#### **5.1.1.Comparação dos resultados dos EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.**

A Tabela 2 mostra os resultados de absorbância (Abs) de todas as 237 amostras de soro testadas no EIE-CD/IOC, no EIE-CI/EXP e no EIE-PTNREC/EXP (Método 4). As amostras também foram testadas em dois testes comerciais, HEPANOSTIKA HAV IgM - EIE-BIOMÉRIEUX e no BIOELISA HAV IgM – EIE-BIOKIT.

Baseando-se na concordância de resultados entre os diferentes testes, 207 amostras, sendo 75 reagentes e 132 não-reagentes, apresentaram resultados concordantes em todos os testes analisados. Trinta amostras de soro foram discordantes nos testes EIE-CD/ IOC, EIE-CI/ EXP, EIE-PTNREC/ EXP (Método 4), no EIE-BIOKIT e no EIE-BIOMÉRIEUX. Oito amostras de soro apresentaram, no ELISA comercial EIE-BIOMÉRIEUX, resultados discordantes. O EIE-CI/ EXP apresentou 4 amostras divergentes. Onze amostras apresentaram resultados discordantes no EIE-CD/ IOC e o ELISA comercial EIE-BIOKIT, apresentou 1 amostra divergente (1734/01). O EIE-PTNREC/ EXP não apresentou nenhuma amostra com resultado discordante. As amostras 698/01, 966/01, 1162/01, 1164/01, 1655/01 e 2096/01 apresentaram “status” indeterminado (amostras com 2 ou mais resultados discordantes nos testes analisados). As amostras com resultados discordantes e/ou indeterminados, em pelo menos um dos testes analisados, são mostradas na Tabela 6.

**Tabela 2:** Resultados obtidos pelo EIE-BIOKIT, EIE-BIOMÉRIEUX, EIE-CD/ IOC, EIE-CI/ EXP e do EIE-PTNREC EXP. Em negrito estão todas as amostras discordantes.

Amostras de soro	Valores de Abs				
	EIE-BIOKIT	EIE-BIOMÉRIEUX	EIE-CD/IOC	EIE-CI/EXP	EIE-PTNREC/EXP Método 4**
17/01	0,831 p	1,990 p	1,830 p	0,917 p	1,278 p
37/01	0,910 p	1,743 p	1,736 p	0,807 p	1,307 p
51/01	1,110 p	1,646 p	1,790 p	0,846 p	1,288 p
54/01	1,237 p	1,681 p	1,687 p	0,822 p	1,372 p
63/01	0,888 p	1,886 p	1,641 p	0,744 p	1,450 p
68/01	0,991 p	1,611 p	1,658 p	0,710 p	1,215 p
92/01	0,941 p	1,729 p	1,730 p	0,779 p	1,102 p
110/01	0,897 p	1,541 p	1,707 p	0,845 p	1,303 p
119/01	1,101 p	1,757 p	1,604 p	0,875 p	1,331 p
130/01	0,993 p	1,667 p	1,563 p	0,793 p	1,621 p
134/01	0,798 p	1,750 p	1,599 p	0,768 p	1,320 p
135/01	0,958 p	1,759 p	1,498 p	0,744 p	1,269 p
136/01	0,966 p	1,906 p	1,741 p	0,746 p	1,412 p
142/01	0,034 n	0,184 n	0,850 n	0,066 n	0,124 n
<b>147/01</b>	0,219 n	<b>1,076 p*</b>	0,877 n	0,525 n	0,868 n
159/01	0,855 p	1,328 p	1,554 p	0,908 p	1,282 p
<b>162/01</b>	0,132 n	0,654 n	<b>1,191 p*</b>	0,394 n	0,258 p
167/01	1,187 p	1,564 p	1,147 p	0,786 p	1,302 p
170/01	0,912 p	1,763 p	1,199 p	0,856 p	1,299 p
179/01	0,875 p	1,772 p	1,325 p	0,852 p	1,354 p
<b>180/01</b>	0,967 p	<b>0,302 n*</b>	1,766 p	0,833 p	1,347 p
182/01	1,125 p	1,539 p	1,191 p	0,786 p	1,330 p
187/01	0,879 p	1,276 p	1,479 p	0,871 p	1,541 p
189/01	0,951 p	1,724 p	1,634p	1,009 p	1,564 p
198/01	0,832 p	1,616 p	1,264 p	0,810 p	1,298 p
204/01	0,974 p	1,704 p	1,294 p	0,802 p	1,358 p
208/01	0,861 p	1,778 p	1,260 p	0,871 p	1,488 p
215/01	0,857 p	1,479 p	1,827 p	0,777 p	1,269 p
216/01	1,124 p	1,876 p	1,981 p	0,760 p	1,458 p
227/01	1,145 p	1,537 p	1,983 p	0,745 p	1,281 p
233/01	1,123 p	1,696 p	1,533 p	0,848 p	1,319 p
<b>234/01</b>	1,114 p	<b>0,682 n*</b>	1,548 p	0,725 p	1,265 p
269/01	0,857 p	1,838 p	1,885 p	0,855 p	1,625 p
271/01	0,987 p	1,716 p	1,654 p	0,842 p	1,308 p
288/01	0,999 p	1,810 p	1,698 p	0,804 p	1,277 p
300/01	1,247 p	1,798 p	1,909 p	0,791 p	1,568 p
301/01	1,114 p	1,487 p	1,848 p	0776 p	1,784 p
303/01	0,971 p	1,547 p	1,803 p	0,833p	1,423 p
305/01	0,245 n	0,149 n	0,123 n	0,069 n	0,352 n
306/01	0,145 n	0,255 n	0,098 n	0,269 n	0,213 n
307/01	0,089 n	0,192 n	0,125 n	0,081 n	0,111 n
311/01	1,124 p	1,945 p	1,998 p	0,763 p	1,355 p
312/01	1,211 p	1,839 p	1,927 p	0,847 p	1,622 p
316/01	0,136 n	0,206 n	0,088 n	0,048 n	0,302 n
318/01	0,998 p	1,446 p	2,184 p	0,674 p	1,274 p

## Valores de Abs

Amostras de soro	EIE-BIOKIT	EIE-BIOMÉRIEUX	EIE-CD/IOC	EIE-CI/EXP	EIE-PTNREC/EXP Método 4**
322/01	0,122 n	0,268 n	0,147 n	0,135 n	0,298 n
323/01	0,874 p	1,341 p	2,310 p	0,707 p	1,320 p
324/01	0,097 n	0,175 n	0,121 n	0,130 n	0,154 n
330/01	1,005 p	1,686 p	2,229 p	0,857 p	1,327 p
331/01	0,963 p	1,567 p	2,289 p	0,763 p	1,356 p
332/01	0,877 p	1,533 p	2,208 p	0,787 p	1,541 p
334/01	0,142 n	0,159 n	0,086 n	0,056 n	0,222 n
335/01	0,254 n	0,288 n	0,148 n	0,111 n	0,365 n
340/01	0,147 n	0,292 n	0,383 n	0,376 n	0,217 n
346/01	0,201 n	0,312 n	0,167 n	0,078 n	0,359 n
348/01	0,098 n	0,209 n	0,135 n	0,069 n	0,124 n
349/01	1,745 p	0,253 n*	2,310 p	1,481 p	1,989 p
350/01	0,140 n	0,190 n	0,221 n	0,053 n	0,245 n
352/01	0,214 n	0,221 n	0,113 n	0,270 n	0,365 n
353/01	0,178 n	0,339 n	0,102 n	0,051 n	0,198 n
357/01	1,245 p	1,567 p	2,090 p	0,780 p	1,564 p
368/01	0,065 n	0,137 n	0,146 n	0,050 n	0,123 n
370/01	0,052 n	0,146 n	0,072 n	0,065 n	0,214 n
378/01	0,085 n	0,241 n	0,185 n	0,064 n	0,145 n
391/01	0,124 n	0,261 n	0,323 n	0,087 n	0,231 n
398/01	0,178 n	0,229 n	0,179 n	0,068 n	0,310 n
404/01	0,123 n	0,128 n	0,130 n	0,050 n	0,352 n
407/01	0,064 n	0,275 n	0,353 n	0,138 n	0,245 n
408/01	0,097 n	0,175 n	0,216 n	0,049 n	0,314 n
410/01	0,155 n	0,271 n	0,215 n	0,085 n	0,365 n
423/01	0,205 n	0,180 n	0,079 n	0,044 n	0,221 n
426/01	0,215 n	0,191 n	0,066 n	0,059 n	0,398 n
428/01	0,111 n	0,160 n	0,169 n	0,070 n	0,245 n
432/01	0,054 n	0,187 n	0,068 n	0,057 n	0,296 n
441/01	0,087 n	0,163 n	0,061 n	0,057 n	0,196 n
447/01	0,065 n	0,133 n	0,143 n	0,061 n	0,256 n
449/01	1,312 p	1,430 p	0,637 n*	0,785 p	1,356 p
450/01	0,098 n	0,131 n	0,199 n	0,051 n	0,215 n
469/01	0,065 n	0,178 n	0,147 n	0,063 n	0,231 n
470/01	0,064 n	0,235 n	0,186 n	0,372 n	0,197 n
471/01	0,088 n	0,293 n	0,096 n	0,086 n	0,231 n
472/01	0,142 n	0,176 n	0,165 n	0,059 n	0,354 n
473/01	0,125 n	0,247 n	0,256 n	0,091 n	0,224 n
491/01	0,145 n	0,172 n	0,167 n	0,059 n	0,278 n
497/01	0,023 n	0,342 n	0,202 n	0,053 n	0,149 n
498/01	0,052 n	0,384 n	0,195 n	0,055 n	0,187 n
511/01	0,147 n	0,301 n	0,165 n	0,048 n	0,142 n
512/01	0,051 n	0,171 n	0,156 n	0,084 n	0,254 n
521/01	0,065 n	0,294 n	0,276 n	0,286 n	0,189 n
522/01	0,133 n	0,258 n	0,197 n	0,081 n	0,297 n
538/01	0,025 n	0,225 n	0,253 n	0,054 n	0,218 n
541/01	0,098 n	0,295 n	0,240 n	0,136 n	0,193 n
545/01	0,055 n	0,229 n	0,262 n	0,089 n	0,124 n
546/01	0,111 n	0,233 n	0,211 n	0,110 n	0,255 n
548/01	0,114 n	0,359 n	0,529 n	0,136 n	0,231 n
563/01	0,021 n	0,317 n	0,174 n	0,077 n	0,114 n
574/01	0,058 n	0,245 n	0,396 n	0,130 n	0,127 n

## Valores de Abs

Amostras de soro	EIE-BIOKIT	EIE-BIOMÉRIEUX	EIE-CD/ IOC	EIE-CI/ EXP	EIE-PTNREC/ EXI Método 4**
575/01	0,112 n	0,215 n	0,210 n	0,080 n	0,259 n
578/01	0,069 n	0,253 n	0,102 n	0,053 n	0,135 n
579/01	0,187 n	0,248 n	0,353 n	0,139 n	0,199 n
<b>586/01</b>	0,225 n	0,618 n	<b>1,573 p*</b>	0,410 n	0,588 n
599/01	0,056 n	0,165 n	0,268 n	0,066 n	0,215 n
600/01	0,044 n	0,165 n	0,275 n	0,100 n	0,235 n
602/01	0,021 n	0,291 n	0,322 n	0,112 n	0,321 n
631/01	0,074 n	0,208 n	0,233 n	0,068 n	0,333 n
632/01	0,085 n	0,181 n	0,262 n	0,061 n	0,254 n
633/01	0,158 n	0,258 n	0,289 n	0,061 n	0,241 n
639/01	0,174 n	0,238 n	0,259 n	0,090 n	0,117 n
643/01	0,085 n	0,291 n	0,297 n	0,118 n	0,169 n
647/01	0,098 n	0,279 n	0,328 n	0,117 n	0,235 n
650/01	0,065 n	0,284 n	0,282 n	0,151 n	0,231 n
659/01	0,135 n	0,202 n	0,245 n	0,096 n	0,197 n
<b>681/01</b>	0,025 n	0,173 n	0,266 n	<b>0,867 p*</b>	0,254 n
682/01	0,145 n	0,138 n	0,253 n	0,113 n	0,298 n
685/01	0,122 n	0,175 n	0,171 n	0,141 n	0,356 n
688/01	0,147 n	0,546 n	0,631 n	0,484 n	0,241 n
692/01	0,098 n	0,149 n	0,232 n	0,088 n	0,239 n
<b>698/01</b>	<b>0,087 n*</b>	<b>0,964 p*</b>	<b>0,871 n*</b>	<b>1,187 p*</b>	<b>1,654 p*</b>
707/01	0,077 n	0,169 n	0,266 n	0,086 n	0,266 n
716/01	0,154 n	0,457 n	0,514 n	0,083 n	0,325 n
721/01	0,144 n	0,416 n	0,358 n	0,071 n	0,241 n
725/01	0,065 n	0,315 n	0,251 n	0,141 n	0,287 n
730/01	0,099 n	0,191 n	0,288 n	0,097 n	0,147 n
732/01	0,062 n	0,190 n	0,311 n	0,152 n	0,215 n
751/01	0,165 n	0,396 n	0,301 n	0,178 n	0,366 n
757/01	0,125 n	0,344 n	0,473 n	0,079 n	0,358 n
761/01	0,112 n	0,271 n	0,443 n	0,066 n	0,399 n
764/01	0,132 n	0,447 n	0,563 n	0,085 n	0,254 n
778/01	0,032 n	0,214 n	0,469 n	0,067 n	0,222 n
783/01	0,054 n	0,405 n	0,612 n	0,295 n	0,401 n
790/01	0,021 n	0,160 n	0,389 n	0,074 n	0,287 n
<b>818/01</b>	0,030 n	0,211 n	0,333 n	<b>1,310 p*</b>	0,365 n
850/01	0,079 n	0,203 n	0,081 n	0,103 n	0,250 n
862/01	0,154 n	0,292 n	0,096 n	0,114 n	0,323 n
869/01	0,124 n	0,242 n	0,559 n	0,092 n	0,254 n
870/01	0,177 n	0,706 n	0,242 n	0,265 n	0,388 n
871/01	0,125 n	0,251 n	0,135 n	0,099 n	0,251 n
890/01	0,105 n	0,194 n	0,439 n	0,107 n	0,362 n
896/01	0,154 n	0,220 n	0,222 n	0,256 n	0,258 n
908/01	0,245 n	0,259 n	0,221 n	0,098 n	0,287 n
<b>921/01</b>	0,025 n	0,432 n	0,210 n	<b>1,403 p*</b>	0,365 n
925/01	0,241 n	0,417 n	0,137 n	0,160 n	0,412 n
930/01	0,158 n	0,238 n	0,122 n	0,175 n	0,239 n
931/01	0,065 n	0,342 n	0,092 n	0,238 n	0,327 n
947/01	0,035 n	0,284 n	0,837 n	0,084 n	0,269 n
<b>949/01</b>	<b>0,819 p</b>	<b>1,023 p</b>	<b>0,137 n*</b>	<b>1,006 p</b>	<b>1,520 p</b>
956/01	0,085 n	0,150 n	0,207 n	0,077 n	0,287 n
<b>957/01</b>	0,098 n	<b>1,125 p*</b>	0,114 n	0,292 n	0,269 n
958/01	0,052 n	0,232 n	0,189 n	0,096 n	0,255 n

## Valores de Abs

Amostras de soro	EIE-BIOKIT	EIE-BIOMÉRIEUX	EIE-CD/ IOC	EIE-CI/ EXP	EIE-PTNREC/ EXI Método 4**
965/01	0,154 n	0,337 n	0,065 n	0,095 n	0,365 n
<b>966/01</b>	<b>0,221 n*</b>	<b>0,945 p*</b>	<b>0,119 n*</b>	<b>1,044 p*</b>	<b>0,577 n*</b>
972/01	0,169 n	0,315 n	0,132 n	0,081 n	0,255 n
975/01	0,055 n	0,182 n	0,534 n	0,074 n	0,365 n
976/01	0,158 n	0,297 n	0,171 n	0,166 n	0,385 n
<b>981/01</b>	0,029 n	0,188 n	<b>1,340 p*</b>	0,311 n	0,391 n
992/01	0,114 n	0,206 n	0,082 n	0,096 n	0,258 n
994/01	0,158 n	0,250 n	0,114 n	0,099 n	0,365 n
<b>1000/01</b>	0,021 n	0,273 n	<b>1,873 p*</b>	0,173 n	0,274 n
1002/01	0,065 n	0,422 n	0,093 n	0,076 n	0,297 n
1017/01	0,122 n	0,273 n	0,134 n	0,052 n	0,301 n
1074/01	0,056 n	0,141 n	0,074 n	0,053 n	0,254 n
1078/01	0,147 n	0,147 n	0,127 n	0,066 n	0,321 n
<b>1162/01</b>	<b>0,088 n*</b>	<b>1,187 p*</b>	<b>1,115 p*</b>	<b>0,984 p*</b>	<b>0,596 n*</b>
<b>1164/01</b>	<b>0,055 n*</b>	<b>1,443 p*</b>	<b>1,302 p*</b>	<b>1,117 p*</b>	<b>0,392 n*</b>
1182/01	0,124 n	0,151 n	0,204 n	0,120 n	0,287 n
1192/01	0,175 n	0,235 n	0,089 n	0,098 n	0,321 n
1196/01	0,332 n	0,223 n	0,087 n	0,092 n	0,521 n
1203/01	<b>1,002 p</b>	<b>1,221 p</b>	<b>1,424 p</b>	<b>0,769 p</b>	<b>1,458 p</b>
<b>1207/01</b>	<b>1,225 p</b>	<b>0,225 n*</b>	<b>1,514 p</b>	<b>1,706 p</b>	<b>1,652 p</b>
1248/01	0,155 n	0,156 n	0,078 n	0,068 n	0,338 n
1252/01	0,147 n	0,169 n	0,087 n	0,080 n	0,452 n
1284/01	<b>1,122 p</b>	<b>1,417 p</b>	<b>2,532 p</b>	<b>1,068 p</b>	<b>1,458 p</b>
1318/01	0,388 n	0,163 n	0,174,n	0,141 n	0,396 n
1354/01	<b>1,801 p</b>	<b>1,644 p</b>	<b>2,082 p</b>	<b>1,094 p</b>	<b>2,312 p</b>
1372/01	0,063 n	0,209 n	0,111 n	0,087 n	0,366 n
1378/01	<b>1,125 p</b>	<b>1,685 p</b>	<b>2,265 p</b>	<b>1,041 p</b>	<b>1,335 p</b>
1382/01	<b>1,885 p</b>	<b>1,369 p</b>	<b>1,323 p</b>	<b>0,839 p</b>	<b>1,699 p</b>
1386/01	<b>1,654 p</b>	<b>1,333 p</b>	<b>2,107 p</b>	<b>1,007 p</b>	<b>1,785 p</b>
1391/01	<b>1,022 p</b>	<b>1,522 p</b>	<b>2,199 p</b>	<b>1,044 p</b>	<b>1,341 p</b>
1394/01	<b>1,542 p</b>	<b>1,520 p</b>	<b>2,050 p</b>	<b>1,128 p</b>	<b>1,855 p</b>
<b>1395/01</b>	0,030 n	0,306 n	<b>2,150 p*</b>	0,148 n	0,213 n
1401/01	0,069 n	0,283 n	0,231 n	0,219 n	0,220 n
1420/01	<b>1,254 p</b>	<b>1,603 p</b>	<b>1,222 p</b>	<b>1,127 p</b>	<b>1,245 p</b>
1421/01	0,354 n	0,221 n	0,462 n	0,189 n	0,387 n
1431/01	<b>1,025 p</b>	<b>1,448 p</b>	<b>1,339 p</b>	<b>0,964 p</b>	<b>1,341 p</b>
1432/01	0,325 n	0,144 n	0,354 n	0,097 n	0,254 n
1442/01	<b>1,654 p</b>	<b>2,531 p</b>	<b>1,238 p</b>	<b>1,320 p</b>	<b>1,789 p</b>
1453/01	<b>1,475 p</b>	<b>2,604 p</b>	<b>1,216 p</b>	<b>1,362 p</b>	<b>1,396 p</b>
1463/01	0,065 n	0,469 n	0,149 n	0,075 n	0,321 n
1480/01	0,045n	0,231 n	0,125 n	0,064 n	0,296 n
1484/01	0,125 n	0,564 n	0,132 n	0,056 n	0,365 n
<b>1540/01</b>	0,040 n	0,701 n	<b>1,165 p*</b>	0,387 n	0,699 n
1552/01	<b>1,654 p</b>	<b>2,479 p</b>	<b>1,685 p</b>	<b>1,462 p</b>	<b>1,789 p</b>
<b>1561/01</b>	<b>1,524 p</b>	<b>0,589 n*</b>	<b>1,348 p</b>	<b>1,008 p</b>	<b>1,455 p</b>
<b>1599/01</b>	<b>1,897 p</b>	<b>0,629 n*</b>	<b>1,823 p</b>	<b>1,621 p</b>	<b>1,963 p</b>
<b>1629/01</b>	0,032 n	0,274 n	<b>1,617 p*</b>	0,285 n	0,415 n
<b>1632/01</b>	0,023 n	0,223 n	<b>1,555 p*</b>	0,459 n	0,388 n
<b>1655/01</b>	<b>0,235 n*</b>	<b>1,105 p*</b>	<b>1,311 p*</b>	<b>0,760 p*</b>	<b>0,308 n*</b>
1670/01	<b>1,547 p</b>	<b>2,646 p</b>	<b>1,398 p</b>	<b>1,314 p</b>	<b>1,564 p</b>
1708/01	<b>1,254 p</b>	<b>2,656 p</b>	<b>2,108 p</b>	<b>1,656 p</b>	<b>1,688 p</b>
1729/01	<b>1,365 p</b>	<b>2,541 p</b>	<b>2,252 p</b>	<b>1,460 p</b>	<b>1,745 p</b>

## Valores de Abs

Amostras de soro	EIE-BIOKIT	EIE-BIOMÉRIEUX	EIE-CD/ IOC	EIE-CI/ EXP	EIE-PTNREC/ EXI Método 4**
<b>1734/01</b>	<b>1,878 p*</b>	0,137 n	0,275 n	0,077 n	0,296 n
1743/01	1,002 p	2,420 p	2,367 p	1,327 p	1,321 p
1747/01	1,054 p	2,594 p	2,047 p	1,282 p	1,652 p
<b>1775/01</b>	0,031 n	0,307 n	<b>1,415 p*</b>	0,100 n	0,225 n
1805/01	1,254 p	2,610 p	2,301 p	1,374 p	1,585 p
1837/01	1,547 p	2,794 p	1,976 p	1,357 p	1,399 p
1838/01	1,666 p	2,804 p	1,523 p	1,446 p	1,991 p
1850/01	1,274 p	2,596 p	2,032 p	1,538 p	1,652 p
1874/01	1,654 p	2,393 p	2,143 p	1,412 p	1,808 p
1877/01	1,325 p	2,591 p	1,832 p	1,300 p	1,779 p
1882/01	1,587 p	2,652 p	1,801 p	1,280 p	1,856 p
1883/01	0,222 n	0,353 n	0,274 n	0,449 n	0,458 n
1887/01	1,654 p	2,598 p	1,832 p	1,285 p	1,901 p
1888/01	1,542 p	2,745 p	1,548 p	1,260 p	1,698 p
1889/01	1,324 p	2,821 p	1,992 p	1,371 p	1,874 p
1897/01	1,555 p	1,325 p	2,135 p	1,535 p	1,730 p
1899/01	0,054 n	0,125 n	0,257n	0,061 n	0,221 n
1931/01	1,215 p	2,488 p	1,603 p	1,268 p	1,653 p
1987/01	0,123 n	0,143 n	0,286 n	0,060 n	0,198 n
1988/01	1,254 p	1,459 p	2,050 p	1,346 p	1,499 p
1990/01	0,251 n	0,162 n	0,235 n	0,073 n	0,266 n
2000/01	1,522 p	2,254 p	2,398 p	1,377 p	1,633 p
2001/01	1,365 p	2,800 p	2,284 p	1,418 p	1,856 p
2015/01	0,335 n	0,385 n	0,286 n	0,122 n	0,279 n
2036/01	0,277 n	0,559 n	0,811 n	0,065 n	0,255 n
2039/01	0,241 n	0,120 n	0,270 n	0,074 n	0,375 n
2045/01	1,547 p	2,355 p	2,260 p	1,244 p	1,963 p
2050/01	0,241 n	0,215 n	0,273 n	0,074 n	0,369 n
2051/01	0,254 n	0,264 n	0,281 n	0,076 n	0,241 n
2054/01	0,054 n	0,296 n	0,270 n	0,055 n	0,278 n
2057/01	0,047 n	0,392 n	0,276 n	0,090 n	0,308 n
<b>2070/01</b>	0,028 n	0,444 n	0,231n	<b>1,467 p*</b>	0,285 n
2077/01	0,112 n	0,684 n	0,201 n	0,172 n	0,256 n
<b>2096/01</b>	<b>0,798 p*</b>	<b>0,123 n*</b>	<b>0,307 n*</b>	<b>0,908 p*</b>	<b>1,299 p*</b>
2106/01	0,135 n	0,126 n	0,207 n	0,076 n	0,350 n
2107/01	0,147 n	0,288 n	0,215 n	0,082 n	0,265 n
<b>Cut off</b>	<b>0,691</b>	<b>0,909</b>	<b>0,972</b>	<b>0,650</b>	<b>1,148</b>

(p) Amostras reagentes.

(n) Amostras não-reagentes.

\* Amostras discordantes.

\*\* Método de escolha do ELISA utilizando proteína recombinante, apresentando menos reações inespecíficas.

### 5.1.2. Comparação da especificidade e sensibilidade dos EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.

A concordância dos testes foi avaliada, de acordo com o valor do índice Kappa ( $\kappa$ ), sendo considerada satisfatória quando  $\kappa \geq 0,6$ . A sensibilidade e especificidade do EIE-CD/ IOC foram 97,6% e 92,6% respectivamente, e do EIE-CI/ EXP foi de 98,5% e 94,9% respectivamente. O valor de Kappa foi 0,878 para o EIE-CD/ IOC e 0,907 para o EIE-CI/ EXP.

O EIE-CI/ EXP apresentou sensibilidade e especificidade superiores ao EIE-CD/ IOC, além disso, a concordância foi superior. Esses dados sugerem que dentre os dois testes, o EIE-CI/ EXP constitua o melhor teste para detecção de anticorpos anti-HAV IgM (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dados de sensibilidade e especificidade dos testes EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.

	<b>EIE-CD/ IOC</b>	<b>EIE-CI/ EXP</b>
<b>Sensibilidade</b>	97,6%	98,5%
<b>Especificidade</b>	92,9%	94,9%
<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>	0,878	0,907

## 5.2. Avaliação da estabilidade do antígeno HAV pelo EIE-CD/ IOC.

### 5.2.1. Avaliação após a adição de crio preservadores.

A adição de glicerol e DMSO nas concentrações de 10 e 20% não impediram o congelamento da suspensão viral. O glicerol e o DMSO nas concentrações de 30, 40 e 50% impediram o congelamento da suspensão viral, porém interferiram no desempenho do EIE-CD/ IOC. Os controles positivos e negativos e as amostras testes não apresentaram leitura.

### **5.2.2. Avaliação após o processo de liofilização.**

Um dos grandes problemas do teste anti-HAV IgM, desenvolvido pelo IOC, é a instabilidade viral. O antígeno não mantém o título quando é descongelado, mais de uma vez, ou descongelado inadequadamente. A absorvância das amostras e dos controles cai, conseqüentemente o ensaio perde a reprodutibilidade e a confiança, já que aumenta a probabilidade de resultados falso-negativos.

O processo de liofilização combinado com a utilização de um estabilizador viral foi utilizado com o objetivo de tentar manter a estabilidade do antígeno HAV e a reprodutibilidade do teste, além de facilitar as condições de armazenamento, estocagem e transporte.

Para realização do EIE-CD/ IOC foram utilizadas alíquotas novas do antígeno controle e do antígeno liofilizado. Assim, para cada teste utilizou-se uma alíquota do antígeno HAV controle, que foi descongelada, e do antígeno HAV liofilizado, que foi reconstituída no momento em que foi realizado o EIE-CD/ IOC, para compararmos os resultados do antígeno controle e do antígeno após a liofilização.

A Tabela 4 mostra que a liofilização não alterou o desempenho do teste. As alíquotas do HAV de cultivo celular liofilizado, estocadas a 4°C, mantiveram-se estáveis desde o 1º dia de liofilização até, pelo menos, seis meses após a mesma. As amostras testadas não apresentaram queda na absorvância, nem resultados falso-negativos.

Comparando-se os resultados dos testes realizados com o antígeno liofilizado e com suspensão de antígeno controle, estocado a -20°C observou-se que a absorvância das amostras testadas no EIE-CD/ IOC utilizando o HAV liofilizado, foi mais alta que a absorvância das amostras testadas com HAV controle. Isso não causou alteração nos resultados obtidos com as amostras, ou seja, as amostras positivas continuaram positivas e as negativas permaneceram negativas (Tabela 4).



**Tabela 4:** Avaliação do desempenho do EIE-CD/ IOC, com a utilização dos antígenos HAV controle e liofilizado (em cinza). As amostras de antígeno liofilizado foram testadas no ELISA, durante período de 1 dia a 6 meses e os resultados comparados com o teste controle.

**VALORES DE Abs**

Amostras de soro	** 1º dia CONTROLE	* 1º dia	** 1 mês CONTROLE	* 1 mês	** 2 meses CONTROLE	* 2 meses	** 3 meses CONTROLE	* 3 meses	** 4 meses CONTROLE	* 4 meses	** 5 meses CONTROLE	* 5 meses	** 6 meses CONTROLE	* 6 meses
1	0,778p	0,954p	0,754p	0,988p	0,745p	0,945p	0,712p	0,990p	0,799p	0,956p	0,775p	0,981p	0,788p	0,944p
2	0,815p	1,005p	0,854p	1,021p	0,774p	1,001p	0,874p	1,058p	0,765p	1,077p	0,712p	1,010p	0,745p	1,037p
3	0,754p	0,987p	0,784p	0,998p	0,799p	0,974p	0,698p	0,965p	0,631p	0,925p	0,752p	0,931p	0,795p	0,957p
4	0,111n	0,121n	0,126n	0,122n	0,098n	0,121n	0,134n	0,130n	0,091n	0,111n	0,110n	0,115n	0,117n	0,125n
5	0,090n	0,132n	0,096n	0,130n	0,099n	0,135n	0,102n	0,128n	0,092n	0,125n	0,123n	0,137n	0,114n	0,133n
6	0,090n	0,129n	0,099n	0,130n	0,097n	0,124n	0,101n	0,111n	0,095n	0,124n	0,097n	0,127n	0,099n	0,125n
7	0,102n	0,158n	0,114n	0,169n	0,121n	0,145n	0,124n	0,134n	0,122n	0,156n	0,095n	0,147n	0,097n	0,170n
8	0,698p	0,880p	0,705p	0,887p	0,721p	0,821p	0,706p	0,896p	0,699p	0,821p	0,674p	0,741p	0,788p	0,855p
9	0,102n	0,123n	0,100n	0,131n	0,098n	0,130n	0,097n	0,124n	0,124n	0,125n	0,124n	0,136n	0,106n	0,140n
10	0,102n	0,130n	0,100n	0,130n	0,127n	0,154n	0,114n	0,162n	0,111n	0,124n	0,092n	0,120n	0,093n	0,133n
11	0,100n	0,120n	0,104n	0,124n	0,125n	0,127n	0,096n	0,145n	0,098n	0,134n	0,097n	0,158n	0,122n	0,129n
12	0,096n	0,140n	0,099n	0,125n	0,095n	0,144n	0,110n	0,132n	0,108n	0,132n	0,112n	0,178n	0,128n	0,138n
13	0,123n	0,123n	0,124n	0,122n	0,115n	0,135n	0,120n	0,123n	0,127n	0,120n	0,122n	0,137n	0,122n	0,138n
14	0,122n	0,129n	0,127n	0,169n	0,096n	0,133n	0,099n	0,152n	0,124n	0,142n	0,124n	0,174n	0,126n	0,121n
15	0,598p	0,652p	0,587p	0,645p	0,546p	0,681p	0,622p	0,654p	0,600p	0,632p	0,587p	0,647p	0,597p	0,699p
16	0,885p	0,990p	0,841p	0,966p	0,854p	0,952p	0,799p	0,926p	0,748p	0,964p	0,889p	0,948p	0,781p	0,956p
17	0,741p	1,002p	0,789p	0,987p	0,799p	0,965p	0,763p	0,985p	0,641p	0,968p	0,784p	1,012p	0,793p	1,005p
18	0,881p	0,921p	0,841p	0,935p	0,875p	0,965p	0,852p	0,941p	0,796p	0,933p	0,889p	0,987p	0,805p	0,932p
19	0,854p	0,985p	0,965p	0,966p	0,999p	1,112p	0,874p	1,110p	0,857p	1,008p	0,863p	0,988p	0,899p	0,997p
20	0,601p	0,652p	0,625p	0,648p	0,698p	0,654p	0,633p	0,600p	0,587p	0,644p	0,700p	0,687p	0,620p	0,599p

(p) Amostras reagentes.

(n) Amostras não-reagentes.

\*\* HAV CONTROLE.

\*HAV LIOFILIZADO.

### 5.2.3. Comparação dos resultados da análise dos soros por EIE-CD/ IOC utilizando as mesmas alíquotas do antígeno controle e do antígeno liofilizado, submetido a ciclos de congelamento/descongelamento.

A Tabela 5 mostra os resultados do EIE-CD/ IOC realizado com as amostras do antígeno controle e do antígeno liofilizado, porém nesta avaliação as mesmas alíquotas foram utilizadas nos três testes. No primeiro ciclo, a alíquota do HAV controle foi descongelada e utilizada no EIE-CD/ IOC, o HAV liofilizado foi reconstituído e testado. Essas mesmas alíquotas foram congeladas a -20°C, e descongeladas por mais duas vezes e testadas no EIE-CD/ IOC após cada descongelamento.. Foi observado que as leituras da absorbância, tanto do título do antígeno controle como do antígeno liofilizado, diminuía ao longo dos ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras de soro sabidamente reagentes tornaram-se não-reagentes pelo EIE-CD/ IOC, realizado com as alíquotas de antígeno controle e antígeno liofilizado após o terceiro ciclo de congelamento e descongelamento.

**Tabela 5:** Avaliação da estabilidade dos antígenos HAV controle e liofilizado no EIE-CD/ IOC, depois de serem submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento.

#### VALORES DE Abs

Amostras de soro	** 1°	* 1°	** 2°	* 2°	** 3°	* 3°
	descongelamento CONTROLE	descongelamento LIOFILIZADO	descongelamento CONTROLE	descongelamento LIOFILIZADO	descongelamento CONTROLE	descongelamento LIOFILIZADO
15	0,877p	0,901p	0,652p	0,440p	0,330p	0,216p
101	0,931p	0,995p	0,725p	0,531p	0,400p	0,299p
118	0,790p	0,793p	0,599p	0,479p	0,317p	0,195p
132	0,122n	0,157n	0,080n	0,071n	0,055n	0,024n
146	0,097n	0,103n	0,078n	0,070n	0,041n	0,028n
158	0,905p	0,971p	0,791p	0,605p	0,397p	0,278p
181	1,101p	1,233p	0,977p	0,808p	0,508p	0,437p
198	0,857p	0,922p	0,743p	0,701p	0,422p	0,203p
C+	0,987p	0,971p	0,434p	0,371p	0,260p	0,166p
C+	0,952p	0,994p	0,455p	0,355p	0,254p	0,168p
C+	0,966p	0,958p	0,440p	0,369p	0,263p	0,191p
C+	0,971p	0,998p	0,478p	0,334p	0,278p	0,174p
C-	0,065n	0,068n	0,066n	0,064n	0,087n	0,064n
C-	0,068n	0,069n	0,063n	0,062n	0,069n	0,067n
C-	0,077n	0,067n	0,069n	0,063n	0,066n	0,064n
C-	0,064n	0,087n	0,078n	0,064n	0,061n	0,068n
<b>Cut off</b>	<b>0,518n</b>	<b>0,526n</b>	<b>0,260n</b>	<b>0,210n</b>	<b>0,166n</b>	<b>0,128n</b>

(p) Amostras reagentes.

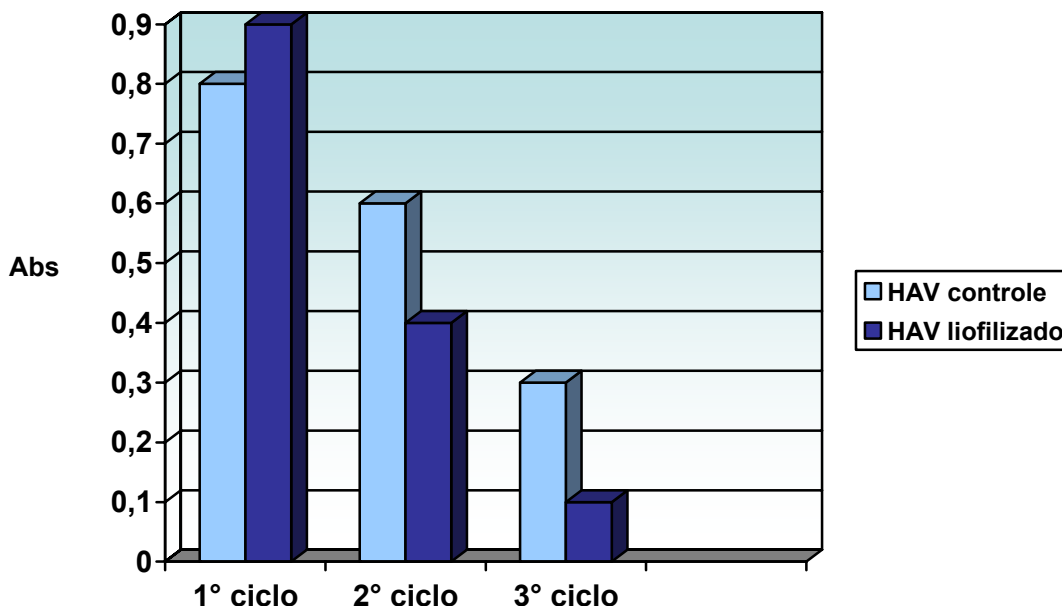
(n) Amostras não-reagentes.

\*\* HAV CONTROLE.

\* HAV LIOFILIZADO.

A absorvância das amostras de soro testadas caiu vertiginosamente a partir do segundo ciclo de congelamento e descongelamento. A figura 13 mostra a comparação da queda dos valores de absorvância dos antígenos HAV controle e liofilizado pelo EIE-CD/ IOC, após a 1°, 2° e 3° ciclos de congelamento/ descongelamento.

**Figura 8:** Comparação entre os valores dos resultados de absorvância dos antígenos HAV controle e liofilizado, no EIE-CD/ IOC.



### **5.3. ELISA IgM ANTI-HAV – PROTEÍNA RECOMBINANTE/ EXPERIMENTAL (EIE-PTNREC/ EXP).**

Foram testados quatro diferentes métodos nos quais se utilizava proteína recombinante no ELISA, para detecção de anticorpos anti-HAV IgM, tentou-se preservar o desenho original do teste (EIE-CD/IOC) desenvolvido pelo LDT/IOC/FIOCRUZ. O método 1, utilizou a proteína recombinante e em seguida o conjugado anti-proteína recombinante, não sendo possível diferenciar as amostras reagentes das não-reagentes, ou seja, o teste foi inconclusivo. Os métodos 2 e 3 apresentaram resultados melhores que os obtidos no método 1, pois foi possível identificar as amostras reagentes das não-reagentes, porém as reações inespecíficas comprometeram a interpretação dos resultados. O método 4 é um teste ELISA direto clássico, e foi o método de escolha por apresentar menos reações inespecíficas.

#### **5.3.1. Comparação dos resultados obtidos no EIE-PTNREC/EXP com os demais testes.**

Na Tabela 6 são mostrados os resultados obtidos nas 30 amostras discordantes, pela utilização dos testes EIE-PTNREC /EXP, EIE-CD/ IOC, EIE-CI/ EXP e nos ELISA comerciais (EIE-BIOKIT e EIE-BIOMÉRIEUX). O ELISA utilizando a proteína recombinante (EIE-PTNREC/ EXP), pela utilização do método 4, apresentou resultados similares àqueles obtidos no EIE-CI/ EXP e com alta concordância com os todos testes utilizados no estudo. As demais 207 amostras apresentaram pelo teste EIE-PTNREC/ EXP, resultados similares aos obtidos nos demais testes utilizados (Tabela 2). O EIE-PTNREC/ EXP não apresentou nenhum resultado discordante, no entanto as amostras 234/01 e 2096/01 que apresentavam resultados reagentes, após os cálculos de ABS/ CUT OFF, passaram a apresentar resultados não-reagentes. A amostra 147/01 pelo teste EIE-CI/ EXP, não-reagente, após os cálculos de ABS/ CUTT OFF passou a apresentar resultado reagente (Tabela 6). As amostras 147/01, 234/01 e 2096/01 foram definidas como indeterminadas, pois apresentaram 2 ou mais resultados discordantes, nos testes analisados.

**Tabela 6:** Apresentação dos resultados de Abs/ CUT OFF, das amostras discordantes e indeterminadas (em cinza), no EIE-BIOKIT, EIE-BIOMÉRIEUX, EIE-CD/IOC, EIE-CI/EXP e no EIE-PTNREC/EXP.

Amostras de soro	EIE-BIOKIT		EIE-BIOMÉRIEUX		EIE- CD/IOC		EIE-CI/EXP		EIE-PTNREC/EXP Método 4**	
	Abs/Cut off		Abs/Cut off		Abs/Cut off		Abs/Cut off		Abs/Cut off	
147/01	0,219 n	0,319 n	<b>1,076 p*</b>	<b>1,183 p*</b>	0,877n	0,902n	<b>0,525n</b>	<b>0,807 p*</b>	0,868 n	0,756 n
162/01	0,132 n	0,191 n	0,654 n	0,719 n	<b>1,191 p*</b>	<b>1,225 p*</b>	0,394 n	0,606 n	0,258 n	0,222 n
180/01	<b>0,967 p</b>	<b>1,399 p</b>	<b>0,302 n*</b>	<b>0,437 n*</b>	<b>1,766 p</b>	<b>1,816 p</b>	<b>0,833 p</b>	<b>1,281 p</b>	<b>1,347 p</b>	<b>1,173 p</b>
234/01	<b>1,114 p</b>	<b>1,612 p</b>	<b>0,682 n*</b>	<b>0,750 n*</b>	<b>1,548 p</b>	<b>1,592 p</b>	<b>0,725 p</b>	<b>1,115 p</b>	<b>1,265 p</b>	<b>1,101 n*</b>
349/01	<b>1,745 p</b>	<b>2,525 p</b>	<b>0,253 n*</b>	<b>0,366 n*</b>	<b>2,310 p</b>	<b>2,376 p</b>	<b>1,481 p</b>	<b>2,181 p</b>	<b>1,989 p</b>	<b>1,732 p</b>
449/01	<b>1,312 p</b>	<b>1,898 p</b>	<b>1,430 p</b>	<b>1,573 p</b>	<b>0,637 n*</b>	<b>0,655 n*</b>	<b>0,785 p</b>	<b>1,207 p</b>	<b>1,356 p</b>	<b>1,181 p</b>
586/01	0,225 n	0,325 n	0,618 n	0,679 n	<b>1,573 p*</b>	<b>1,618 p*</b>	0,410 n	0,630 n	0,588 n	0,512 n
681/01	0,025 n	0,036 n	0,173 n	0,190 n	0,266 n	0,273 n	<b>0,867 p*</b>	<b>1,333 p*</b>	0,254 n	0,221 n
698/01	<b>0,087 n*</b>	<b>0,125 n*</b>	<b>0,964 p*</b>	<b>1,060 p*</b>	<b>0,871 n*</b>	<b>0,896 n*</b>	<b>1,187 p*</b>	<b>1,826 p*</b>	<b>1,654 p*</b>	<b>1,440 p*</b>
818/01	0,030 n	0,043 n	0,211 n	0,232 n	0,333 n	0,342 n	<b>1,310 p</b>	<b>2,015 p*</b>	0,365 n	0,317 n
921/01	0,025 n	0,036 n	0,432 n	0,475 n	0,210 n	0,231 n	<b>1,403 p</b>	<b>2,158 p*</b>	0,365 n	0,317 n
949/01	<b>0,819 p</b>	<b>1,185 p</b>	<b>1,023 p</b>	<b>1,125 p</b>	<b>0,137 n*</b>	<b>0,140 n*</b>	<b>1,006 p</b>	<b>1,547 p</b>	<b>1,520 p</b>	<b>1,324 p</b>
957/01	0,098 n	0,141 n	<b>1,125 p*</b>	<b>1,237 p*</b>	0,114 n	0,117 n	0,292 n	0,449 n	0,269 n	0,234 n
966/01	<b>0,221 n*</b>	<b>0,319 n*</b>	<b>0,945 p*</b>	<b>1,039 p*</b>	<b>0,119 n*</b>	<b>0,122 n*</b>	<b>1,044 p*</b>	<b>1,606 p*</b>	<b>0,577 n*</b>	<b>0,502 n*</b>
981/01	0,029 n	0,041 n	0,188 n	0,206 n	<b>1,340 p*</b>	<b>1,378 p*</b>	0,311 n	0,478 n	0,391 n	0,340 n
1000/01	0,021 n	0,030 n	0,273 n	0,300 n	<b>1,873 p*</b>	<b>1,926 p*</b>	0,173 n	0,266 n	0,274 n	0,238 n
1162/01	<b>0,088 n*</b>	<b>0,127 n*</b>	<b>1,187 p*</b>	<b>1,305 p*</b>	<b>1,115 p*</b>	<b>1,147 p*</b>	<b>0,984 p*</b>	<b>1,513 p*</b>	<b>0,596 n*</b>	<b>0,519 n*</b>
1164/01	<b>0,055 n*</b>	<b>0,079 n*</b>	<b>1,443 p*</b>	<b>1,587 p*</b>	<b>1,302 p*</b>	<b>1,339 p*</b>	<b>1,117 p*</b>	<b>1,718 p*</b>	<b>0,392 n*</b>	<b>0,341 n*</b>
1207/01	<b>1,225 p</b>	<b>1,816 p</b>	<b>0,225 n*</b>	<b>0,247 n*</b>	<b>1,514 p</b>	<b>1,557 p</b>	<b>1,706 p</b>	<b>2,624 p</b>	<b>1,652 p</b>	<b>1,433 p</b>
1395/01	0,030 n	0,043 n	0,306 n	0,336 n	<b>2,150 p*</b>	<b>2,165 p*</b>	0,148 n	0,227 n	0,213 n	0,185 n
1540/01	0,040 n	0,057 n	0,701 n	0,771 n	<b>1,165 p*</b>	<b>1,198 p*</b>	0,387 n	0,595 n	0,699 n	0,608 n
1561/01	<b>1,524 p</b>	<b>2,205 p</b>	<b>0,589 n*</b>	<b>0,644 n*</b>	<b>1,348 p</b>	<b>1,386 p</b>	<b>1,008 p</b>	<b>1,550 p</b>	<b>1,455 p</b>	<b>1,267 p</b>
1599/01	<b>1,897 p</b>	<b>2,745 p</b>	<b>0,629 n*</b>	<b>0,691 n*</b>	<b>1,823 p</b>	<b>1,875 p</b>	<b>1,621 p</b>	<b>2,493 p</b>	<b>1,963 p</b>	<b>1,709 p</b>
1629/01	0,032 n	0,046 n	0,274 n	0,301 n	<b>1,617 p*</b>	<b>1,663 p*</b>	0,285 n	0,435 n	0,415 n	0,361 n
1632/01	0,023 n	0,033 n	0,223 n	0,245 n	<b>1,555 p*</b>	<b>1,599 p*</b>	0,459 n	0,706 n	0,388 n	0,377 n
1734/01	<b>1,878 p*</b>	<b>,217 p*</b>	0,137 n	0,150 n	0,275 n	0,282 n	0,077 n	0,118 n	0,296 n	0,257 n
1775/01	0,031 n	0,044 n	0,307 n	0,337 n	<b>1,415 p*</b>	<b>1,455 p*</b>	0,100 n	0,153 n	0,225 n	0,195 n
2070/01	0,028 n	0,040 n	0,444 n	0,488 n	0,231 n	0,237 n	<b>1,467 p*</b>	<b>2,256 p*</b>	0,285 n	0,248 n
2096/01	<b>0,798 p*</b>	<b>1,154 p*</b>	<b>0,123 n*</b>	<b>0,135 n*</b>	<b>0,307 n*</b>	<b>0,315 n*</b>	<b>0,908 p*</b>	<b>1,396 p*</b>	<b>1,299 p</b>	<b>1,131 n*</b>
<b>Cut off</b>	<b>0,691</b>		<b>0,909</b>		<b>0,972</b>		<b>0,650</b>		<b>1,148</b>	

(p) Amostras reagentes.

(n) Amostras não-reagentes.

\* Amostras discordantes.

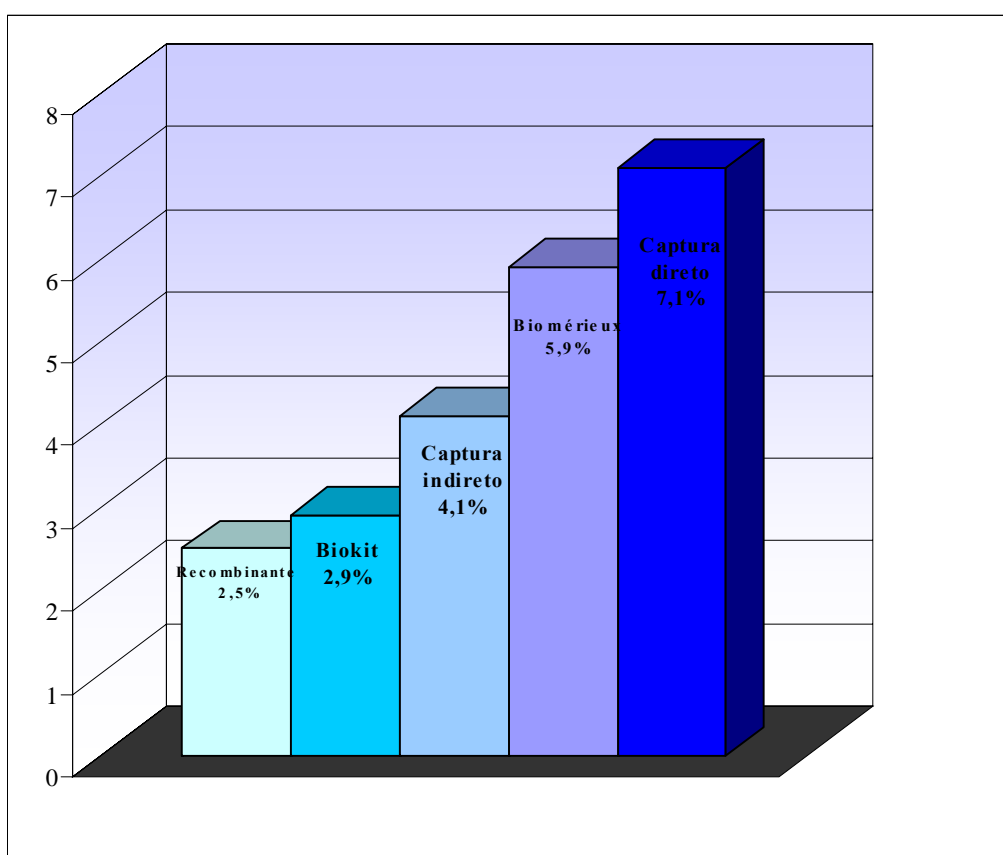
\*\* Método de escolha do ELISA utilizando proteína recombinante, apresentando menos reações inespecíficas.

### 5.3.2. Dados de discordância entre o EIE-PTNREC/ EXP e os demais testes.

A figura 14 mostra a discordância de todos os testes avaliados. Todos os testes avaliados apresentaram uma discordância inferior a 10%.

O EIE-CD/ IOC apresentou a maior discordância (7,1 %), enquanto o EIE-CI/ EXP revelou uma discordância de 4,1% em seus resultados, menor que a apresentada pelo teste comercial HEPANOSTIKA HAV IgM - EIE-BIOMÉRIEUX (5,9%), o teste comercial BIOELISA HAV IgM - EIE-BIOKIT apresentou discordância de 2,9%. Por outro lado EIE-PTNREC/ EXP apresentou a menor discordância (2,5%) entre os testes avaliados.

**Figura 14:** Porcentagens reveladoras da discordância nos EIE-CD/ IOC, EIE-CI/ EXP, EIE-BIOMÉRIEUX, EIE-BIOKIT e EIE-PTNREC/ EXP.



### 5.3.3. Sensibilidade e especificidade do EIE-PTNREC/ EXP.

O EIE-PTNREC/ EXP apresentou sensibilidade e especificidade de 99,3% e 95,9% respectivamente. A sensibilidade do teste utilizando proteína recombinante foi inferior à encontrada no EIE-CI/ EXP (98,5%). A especificidade e a concordância (baseada no índice Kappa) do EIE-PTNREC/ EXP foram superiores àquelas obtidos no EIE-CI/ EXP (Tabela 7)

**Tabela 7:** Comparação da sensibilidade e especificidade do EIE-PTNREC/ EXP e EIE-CI/ EXP.

	<b>EIE-CI/ EXP</b>	<b>EIE-PTNREC/ EXP</b>
<b>Sensibilidade</b>	98,5%	95,9%
<b>Especificidade</b>	94,9%	99,3%
<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>	0,907	0,970

### 5.3.4. Estabilidade da proteína recombinante.

Apesar de nenhum estudo mais apurado de estabilidade ter sido feito com a proteína recombinante, foi possível observar sua preservação nos ensaios realizados. Todos os testes realizados com a proteína recombinante utilizaram a mesma alíquota da proteína estocada à -20°C que foi descongelada, sem banho de gelo, no momento do uso. O congelamento e descongelamento da alíquota foram repetidos por um período de aproximadamente 6 meses, e não houve alteração na leitura da absorbância das amostras no EIE-PTNREC/EXP. Os dados iniciais sugerem que a proteína recombinante não é sensível ao processo contínuo de congelamento/descongelamento, podendo ser utilizada sem comprometer o teste.

## **6 – DISCUSSÃO.**

### **6.1. Análise comparativa entre EIE-CD/ IOC e EIE-CI/ EXP.**

Para identificar e controlar surtos de hepatite A é essencial um diagnóstico rápido e específico (Summers e cols., 1993). A infecção aguda é confirmada a partir da detecção de anticorpos anti-HAV da classe IgM (Dvemeyer e cols., 1979). Os laboratórios que fazem o diagnóstico da hepatite A utilizam testes imunoenzimáticos comerciais para determinação da presença da doença, cujo custo é elevado. Um teste ELISA de captura para IgM foi desenvolvido pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, para o diagnóstico da hepatite A.

O desenvolvimento do teste ELISA para o diagnóstico da hepatite A teve a colaboração do Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-manguinhos/ FIOCRUZ, pois é de interesse da Unidade produzir e distribuir estes ensaios imunoenzimáticos para todos os laboratórios da rede pública espalhados pelo Brasil. Porém, o teste desenvolvido apresentava problemas de instabilidade viral e inespecificidade. A fim de melhorá-lo e torná-lo eficiente, confiável e específico como os testes vendidos comercialmente, aprimoramos o EIE-CD/ IOC tornando-o um ELISA de captura direto, aplicando metodologias para implementação de estabilidade viral e por fim utilizando uma proteína recombinante, em substituição ao antígeno viral produzido em cultura de células convencional, que pareceu ser a melhor alternativa de melhoria.

Visando aumentar a especificidade, foi proposto o teste EIE-CI/ EXP como modificação do teste EIE-CD/ IOC, que têm como diferença a utilização do anti-soro (anti-HAV) detector não conjugado, seguido do acréscimo, na etapa seguinte, do conjugado anti-IgG humana comercial no EIE-CI/ EXP. Dois testes comerciais (EIE-BIOKIT e EIE-BIOMÉRIEUX) foram utilizados para comparação dos resultados obtidos nos testes em estudo. A adição do anti-anticorpo (anti-IgG humana) conjugado comercial diminuiu as reações inespecíficas do teste. O EIE-CI/ EXP apresentou uma especificidade maior (94,9%) do que aquela apresentada pelo EIE-CD/ IOC (92,9%). Houve uma melhora não só na especificidade, como também na



sensibilidade do teste, que aumentou de 97,6% no EIE-CD/ IOC para 98,5% no EIE-CI/ EXP. A amostra 147/01, não-reagente pelo teste EIE-CI/ EXP, após os cálculos de Abs/ CUT OFF, passou a apresentar resultado reagente (Tabela 6). O EIE-CI/ EXP utilizando o conjugado anti-IgG humana comercial, pareceu reduzir bastante as reações inespecíficas do teste ELISA.

Considerando que o EIE-CD/ IOC utiliza como soro detector uma mistura de soros humanos anti-HAV de pacientes que estão na fase convalescente da doença. O soro detector utilizado no teste é uma mistura de soros humanos a probabilidade de ocorrerem reações cruzadas deve ser observada em decorrência desse pool de soros conter anticorpos contra os mais diferentes epítomos, fato que pode conseqüentemente levar a resultados falsos positivos ou falsos negativos (Locarnini e cols., 1979).

Outro ponto importante é que a utilização da mistura de soros humanos para produção de conjugados necessita de um estoque permanente, contudo com as melhorias sanitárias, os casos de hepatite A estão diminuindo, portanto a obtenção de soro convalescente se torna cada vez mais escassa já que o número de pessoas suscetíveis ao HAV está aumentando (Vital e cols., 1998b). O conjugado anti-IgG humana (anti-anticorpo), adicionado na última etapa do EIE-CI/ EXP, diminuiu grande parte das reações inespecíficas do teste, no entanto foram observados resultados discordantes. Apesar de aumentar a especificidade e a sensibilidade, o EIE-CI/ EXP tem uma etapa a mais, tornando-se mais longo, o que em alguns casos deverá ser bem avaliado, pois praticidade e rapidez são elementos importantes na rotina de um laboratório de diagnóstico.

Adicionalmente outro ponto que deve ser considerado com o EIE-CD/ IOC seria a necessidade de avaliar a produção de conjugados através de soros hiperimunes de animais imunizados com HAV.

## 6.2. Análise de estabilidade do antígeno HAV.

A estabilidade do antígeno é uma das etapas com maior dificuldade no desenvolvimento tecnológico do EIE-CD/ IOC. O HAV é um vírus que apresenta replicação lenta e fastidiosa (Ticehurst e cols., 1989), além de ser sensível ao processo congelamento/descongelamento, o que dificulta sua manipulação durante o ensaio imunoenzimático.

Inicialmente o EIE-CD/ IOC foi padronizado utilizando o antígeno produzido em cultivo celular, estocado a -70°C e descongelado, no momento da realização do teste. O descongelamento da suspensão viral deve ser feito em banho de gelo, no entanto se uma mesma alíquota de antígeno for congelada/descongelada mais de uma vez os resultados serão diferentes, a absorbância dos controles e das amostras teste diminui (Tabela 5).

Na produção do antígeno, as células sofrem lise mecânica para liberação das partículas virais no sobrenadante (Gaspar e cols., 1992), provavelmente várias enzimas proteolíticas são liberadas pelas células no processo de lise e podem degradar as proteínas virais do HAV, e possivelmente proteínas estruturais importantes na interação antígeno-anticorpo, por isso a suspensão viral deve ser imediatamente congelada. Especula-se que apesar de o congelamento ser um processo de conservação eficiente, durante o processo, a água vai sendo substituída pelos cristais de gelo, alterando as características estruturais do antígeno.

Para estabilização do antígeno viral foram aqui adicionados crioprotetores, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) (Jones, 1965; Jiranek, 1966; Hansen e cols., 2005), agentes químicos muito utilizados para preservação de linhagens celulares estoque, a fim de proteger as estruturas da partícula viral durante o processo de congelamento/descongelamento. Contudo esses agentes químicos interferiram no desempenho do teste EIE-CD/ IOC, não sendo possível diferenciar as amostras reagentes das não-reagentes, dificultando a interpretação dos resultados (Resultados não apresentados).

Para implementação estabilização viral foi utilizado o processo de liofilização. A liofilização é um processo de secagem, pelo qual a água contida no produto é removida por sublimação, ou seja, partindo-se de um material previamente congelado

e submetendo-o a alto vácuo, a água passa diretamente do estado sólido para o estado gasoso. A sua aplicação permite a obtenção de produtos mais estáveis e que, portanto, conservam por um longo período de tempo suas características químicas (Hora e cols., 1992).

O processo de liofilização, manteve a estabilidade viral durante pelo menos seis meses a 4°C. O desempenho do EIE-CD/ IOC não foi comprometido pela liofilização (Tabela 4), no entanto depois de reconstituída, alíquota do antígeno viral, deverá ser utilizada uma única vez. No entanto, Bio-manguinhos, por ser uma Unidade de produção de vacinas, dispõe de um Setor de Liofilização com toda a infra-estrutura e condições adequadas para a produção em larga escala das amostras do antígeno HAV liofilizadas. O antígeno liofilizado poderá ser armazenado sob refrigeração (4°C), por longos períodos, facilitando o transporte e estocagem do teste ELISA, nos laboratórios da rede pública espalhados pelo país.

Uma outra alternativa para diminuir os custos é a produção de amostras do antígeno HAV para utilização de apenas uma fileira da microplaca, para que o usuário reconstitua no momento do uso, a quantidade de amostras necessárias para realização do ensaio, como recomendado em muitos testes comerciais.

### **6.3. Análise da utilização da proteína recombinante nos testes imunoenzimáticos.**

Mesmo com as melhorias conseguidas por meio da utilização do conjugado anti-IgG humana comercial e a estabilização do antígeno viral com a liofilização, o teste, pode ainda, ser aprimorado. Com a incorporação de mais uma etapa o ensaio torna-se mais longo, uma vez que a produção do antígeno HAV em cultivo celular é lenta (Provost & Hilleman, 1979). A utilização da mistura de soros humanos convalescentes como insumo constitui outro problema (Locarnini e cols., 1979) no EIE-CD/ IOC e/ou EIE-CI/ EXP, pois é diretamente dependente da doação de soros de indivíduos na fase convalescente da infecção pelo HAV. Com o objetivo de otimizar e modernizar o ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-HAV IgM, utilizamos no EIE-PTNREC/ EXP uma proteína recombinante do HAV

produzida *Escherichia coli*, em substituição ao antígeno HAV convencional, produzido em cultivo celular.

No mercado há diversos testes comerciais que utilizam proteínas recombinantes e vários trabalhos buscando a utilização de proteínas recombinantes em testes imunoenzimáticos, para o diagnóstico das mais variadas doenças (Quintana e cols., 2005; Ning e cols., 2005), como hepatite C e hepatite E.

Além da utilização da proteína recombinante como antígeno, deverá ser avaliada sua utilização também na obtenção de anticorpos monoclonais, para a produção de conjugados anti-HAV, pois Bio-manguinhos possui o Setor de Hibridomas que produz e distribui anticorpos monoclonais rotineiramente, com total domínio da tecnologia.

O EIE-PTNREC/ EXP, desenvolvido neste estudo, mostrou nos ensaios iniciais, ter especificidade e sensibilidade de 99,3% e 95,9%, respectivamente. Esses resultados foram melhores que os do EIE-CD/IOC com especificidade e sensibilidade de 92,9% e 97,6% respectivamente, e do EIE-CI/EXP que apresentou especificidade e sensibilidade de 94,9% e 98,5% respectivamente. A utilização da proteína recombinante tornou o teste mais específico, porém menos sensível. O teste comercial EIE-BIOMÉRIEUX apresenta 100% de especificidade e o EIE-BIOKIT, apresenta 100% de especificidade e 100% de sensibilidade (Anexos II e II). Serão necessários estudos visando um aumento da sensibilidade do EIE-PTNREC/ EXP, sem, contudo, diminuir a especificidade do teste.

O uso da proteína recombinante no EIE-PTNREC/ EXP apresenta muitas vantagens em relação ao teste ELISA usando o antígeno produzido em cultivo celular. A produção do antígeno HAV em cultivo celular convencional possui metodologia padronizada, contudo o rendimento viral é baixo (Provost & Hilleman, 1979). Apesar da produção da proteína recombinante ser trabalhosa, o rendimento é relativamente alto, pois, a proteína é expressa em *Escherichia coli*, uma bactéria de cultivo simples e crescimento rápido (Higgins & Shockman, 1971). Além disso, a quantidade da proteína recombinante utilizada no teste ELISA é inferior à quantidade usada do antígeno HAV produzido em cultivo celular convencional.

Um ponto importante é a instabilidade do antígeno viral que deve ser eliminada, já que a proteína recombinante parece se manter estável mesmo sendo

congelada/descongelada. Nenhum trabalho de estabilidade com proteína recombinante foi realizado, contudo todos os ensaios utilizaram a mesma alíquota da proteína que manteve a estabilidade, uma vez que não houve alteração na leitura das absorbâncias das amostras no teste ELISA.

Pela utilização do EIE-PTNREC/ EXP, a mistura de soros humanos, como insumo, não será mais necessária, já que o conjugado utilizado neste teste é um anticorpo anti-IgM humana produzido em cabra (anti- $\mu$ ), comprado comercialmente e conjugado à peroxidase em Bio-manguinhos, de acordo com o método de metaperiodato descrito por Nakane e Kawoi (1974) e modificado por Camargo e cols., (1987).

Um ponto relevante é a falta de bibliografia especializada o que dificulta análise e conclusão estudo. Assim, apesar de ter muitas vantagens o EIE-PTNREC/ EXP precisa ser melhor avaliado, principalmente em relação as reações inespecíficas, que foram eliminadas em grande parte pela adição de albumina bovina (BSA) no tampão de lavagem (PBS-T) (Miyakawa e cols., 2001). O EIE-PTNREC/ EXP é um teste ELISA direto clássico, no entanto a detecção de anticorpos da classe IgM por este método pode ser comprometida devido à presença simultânea de anticorpos IgG e fator reumatóide (anticorpo IgM anti-IgG), que podem reagir com o conjugado anti-IgM gerando resultados falso-negativos e/ou falso-positivos (Marmot e cols., 1978). Alguns estudos mostram métodos de remoção destes anticorpos nos soros analisados (Martins e cols., 1995), sendo uma etapa a mais no teste. Outro aspecto a ser estudado é a produção em larga escala do EIE-PTNREC/ EXP, pois nos estudos iniciais os resultados foram satisfatórios, mas é importante avaliar se os resultados se manterão em grandes lotes.

Os resultados preliminares obtidos sugerem que o ELISA anti-HAV IgM – PROTEÍNA RECOMBINANTE/ EXPERIMENTAL constitui o melhor teste para detecção de anticorpos anti-HAV IgM proposto, no entanto, são necessários testes e avaliações complementares.

## 7 – CONCLUSÕES.

- A utilização do anti-soro (anti-HAV) detector não conjugado e numa etapa seguinte o conjugado anti-IgG humana comercial, aumentou a especificidade do EIE-CI/ EXP.
- Os dados preliminares sugerem que o processo de liofilização mantém a estabilidade do antígeno HAV convencional produzido em cultivo celular, sem contudo, interferir no desempenho do teste ELISA.
- Na análise do EIE-PTNREC/ EXP, o método 4, ELISA direto clássico, foi o método de escolha por apresentar menos reações inespecíficas.
- O EIE-PTNREC/ EXP desenvolvido com a utilização de proteína recombinante traz inúmeras vantagens na produção do ELISA para diagnóstico da hepatite A, os resultados deste estudo mostram que: a proteína recombinante parece ser estável; o teste não utiliza mistura de soros humanos como insumo; o rendimento da proteína é alto; o teste é rápido e específico.
- Os resultados preliminares obtidos com os ensaios iniciais sugerem que o EIE-PTNREC/ EXP constitui-se no melhor teste para detecção de anticorpos anti-HAV IgM proposto.

## **8 – PERSPECTIVAS.**

- Necessidade de realizar um ajuste fino com painel sorológico comercial.
- Estudos de rendimento e otimização da proteína recombinante, na produção em larga escala.
- Estudos mais minuciosos de estabilidade da proteína recombinante.
- Estudos para avaliar alterações do desempenho do EIE-PTNREC/ EXP será alterado pela produção em escala industrial.
- Estudos multicêntricos para avaliar melhor o desempenho do EIE-PTNREC/ EXP, levando em consideração as diferentes prevalências da hepatite A, nas diferentes regiões do Brasil.
- E a longo prazo produção e distribuição do EIE-PTNREC/ EXP, para os laboratórios de toda rede pública, com a qualidade dos testes para diagnóstico produzidos por Bio-manguinhos.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIRE, M.; CHERNAIA, MM.; MALCOLM, BA. & JAMES, MN. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin like serine proteinases. **Nature**, **369 (6475)**:72 - 6. 1994.

ARGUEDAS, MR.; HEUDEBERT, GR.; FALLON, MB. & STINNET, AA. The cost effectiveness of hepatitis A vaccination in patients with chronic hepatitis C viral infection in the United States. **Am J Gastroenterol**, **97**:721 - 728. 2002.

ASHER, LV.; BINN, LN.; MENSING, TL.; MARCHWISCKI, RH.; VASSELL, RA.; YOUNG, GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). **J Med Virol. Nov**, **47(3)**:260-8. 1995.

BADER,TF. Hepatitis A vaccine. **Am J Gastroenterol**, **91**:217 - 222. 1996.

BALLESTEROS, J.; DAL-RE, R.; GONZALEZ, A. & del ROMERO, J. Are homosexual males a risk group of hepatitis A infection in intermediate endemic areas? **Epidemiol Infect Dis**, **117**:145 - 148. 1996.

BANKER, DD. Viral hepatitis (Part-I). **Indian J Med Sci**,**57(8)**:363 - 8. 2003.

BEUTELS, P.; EDMUNDS, WJ.; ANTONANZAS, F.; De WIT, GA.; EVANS, D.; FEILDEN, R.; FENDRICK, AM.; GINSBERG, GM.; GLICK, HA.; MAST, E.; PECHEVIS, M.; VAN DOORSLAER, EK. & VAN HOUT, BA. Viral hepatitis prevention board. Economic evaluation of vaccination programmes: a consensus statement focusing on viral hepatitis. **Pharmacoeconomics**, **20**:1 - 7. 2002.

BIANCHI, L.; De GROOTE, .J.; DESMET, VJ.; GEDIGK, P.; KORB, G.; POPPER, H.; POULSEN, H.; SCHEUER, PJ.; SCHIMID, M.; THALER H. & WEPLER,W. Morphological criteria of viral hepatitis. **Dtsch Med Wochenschr**, **96(47)**:1817 - 1821. 1971.



BISHOP, NE. & ANDERSON, DA. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. **Virology**, **197**: 616 - 623. 1993.

BOROVEC, SV. & ANDERSON, DA. Synthesis and assembly of hepatitis A virus-specific proteins in BS-C-1 cells. **J Virol**, **67(6)**:3095 - 3102. 1993.

BRADLEY, DW.; FIELDS, HA.; McCAUSTLAND, KA.; COOK, EH.; GRAVELLE, CR. & MAYNARD, JF. Biochemical and biophysical characterization of light and heavy density hepatitis A particles: evidence that that HAV is an RNA virus. **J Med Virol**, **2**:175 - 187. 1978.

BROWN, EA.; JANSEN, RW. & LEMON, SM. Characterization of a simian hepatitis A virus (HAV): antigenic and genetic comparison with human. **J. Virol** **63(11)**:4932 - 4937. 1989.

CAMARGO, IF.; GASPAR, AMC. & YOSHIDA, CFT. Comparative ELISA reagents for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **82**. 181 - 187. 1987.

CASTILLO de FEBRES, O.; CHACON de PETROLA, M.; CASANOVA de ESCALONA, L.; NAVEDA, O.; NAVEDA, M.; ESTOPINAN, M.; BORDONES, G.; ZAMBRANO, B.; GARCIA, A. & DUMAS, R. Safety immunogenicity and antibody persistence of an inactivated hepatitis A vaccine in 4 of 15 year old children. **Vaccine**, **18 (7-8)**:656 - 64. 1999.

CHEN, H.; LU, JH.; LIANG, WQ.; HUANG, YH.; ZHANG, WJ. & ZHANG, da B. Purification of the recombinant hepatitis B virus core antigen (rHBcAg) produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and comparative observation of its particles by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM). **Micron**, **35 (5)**:311 - 8. 2004.

CIOCCA, M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. **Vaccine**, **18 Suppl 1**:S71 - 4. 2000.

COULEPIS, AG.; TANNOCK, GA.; LOCARNINI, SA. & GUST, ID. The polypeptides of hepatitis A virus. **Intervirology**, **18**:107 - 127. 1981.

CUTHBERT, JA. Hepatitis A: Old and new. **Clin Microbiol Rev**, **14 (1)**:38 - 58. 2001.

DATTA, D. Association between deaths due to hepatitis A in intravenous drug users to hepatitis A and chronic liver disease: United States, 1981 – 1987. **Antiviral Ther**, **5 (Suppl 1)**:79. 2000.

DAWSON, GJ.; CHAU, KH.; CABAL, CM.; YARBOUGH, PO.; REYES, GR. & MUSHAHWAR, IK. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. **J Virol Meth**, **38 (1)**: 175 - 86. 1992.

De PAULA, VS.; BAPTISTA, ML.; LAMPE, E.; NIEL, C. & GASPAR, AM. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Virol**, **66**:22 - 7. 2002.

DIVIZIA, M.; RUSCIO, V.; DEGENER, AM & PANA, A. Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. **New Microbiol**, **21**: 161 – 167.

DOTZAUER, A.; GEBHARDT, U.; BIEBACK, K.; GOTTKER, U.; KRACKE, A.; MAGES, J.; LEMON SM. & VALLBRACHT, A. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. **J Virol**, **74 (23)**:10950 - 10957. 2000.

DVEMEYER, W.; WIELAARD, F. & van der VEEN, J. A new principle for detection of specific IgM antibodies applied in an ELISA for hepatitis A. **J Med Virol**, **4**: 25 - 32. 1979.

EMERSON, SU.; HUANG, YK. & PURCELL, RH. 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. **Virology**, **194 (2)**:475 - 80. 1993.

ENGVALL, E. & PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, **8 (9)**:871 - 874. 1971.

FEINSTONE, SM.; KAPIKIAN, AZ. & PURCELL, RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. **Scienc**, **182**:1026 - 1028. 1973.

FERREIRA, CT.; TANIGUCHI, ANR.; VIEIRA, SMG.; LIMA, JP. & SILVEIRA, TR. Prevalence of hepatitis A antibody in children and adolescents with chronic liver disease. **J Pediat**, **78 (6)**:505 - 508. 2002.

FLEMING, B. Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A in FRhK-4/R cells. **Med Microbiol Immuno** **170**:73 - 81. 1981.

GASPAR, AM.; VITRAL, CL.; YOSHIDA, CF. & SCHATZMAYR, HG. Primary isolation of a Brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4). **Braz J Med Biol Res**, **25 (7)**:697 - 705. 1992.

GORDON, SC.; REDDY, KR.; SCHIFF, L. & SCHIFF, ER. Prolonged intrahepatic cholestasis secondary to acute hepatitis A. **Ann Int Med**, **101**:635 - 637. 1984.

GRINDE, B.; STENE-JOHANSEN, K.; SHARMA, B.; HOEL, T.; JENSENIUS, M. & SKAUG, K. Characterization of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers – infection by needle sharing? **J Med Virol**, **53**:69 - 75. 1997.

HADLER, SC. Global impact of hepatitis A virus infection changing patterns. In: Hollinger BN, Lemon SM, Margolis HS, eds. **Viral hepatitis and Liver Disease**. Baltimore: Williams & Wilkins p.14 - 20. 1991.

HANSEN, A.; REITER, K.; DORNER, T. & PRUSS, A. Cryopreserved Human B Cells as an Alternative Source for Single Cell mRNA Analysis. **Cell Tissue Bank**, **6 (4)**:299 - 308. 2005.

HAVENS, WP. & JR. Infections hepatitis in the Middle East: a clinical review of 200 cases seen in a military hospital. **JAMA** **126**: 17 – 23.

HIGGINS, ML. & SHOCKMAN, GD. Procaryotic cell division with respect to wall and membranes. **CRC Crit Rev Microbiol**, **1 (1)**:29 - 72. 1971.

HOLLINGER, FB. & EMERSON, SU. Hepatitis A virus. In: Knipe, DM; Howley, PM. **Fields Virology**. 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 799 - 840. 2001.

HOLLINGER, FB. & TICEHURST, J. Hepatitis A virus,. In: Knipe, DM; Howley, PM. **Fields Virology**, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 735 - 782. 1996.

HOLLINGER, FB.; BRADLEY, DW.; MAYNARD, JE.; DREESMAN, GR. & MELNICK, JL. Detection of hepatitis A viral antigen by radioimmunoassay. **J Immunol**, **115**:1464 - 1466. 1975.

HOLMES, AW.; DEINHARDT, F.; WOLFE, L.; FROSNER, G.; PETERSON, D. & CASTRO, B. Specific neutralization of human hepatitis type A in marmoset monkeys. **Nature** (London), **243**:419 - 420. 1973.

HOLMES, AW.; WOLFE, L.; DEINHARDT, F. & CONRAD, ME. Transmission of human hepatitis to marmosets futher coded studies. **J Infect Dis**, **124**:520 - 521. 1971.

HOLMES, AW.; WOLFE, L.; ROSENBLATE, H. & DEINHARDT, F. Hepatitis in marmoset: induction of disease with coded specimens from a humam volunteer study. **Science**, **165**: 816 - 817. 1969.

HORA, MS.; RANA, PK. & SMITH, FW. Lyophilized formulations of recombinant tumor necrosis factor. **Pharm Res, New York, 9 (1):** 33 - 36. 1992.

HUGHES, JV.; STANTON, LW.; TOMASSINI, JE.; LONG, WJ. & SCOLNICK, EM. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis A virus: partial localization of a neutralizing antigenic site. **J Virol, 52 (2):**465 - 473. 1984.

INOUE, K.; YOSHIBA, M.; YOTSUYANAGI, H.; OTSUKA, T.; SEKIYAMAK. & FUJITA R. Chronic hepatitis A with persistent viral replication. **J Med Virol, 50:**322 - 324. 1996.

ISHAK, KG. Light microscopic morphology of viral hepatitis. **Am J Clin Pathol, 65 (5 Suppl):**787 - 827. 1976.

JIRANEK L. Comparison of the protective effect of a number of substances in the preservation of mammalian tissue cultures by freezing. **Folia Biol (Praha).12 (4):**291 - 8. 1966.

JOHNSTON, JM.; HARMON, SA.; BINN, LN.; RICHARDS, OC.; EHRENFELD, E. & SUMMERS, DF. Antigenic and immunogenic properties of a hepatitis A virus capsid protein expressed in *Escherichia coli*. **J Infect Dis 157:**1203 - 1211. 1988.

JONES RC. The use of dimethyl sulphoxide, glycerol, and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoa. II. The influence of diluent composition and processing time during freezing to minus 79 degrees C with dimethyl sulphoxide or glycerol or both compounds. **Aust J Biol Sci.18 (4):**887 - 900. 1965.

JOSHI, MS.; CHITAMBAR, SD.; ARANKALLE, VA. & CHADHA, MS. Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis A. **Clin Diagn Lab Immunol, 9 (4):**840 - 5. 2002.

KAO, HW.; ASCHCAVAI M. & REDEKER AG. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. **Hepatology**, **4**:933 - 936. 1984.

KEEFFE, EB.; IWARSON, S.; McMAHON, BJ.; LINDSAY, KL.; KOFF, RS.; MANNS, M.; BAUMGARTEN, R.; WIESE, M.; FOURNEAU, M.; SAFARY, A.; CLEMENS, R. & KRAUSE, DS. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in patients with chronic liver disease. **Hepatology**, **27**:881 - 886. 1998.

KOFF, RS. Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. **Vaccine**, **10 (Suppl 1)**:15 - 17. 1992.

KRUGMAN, S.; WARD, R. & GIBES, GP. The natural history of infectious hepatitis. **Am J Med**, **32**: 717 - 728. 1962.

KWON, OS.; BYUN, KS.; YEON, JE.; PARK, SH.; KIM, JS.; KIM, JH.; BAK, YT.; KIM, JH.; LEE, CH. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. **J Gastroenterol Hepatol**, **15(9)**:1043 - 7. 2000.

La BRECQUE, FD.; La BRECQUE, DR.; KLINZMAN, D.; PERLMAN, S.; CEDERNA, JB.; WINOKUR, PL.; HAN, JQ. & STAPLETON, JT. Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. **J Clin Microbiol**, **36 (7)**:2014 - 8. 1998.

LAY, LR.; DIAZ, OL.; CASANUEVA, RM. & MORENO, AG. Anti-Hepatitis A vírus immunoglobulin M antibodies in urine samples for rapid diagnosis of outbreaks. **Clin Diagn Lab Immunol**, **10 (3)**:492 - 494. 2003.

LEMON, SM.; JANSEN, RW.; BROWN, EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. **Vaccine** **10 (Suppl. 1)**:S40 - S44. 1992.

LEMON, SM.; BINN, LN. & MACHWICKI, RH. Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. **J Clin Microbiol**, **17**:834 – 839. 1983.

LOCARNINI, SA.; COULEPIS, AG.; WESTAWAY, EG. & GUST, ID. Restricted replication of human hepatitis A virus in cell culture: intracellular biochemical studies. **J Virol**, **37**:216 - 225. 1981.

LOCARNINI, SA.; COULEPIS, AG.; STRATTON, AM.;; KALDOR, J. & GUST, ID. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A-specific immunoglobulin M. **J Clin Microbiol**, **9**:459 - 65. 1979.

LORENZ, D.; BARKER, L.; STEVENS, M. & KIRSCHSTEIN, R. Hepatitis in the marmoset *Saguinus mystax* . **Proc Soc Exp Biol Med**, **135**:348 - 354. 1970.

MALONEY, BJ.; TAKEDA, N.; SUZAKI, Y.; AMI, Y.; LI, TC.; MIYAMURA, T.; ARNTZEN, CJ. & MASON, HS. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. **Vaccine**, **23 (15)**:1870 - 4. 2005.

MANUCCI, PM.; GDOVIN, S.; GRINGERI, A.; COLOMBO, M.; MELE, A.; SCHINAIA, N.; CIAVARELLA, N.; EMERSON, SU. & PURCELL, RH. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. The Italian Collaborative Group. **Ann Int Med**, **120**:1 - 7. 1994.

MARMOT, OH. & ZIOTA, BR. IgM class rheumatoid factor interference in solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies. **J Clin Pathol**, **31**:483 - 487. 1978.

MARTINS, TB.; JASKOWSKI, TD.; LARS MOURITSEN, C. & HILL, HR. An evaluation of the effectiveness of three immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing. **Clin Diagn Lab Immunol**, **2 (1)**:98 - 103. 1995.

MAYNARD, JE.; BRADLEY, DW.; GRAVELLE, CR.; EBERT, JW. & KRUSHAK, DH. Preliminary studies of hepatitis A in chimpanzees. **J Infect Dis**, **131**:194 - 197. 1975.

MEYERS, JD.; HUFF, JC.; HOLMES, KK.; THOMAS, ED. & BRYAN, JA. Parenterally transmitted hepatitis A associated with platelet transfusions: epidemiologic study of an outbreak in a marrow transplantation center. **Ann Int Med**, **81**:145 - 151. 1974.

MINOR, P. Classification and nomenclature of Viruses. In Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses, eds. Franki, RIB; Fauquet, CM.; Knudson, DI.; Brown, F. **Arch Virol**, **2** (Suppl):320 - 326. 1991.

MIYAKAWA, H.; KAWAGUCHI, N.; KIKUCHI, K.; KITAZAWA, E.; KAWASHIMA, Y.; YAJIMA, R.; ITOH, Y. False positive reaction in ELISA for IgM class anti-M2 antibody and its prevention. **Hepatol Res**, **20(3)**:279 - 287. 2001.

NAKANE, PK. & KAWOI, A. Peroxidase labeled antibody, a new method of conjugation. **J Histochem Citochem**, **22**. 1084 - 1091. 1974.

NING, D.; JUNJIAN, X.; QING, Z.; SHENG, X.; WENYIN, C.; GUIRONG, R. & XUNZHANG, W. Production of recombinant humanized anti-HBsAg Fab fragment from *Pichia pastoris* by fermentation. **J Biochem Mol Biol**, **38 (3)**:294 - 9. 2005.

NIU, MT.; POLISH, LB.; ROBERTSON, BH.; KHANNA, BK.; WOODRUFF, BA.; SHAPIRO, CN.; MILLER, MA.; SMITH, JD.; GEDROSE, JK.; ALTER MJ.; MARGOLIS, HS & NATIONAL HEPATITIS A INVESTIGATION TEAM. Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. **J. Infect. Dis**, **166**: 518 - 524. 1992.

NOBLE, RC.; KANE, MA.; REEVES, AS. & ROECKEL, I. Posttransfusion hepatitis A in a neonatal intensive care unit. **JAMA**, **252**: 2711 - 2715. 1984.



OBA, IT.; SPINA, AM.; SARACENI, CP.; LEMOS, MF.; SENHORAS, R.; MOREIRA, RC. & GRANATO, CF. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, **42**:197 - 200. 2000.

OSTERMAYR, R.; VON DER HELM, K.; GAUSS-MULLER, V.; WINNACKER, EL. & DEINHARTDT, F. Expression of hepatitis A virus cDNA in *Escherichia coli*: antigenic VP1 recombinant protein. **J Virol**, **61**:3645 - 3647. 1987.

PALMENBERG, AC. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. **Annu Rev Microbiol**, **44**:603 - 23. 1990.

PEREIRA, FEL. & GONÇALVES, CS. Hepatitis A. **Rev Soc Bras Med Trop**, **(36)3**:387 - 400. 2003.

PINTO, MA.; MARCHEVSKY, RS.; BAPTISTA, ML.; DE LIMA, MA.; PELAJO-MACHADO, M.; VITRAL, CL.; KUBELKA, CF.; PISSURNO, JW.; FRANÇA, MS.; SCHATZMAYR, HG. 7 GASPAR, AM. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. **Exp Toxicol Pathol**, **53 (6)**:413 - 20. 2002

POLISH, LB.; ROBERTSON, BH.; KHANA, B.; KRAWCZYNSKI, K.; SPELBRING, J.; OLSON, F. & SHAPIRO, CN. Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. **J Clin Microbiol**, **37**: 3615 - 3617. 1999.

PROBST, C.; JECHT, M. & GAUSS-MULLER, V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles: role of structural proteins VP4 and 2A. **J Biol Chem**, **274**:4527 - 4531. 1999.

PROVOST, P.J.; HUGHES, J.V.; MILLER, W.J.; GIESA, P.A.; BANKER, F.S.; EMINI, E.A. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. **J Med Virol**, **19**:23 - 31. 1986.

PROVOST, P.J. & HILLEMANN, M.R. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture *in vitro*. **Proc Soc Exp Biol Med**, **160**:213 - 221. 1979.

PROVOST, P.J.; ITTENSOHN, O.L.; VILLAREJOS, V.M. & HILLEMANN, M.R. A specific complement-fixation test for human hepatitis A virus in cell culture *in vitro*. **Proc Soc Exp Biol Med**, **160**:213 - 221. 1975.

PURCELL, R.H. & EMERSON, S.U. Animal models of hepatitis A and E. **Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) Journal**, **42**:161 - 177. 2001.

PURCELL R.H. Hepatitis viruses: Changing Patterns of Human Disease. **Proc Natl Acad Sci**, **91**:2401 - 2406. 1994.

PURCELL, R.H.; WONG, D.C.; MORITSUGU, Y.; DIENSTAG, J.A. & BOGGS, J.D. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. **Immunology**, **116**:349 - 356. 1976.

QUINTANA, A.; SANCHEZ, L.; LARRALDE, O. & ANDERSON, D. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in residents of a district in Havana, Cuba. **J Med Virol**, **76**:69 - 70. 2005.

RAMONET, M.; da SILVEIRA, T.R.; LISKER-MELMAN, M. RUTTIMAN, R.; PERNAMBUCO, E.; CERVANTES, Y.; CANERTO-VELASCO M.C.; FALLEIROS-CARVALHO, L.E.; AZEVEDO, T.; TARGA-FERREIRA, C. & CLEMENS, A.S. A two-dose combined vaccine against hepatitis A and B in healthy children and adolescents compared to the corresponding monovalent vaccines. **Arch Med Res**, **33**: 67 - 73. 2002.

ROBERTSON, BH.; JIA, XY.; TIAN, H.; MARGOLIS, HS.; SUMMERS, DF. & EHRENFELD, E. Serological approaches to distinguish immune response to hepatitis A vaccine and natural infection. **Vaccine 10 (Suppl. 1)**:S106 - S109. 1992.

ROSEN, E.; STAPLETON, JT. & McLINDEN, J. Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. **Vaccine 11**:706 - 712. 1993.

RUECKERT, RR. & WIMMER, E. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. **J Virol, 50**:957 - 959. 1984.

SÁNCHEZ, G.; BOSCH, A.; GOMEZ-MARIANO, G.; DOMINGO, E. & PINTO, RM. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. **Virology, 315**:34 - 42. 2003b

SÁNCHEZ, G.; CABALLERO, S.; GUIX, S.; BOSCH, A. & PINTÓ, RM. Antigenic hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol, 69**:1840 - 1843. 2003a.

SANTOS, DC.; SOUTO, FJ.; SANTOS, DR.; VITRAL, CL. & GASPAR, AM. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North Area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, 97**:637 - 40. 2002.

SHAPIRO, CN. & MARGOLIS, HS. Worldwide epidemiology of hepatitis A virus infection. **J Hepatol, 18** Suppl 2:S11 - 4. 1993

SIEGL, G. Replication of hepatitis A virus and processing of proteins. **Vaccine, 10 (Suppl I)**:S32 - S35. 1992.

SIEGL, G. Virology of hepatitis A. In : Zucerman, AJ, ed. **Viral Hepatitis and Liver Diseases**. New York: Alan R Liss, 3 - 7. 1988.

SIEGL, G. & FROSNER, GG. Characterization and classification of virus articles associated with hepatitis A. I. Size, density, and sedimentation. **J Virol**, **26**:40 - 47. 1978.

SOBSEY, MD.; SHIELDS, PA.; HAUCHMAN, FS.; DAVIS, AL.; RULLMAN, VA. & BOSCH, A. Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: Zucherman, AJ, ed. **Viral Hepatitis Liver Disease**. New York, 121 - 124. 1988.

SUMMERS, PL.; DUBOIS, DR.; COHEN, WH.; MACARTHY, PO.; BINN, LN.; SJOGREN, MH.; SNITBHAN, R.; INNIS, BL. & ECKELS, KH. Solid-phase antibody capture hemadsorption assay for detection of hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies. **J Clin Microbiol**, **31**:1299 - 302. 1993.

TETERINA, NL.; BIENZ K.; EGGER, D.; GORBALENYA, AE. & EHRENFELD, E. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. **Virology**, **237**:66 - 77. 1997.

TICEHURST, JR.; COHEN, JI.; FEINSTONE, SM.; PURCELL, RH.; JANSEN, RW. & LEMON, SM. Replication of hepatitis A virus: new ideas from studies with cloned cDNA. In: Semler, BL., Ehrwnfeld, E., eds. **Molecular aspects of picornavirus and detection**. Washington, DC. American Society for Microbiology, 27 - 50. 1989.

TICEHURST, JR.; RACANIELLE, VR.; BAROUNDY, BM.; BALTIMORE, D.; PURCELL, RH. & FEINSTONE, SM. Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. **Proc Natl Acad Sci**, **80**:5885 - 5889. 1983.

TRINTA, KS. Estudo soropedemiológico das hepatites virais de transmissão entérica A e E no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia] Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1998.

VAN DAMME, P.; THOELLEN, S.; CRAMM, M.; De GROOTE, K.; SAFARY, A. & MEHEUS, A. Inactivated hepatitis A vaccine: reactogenicity, immunogenicity and long-term antibody persistence. **J. Med. Virol**, **44**:446 - 451. 1994.

VENTO, S.; GAROFANO, T.; RENZINI, C.; CAINELLI, F.; CASALI, F.; GHIRONZI, G.; FERRARO, T. & CONCIA, E. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. **N. Engl. J Med**, **338**:286 - 290. 1998.

VILLAR, LM.; AMADO, LA. & GASPAR, AMC. *In situ* enzyme immunoassay for titration of a Brazilian hepatitis A virus strain (HAF-203). **Braz J Med Biol Res**, **37** (7):1032 - 1027. 2004.

VILLAR, LM.; De PAULA, VS.; GASPAR, AM. Seasonal variation of hepatitis A virus infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, **44**(5):289 - 92. 2002.

VITRAL, CL.; YOSHIDA, CFT.; MARCHEVSK, RS.; PINTO, MA.; TEIXEIRA, CS.; BAPTISTA, ML. & GASPAR, AMC. Studies on transmission of hepatitis A virus to squirrel monkeys. **Primates**, **41**:127 - 135. 2000.

VITRAL, CL.; YOSHIDA, CFT.; TEIXEIRA, CS. & GASPAR, AMC. Seroprevalence of hepatitis A in health care students from a public university of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Microbiol**, **29**:149 - 151. 1998b

VITRAL, CL.; YOSHIDA, CF.; LEMOS, ER.; TEIXEIRA, CS. & GASPAR, AM. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **93**:1 - 5. 1998<sup>a</sup>

VITRAL, CL.; MARCHEVSKY, RS.; YOSHIDA, CFT.; COELHO, JMCO, GASPAR, AMC. & SCHATZMAYR, HG. Intergastric infection induced in marmosets ( *Callithrix*

*jacchus*) by a brazilian hepatitis A virus (HAF-203). **Brazilian J Med Biol Res**, **28**:313 - 321. 1995.

WATSON, JC.; FLEMING, DW.; BORELLA, AJ.; OLCOTT, ES.; CONRAD, RE. & BARON, RC. Vertical transmission of hepatitis A resulting in an outbreak in a neonatal intensive care unit. **J Infect Dis**, **167**:567 - 571. 1993.

WEITZ, M.; BAROUDY, BM.; MALOY, WL.; TICEHURST, JR. & PURCELL, RH. Detection of a genome – Linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. **J Virol**, **60**:124 - 130. 1986.

YAO, G. Clinical spectrum and natural history of viral hepatitis A in a 1988 Shangai epidemic. In: Hollinger, FB., Lemon, SM., Margolis, HS., eds. **Viral Hepatitis and Liver Disease**. Baltimore, Williams & Wilkins. 76 - 78.1991.

YOKOSUKA, O. Does genotype of hepatitis A virus relate to clinical characteristics of hepatitis A? **Hepatology Research**, **32 (1)**:14 - 15. 2005

ZIKOS, D.; GREWAL, KS.; CRAIG, K.; CHENG, JC.; PETERSON, DR. & FISHER, KA. Nephrotic syndrome and acute renal failure associated with hepatitis A virus infection. **Am J Gastroenterol**, **90**:296 - 298. 1995.

ZUCKERMAN, AJ. The clinical and laboratory features of acute hepatitis in the Royal Air Force. **Mon Bull Minist Health Public**, **24**:340 - 346. 1965.

## 10 – ANEXOS

### Dosagem protéica pelo método de Folin-Lowry.

Este teste de dosagem de proteínas foi utilizado para quantificar a concentração protéica do antígeno HAV produzido em cultivo celular e da proteína recombinante utilizados no ELISA.

#### Preparo da curva padrão.

Solução mãe de BSA – 0,5mg/ mL

100 µg / 0,2 mL \_\_\_\_\_ apenas solução mãe

80 µg / 0,2 mL \_\_\_\_\_ 0,8 mL da solução mãe qsp 1 mL de água milliQ

60 µg / 0,2 mL \_\_\_\_\_ 0,6 mL da solução mãe qsp 1 mL de água milliQ

40 µg / 0,2 mL \_\_\_\_\_ 0,4 mL da solução mãe qsp 1 mL de água milliQ

20 µg / 0,2 mL \_\_\_\_\_ 0,2 mL da solução mãe qsp 1 mL de água milliQ

10 µg / 0,2 mL \_\_\_\_\_ 0,1 mL da solução mãe qsp 1 mL de água milliQ

Em outra bateria de tubos transferir 0,2 mL de cada tubo da curva padrão obedecendo a concentração.

#### Preparo das amostras.

Diluir as amostras 1:10, 1:100 e 1:1000 em água milliQ

Branco = 0,2 mL de água milliQ

#### Execução do ensaio.

Acrescentar 1 mL da solução I (anexo) em cada um dos tubos, inclusive no branco, aguardar 10 minutos. Em seguida acrescentar 100 µL do reagente D (anexo) em cada tubo e aguardar 30 minutos.

Ler em espectrofotômetro utilizando filtro de 750nm.

### **Cálculos da concentração protéica por orifício da microplaca.**

#### **Proteína recombinante.**

A proteína recombinante foi cedida com a concentração protéica de 40 ng /  $\mu\text{L}$ . Sendo utilizada no ensaio imunoenzimático diluída a 1:3500.

Portanto:

$$40 \text{ ng} / \mu\text{L} = 0,04 \mu\text{g} / \mu\text{L} = 4 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L} = 4 \div 3500 = 0,0011 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}.$$

**Em cada orifício da microplaca foi adicionada 0,0011  $\mu\text{g}$  da proteína recombinante.**

#### **HAV de cultivo celular.**

A dosagem de proteínas pelo método Folin-Lowry indicou a concentração protéica do HAV de cultivo celular de aproximadamente 1250 ng /  $\mu\text{L}$ . Sendo utilizado no ensaio imunoenzimático sem diluição prévia.

Portanto:

$$1250 \text{ ng} / \mu\text{L} = 1,25 \mu\text{g} / \mu\text{L} = 125 \mu\text{g} / 100 \mu\text{L}.$$

**Em cada orifício da microplaca foi adicionado 125  $\mu\text{g}$  do HAV de cultivo celular.**

Anexo I – Soluções do método de quantificação proteica Folin-Lowry

#### **Solução-mãe de BSA (0,5 mg/ mL)**

4,5 mg BSA.....9 mL de água milliQ

#### **Reagente A – Solução a 2% de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em solução a 1% de Hidróxido de Sódio (NaOH).**

2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .....100 mL de NaOH a 1%



**Reagente B – Solução de Sulfato de Cobre (CuSO<sub>4</sub>) a 1%.**

1 g CuSO<sub>4</sub>.....100 mL de água milliQ

**Reagente C – Solução de Tartarato de Potássio e/ou Sódio a 1%.**

1 g Tartarato de Sódio e /ou Potássio.....100 mL de água milliQ

**Reagente D – Folin.**

1,0 mL Folin .....1,3 mL de água milliQ

**Solução I.**

10 mL Reagente A

+ 0,1 mL Reagente B

+ 0,1 mL Reagente C

Anexo II – Bula do ELISA comercial HEPANOSTIKA HAV IgM (EIE-BIOMÉRIEUX).

Anexo III – Bula do ELISA comercial BIOELISA HAV IgM (EIE-BIOKIT).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)