

Cristiane R. Barth^{1,2}, Fernanda Haar^{1,2}, Aline D. Weis^{1,2}, Eduardo L. Pedrazza², Tatiana S. F. Souza², Leonardo Pedrazza², Fernando T. Kreutz^{1,2,3}, Cíntia Fochesatto^{2,3}, Ana L. Bender^{1,2}, Virgínia M. Schmitt^{1,2}

¹Faculdade de Farmácia, PUCRS, ²Laboratório de Imunodiagnóstico, PUCRS, ³FK-Biotecnologia

Introdução

O vírus da hepatite C é uma das principais causas de doença hepática crônica (1), sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (2). No Brasil, testes para detecção de anticorpos anti-HCV tornaram-se obrigatórios na triagem sorológica dos bancos de sangue a partir de novembro de 1993 (3).

Tendo em vista que os testes comercialmente disponíveis no Brasil são totalmente ou parcialmente importados, o objetivo deste estudo foi a padronização de um sistema de imunodiagnóstico enzimático para hepatite C, utilizando a técnica de ELISA indireto, para futuramente ser utilizado em laboratórios clínicos vinculados ao Sistema Único de Saúde e aplicação em bancos de sangue, visando à nacionalização dos sistemas em todas as etapas produtivas desse processo.

Metodologia

As etapas para padronização do teste realizadas incluíram curvas de: concentração dos antígenos utilizados na sensibilização, concentração da amostra, tempo de incubação da amostra, concentração do anticorpo secundário e tempo de incubação do anticorpo secundário. As amostras positivas e negativas utilizadas na padronização do teste foram provenientes do banco de amostras da empresa FK-Biotecnologia. As leituras foram realizadas na Leitora de Microplacas Expert Plus® (ASYS), utilizando o comprimento de onda de 450/620nm.

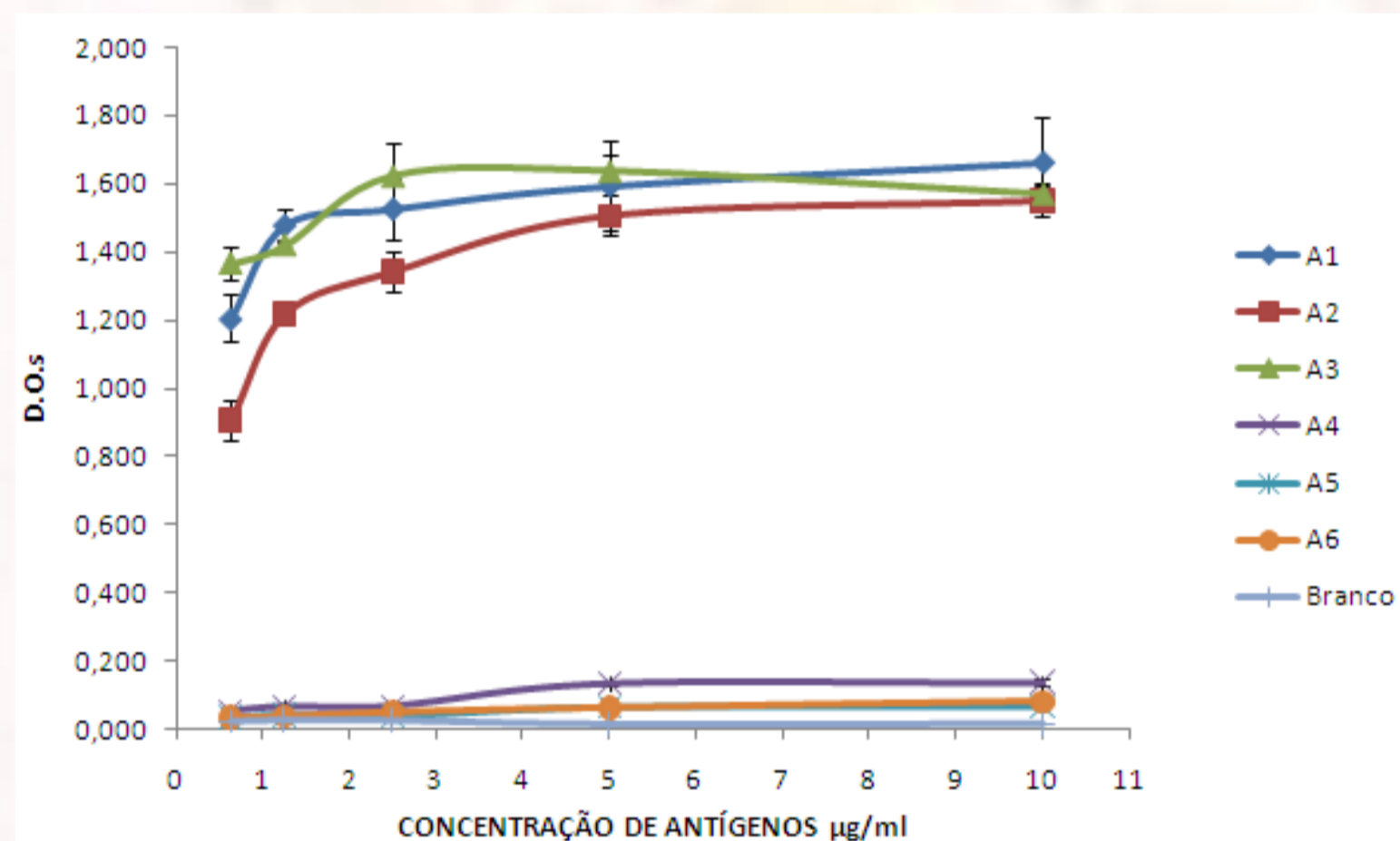


Figura 1: Determinação da concentração do mix de antígenos. As concentrações utilizadas foram: 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625 µg/mL. Amostras positivas (A1, A2, A3) e negativas (A4, A5, A6) na concentração de 1:20. Leitura: 450/620nm.

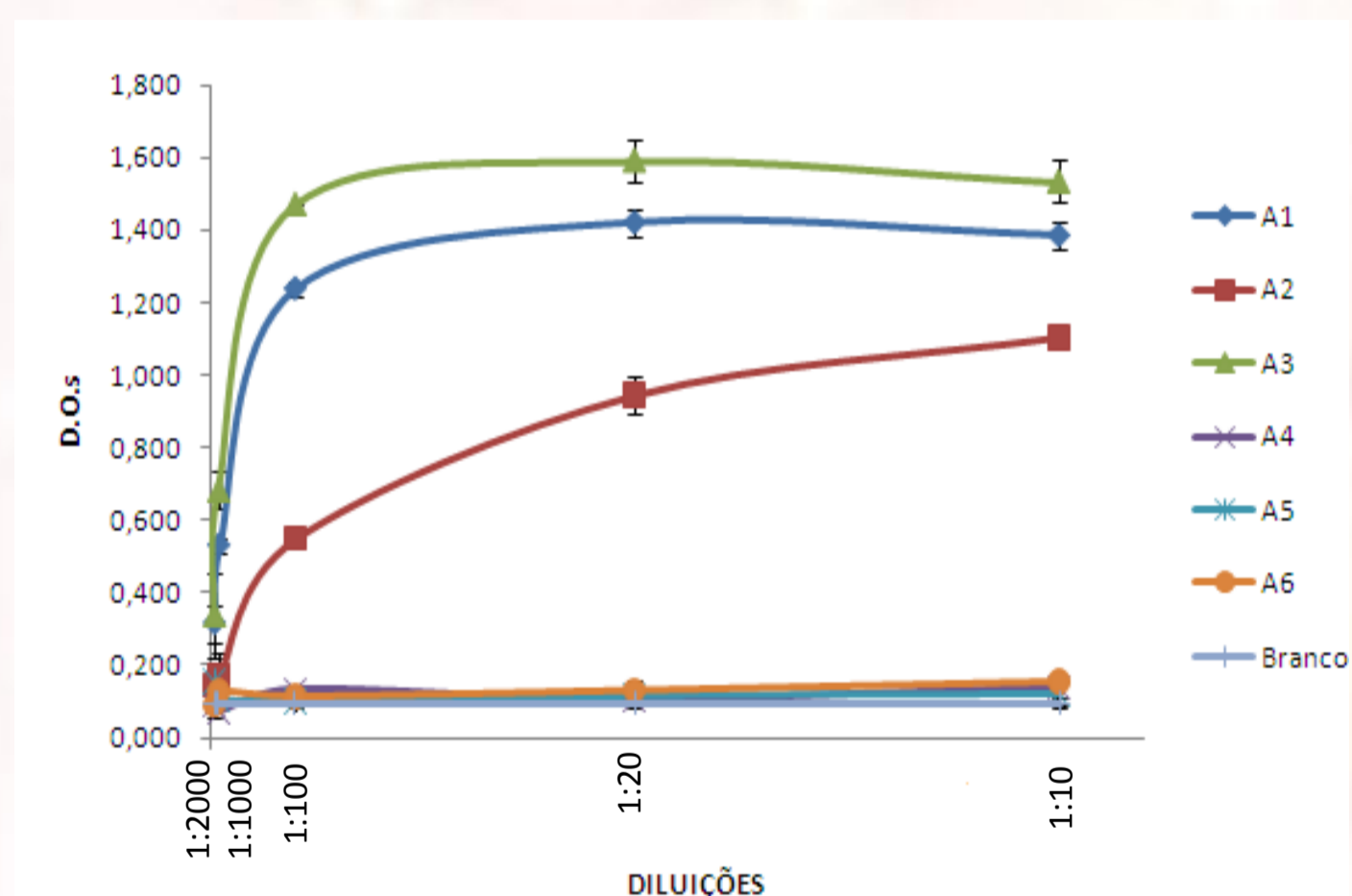


Figura 2: Determinação da concentração da amostra. Amostras positivas (A1, A2, A3) e negativas (A4, A5, A6) nas concentrações de: 1:10, 1:20, 1:100, 1:100 e 1:2000. Placa sensibilizada com mix de antígenos na concentração 2,5 µg/mL. Leitura: 450/620nm.

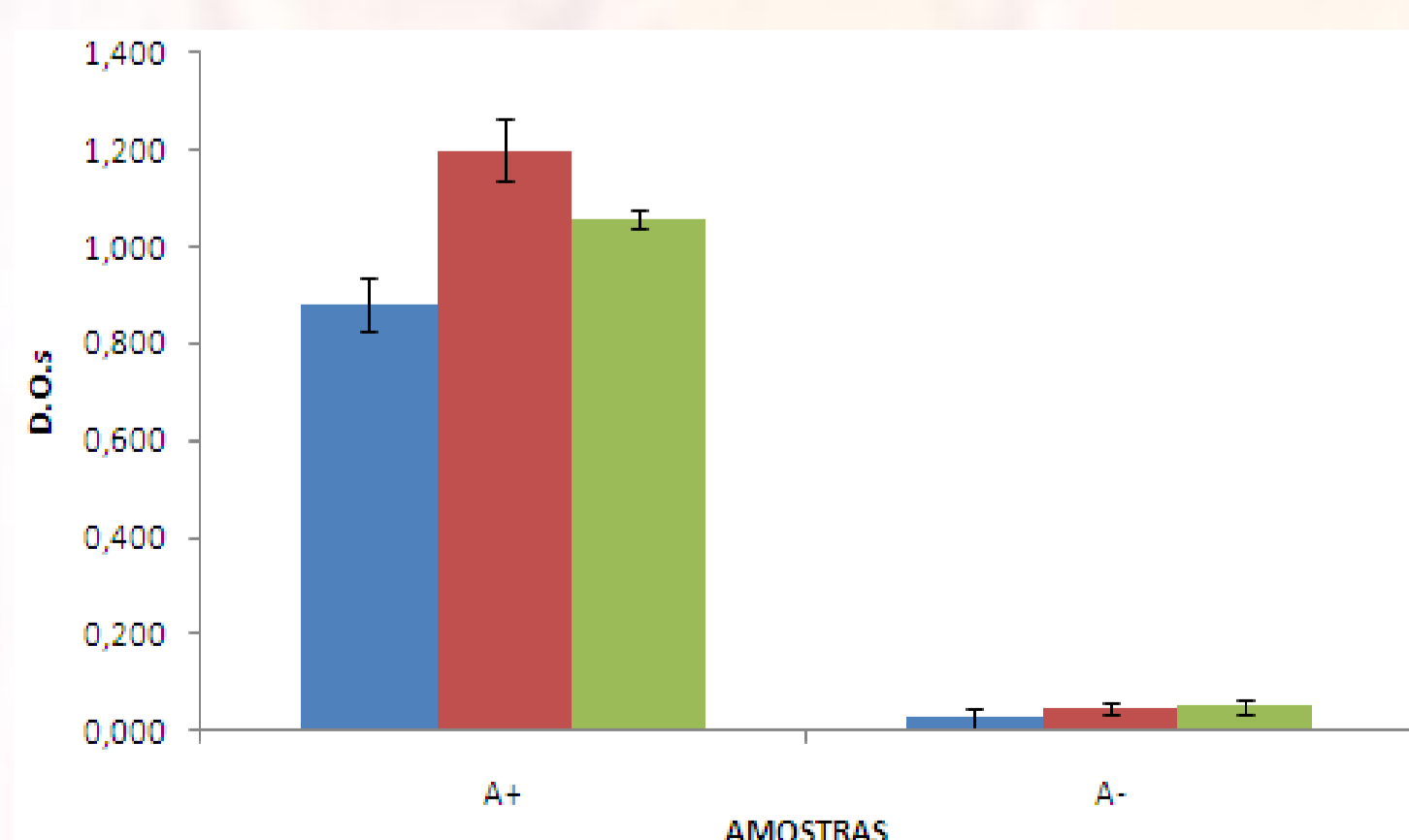


Figura 3: Determinação do tempo de incubação da amostra. Os tempos testados foram 30', 45' e 60'. Placa sensibilizada com mix de antígenos na concentração 2,5 µg/mL. Amostras positivas (A+) e negativas (A-) na concentração de 1:20. Leitura:450/620nm. (n=3)

Resultados

- Após análise dos resultados, foi estabelecido como 2,5µg/mL a melhor concentração de antígenos a ser utilizada (Figura 1).
- A diluição da amostra foi definida em 1:20 (Figura 2) principalmente para facilitar a pipetagem durante a rotina laboratorial. Com relação ao tempo de incubação da amostra, os tempos de 45 e 60 minutos mostraram-se efetivos, sendo assim, para otimização do tempo do ensaio foi definido 45 minutos como tempo padrão de incubação da amostra (Figura 3).
- A concentração do anticorpo secundário apresentou melhor resultado na diluição 1:1000 (Figura 4), com tempo de incubação de 30 minutos como sendo satisfatório (Figura 5).
- Este processo foi concluído com a execução de testes pilotos realizados no laboratório de imunodiagnóstico da PUCRS confirmando os resultados obtidos. (Figura 6).

Conclusão

Os resultados obtidos mostram o potencial competitivo do teste desenvolvido. As próximas etapas a serem realizadas são testes de estabilidade da placa, validação do kit, registro na Anvisa e produção dos Kits.

Referências

1. CANTALOUBE, J. F., GALLIAN, P., BOKILO A., JORDIER F., BIAGINI P., ATTOUI H., *et al.* Analysis of Hepatitis C Virus Strains Circulating in Republic of the Congo. **Journal of Medical Virology**. Vol. 82, (2010), pp. 562-567.
2. SHARMA, D. S., Hepatite C vírus: Molecular biology & current therapeutic options. **The Indian journal of medical research**. Vol. 131, Jan (2010), pp. 17-34.
3. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue. Brasília, 2004. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br>. Acesso em: 02 jun. 2010.

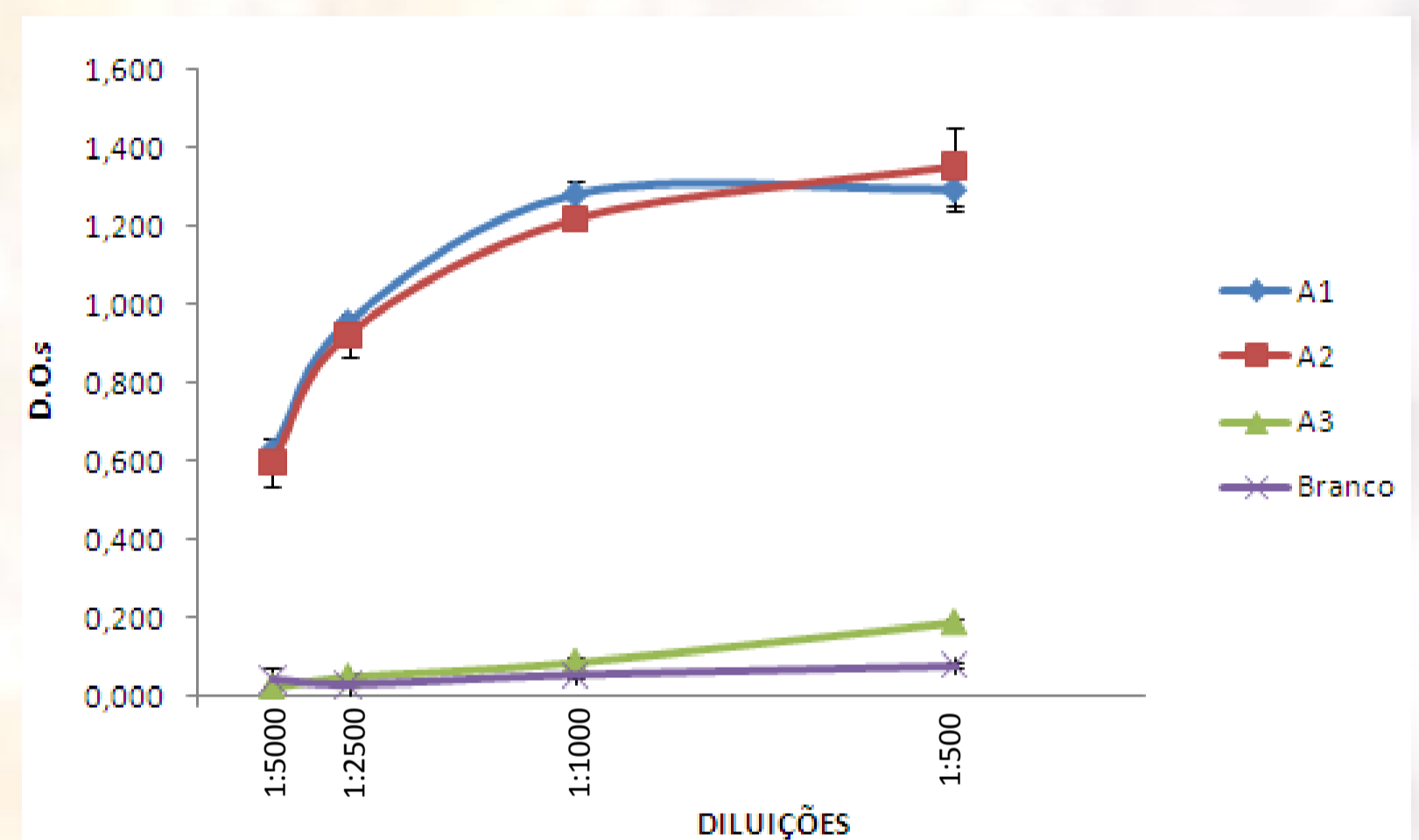


Figura 4: Determinação da concentração do anticorpo secundário. Amostras positivas (A1, A2) e negativa (A3) nas concentrações de: 1:20. Anticorpo secundário utilizado nas concentrações de: 1:500, 1:1000, 1:2500 e 1:5000. Placa sensibilizada com mix de antígenos na concentração 2,5 µg/mL. Leitura: 450/620nm.

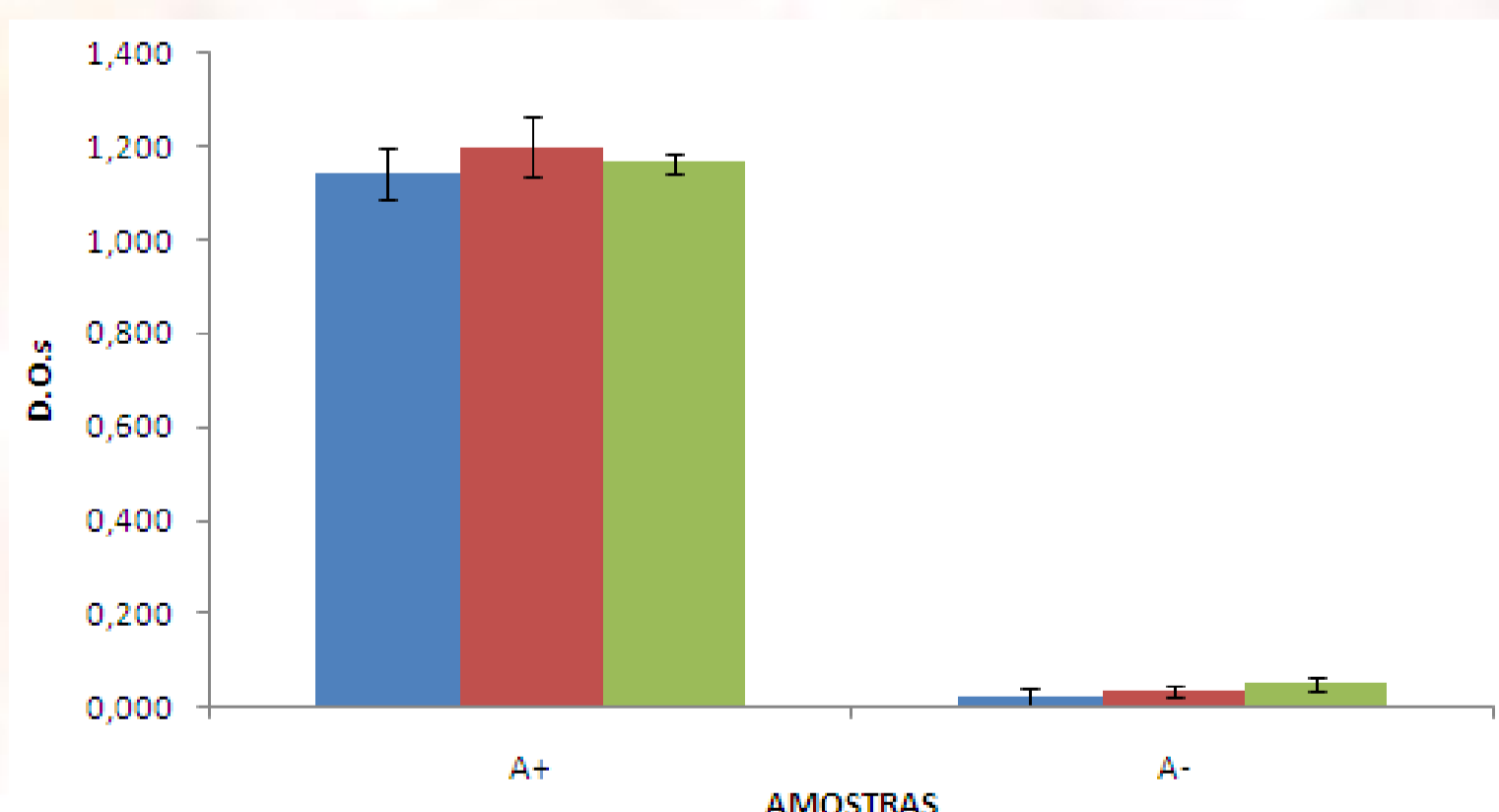


Figura 5: Determinação do tempo de incubação do anticorpo secundário. Os tempos testados foram 30', 45' e 60'. Placa sensibilizada com mix de antígenos na concentração 2,5 µg/mL. Amostras positivas (A+) e negativas (A-) na concentração de 1:20. Leitura:450/620nm. (n=3)

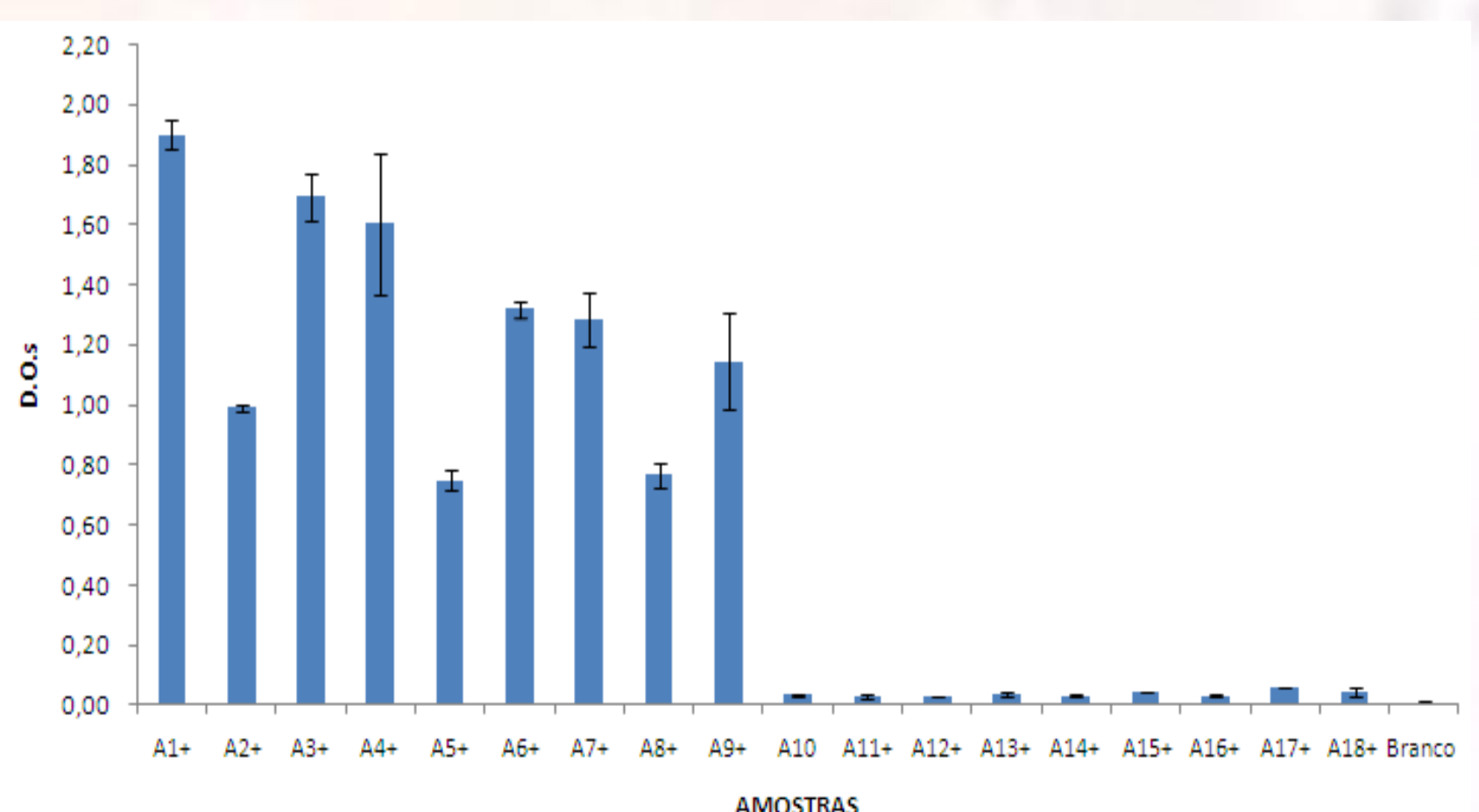


Figura 6: Ensaio Elisa - HCV padronizado. Placa sensibilizada com mix de antígenos na concentração 2,5 µg/mL. Amostras positivas e negativas na concentração de 1:20, com tempo de incubação de 45'. Anticorpo secundário na concentração de 1:1000 com tempo de incubação do de 30'. Leitura (450/620nm).