

Hepatites Virais

Triagem e diagnóstico sorológico
em unidades hemoterápicas
e laboratórios de saúde pública



Ministério da Saúde

Coordenação Nacional de DST e Aids
Coordenação de Sangue e Hemoderivados

MINISTÉRIO DA SAÚDE

José Serra

Ministro de Estado da Saúde

João Yunes

Secretário de Políticas de Saúde

Pedro Chequer

Coordenador Nacional de DST e Aids

Hélio Moraes de Souza

Coordenador Nacional de Sangue e Hemoderivados

Miriam Franchini e Hélio Moraes de Souza

Coordenadores do projeto TELELAB -Série Sangue

Autores:

Ana Maria Coimbra Gaspar

Clara T. Tachibana Yoshida

Dagmar Kiesslich

Edwin Antônio S. Castillo

Geni N. Noceti de Lima Câmara

Neiva Sellan Lopes Gonçalves

Luiz Alberto Peregrino Ferreira

Maristela Arantes Marteleto (pedagogia)

Hepatites Virais – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. – Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998.
68 p.: il. (Série TELELAB)

1. Hepatites Virais – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública I. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (Brasil) II. Série TELELAB

Apresentação

A Coordenação Nacional de DST e Aids e a Coordenação de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, em nome do compromisso com a melhoria do atendimento à população, unem seus esforços a fim de promover o aperfeiçoamento dos profissionais dos laboratórios de saúde pública e das unidades hemoterápicas.

Nessa perspectiva, os cursos do Sistema de Educação a Distância – TELELAB, organizados numa abordagem favorável ao repensar da prática profissional, oferecem aos profissionais da saúde uma oportunidade de adquirir conhecimentos embasados em critérios técnico-científicos de qualidade para assegurar o padrão de excelência desejável no atendimento aos usuários dos serviços de saúde.

Queremos deixar registrado nosso agradecimento a todos os que contribuíram na produção dos vídeos e dos manuais que compõem os cursos. Esses especialistas de áreas tão diversas aproveitaram as diferenças para realizar um trabalho harmônico e integrado, o que reforça a nossa idéia de que é em equipe e em parceria que se constrói um sistema único de saúde com qualidade.

Aos alunos do TELELAB nossas boas vindas e votos de sucesso!

Pedro Chequer

Coordenador Nacional de
DST e Aids

Hélio Moraes de Souza

Coordenador Nacional de
Sangue e Hemoderivados

Seja bem-vindo (a)!

Você agora faz parte do TELELAB, um Sistema de Educação a Distância do Ministério da Saúde. Estão à sua disposição os seguintes cursos:

Cursos – TELELAB	Pré-requisitos
01 -Técnicas para Coleta de Secreções	-
02 -Técnicas para Coleta de Sangue	-
03 -Técnica de Coloração de Gram	Curso 01
04 -Cultura, Isolamento e Identificação de " <i>Neisseria gonorrhoeae</i> "	Curso 01 e Curso 03
05 -Diagnóstico Laboratorial da <i>Chlamydia</i>	Curso 01
06 -Diagnóstico Sorológico da Sífilis	Curso 02
07 -Diagnóstico Sorológico do HIV: Testes de Triagem	Curso 02
08 -Diagnóstico Sorológico do HIV: Testes Confirmatórios	Curso 02 e Curso 07
09 -Coleta de Sangue de Doadores	-
10 -Preparação de Hemocomponentes	Curso 09
11 -Doença de Chagas – Triagem e Diagnóstico Sorológico em unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 02
12 -HTLV-I/II – Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 02
13 -Hepatites Virais – Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 02
14 -Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 06 ou 07 ou 11 ou 12 ou 13
15 -Equipamentos – Utilização e Monitoramento em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Um dos cursos anteriores
16 -Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Um dos cursos anteriores

Observações:

1. Você se inscreve em um curso por vez, escolhido de acordo com seu interesse e/ou necessidade do serviço, respeitando os pré-requisitos identificados.
2. O curso Controle de Qualidade de Testes Sorológicos é complemento essencial para **todos** os cursos de **diagnóstico sorológico**. Ele deve ser feito imediatamente após a conclusão do primeiro desses cursos (06 ou 07 ou 11 ou 12 ou 13).
3. Os cursos de Equipamentos (15) e de Biossegurança (16) – são complementos essenciais para **todos** os outros cursos e devem ser feitos após o primeiro curso concluído por você.



Como funciona

Os cursos do TELELAB estão programados de modo a não interferir na sua rotina de trabalho e você tem **1 mês** para concluir cada curso que fizer. Em cada um deles, você:

Pré-teste

Vídeo



Manual



Pós-teste



Certificado

faz um pré-teste e, depois, assiste a um vídeo quantas vezes quiser, no lugar combinado com a coordenação local do TELELAB;

estuda o manual correspondente, no tempo, horário e lugar de sua preferência;

faz um pós-teste para avaliação de sua aprendizagem;

depois de acertar no mínimo 80% do pós-teste, recebe, um certificado.

Para esclarecimentos de dúvidas e sempre que precisar, comunique-se diretamente com:

TELELAB - CN-DST/AIDS – MS

Fax gratuito: 0800-612436

Ao final do curso "Hepatites Virais - Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública", você será capaz de:

- ▼ identificar os procedimentos e as técnicas recomendados pelo Ministério da Saúde para a triagem sorológica de doadores de sangue e para o diagnóstico sorológico das hepatites virais;
- ▼ executar os testes para detecção dos marcadores sorológicos das hepatites virais A, B e C, obedecendo a critérios técnicos e de controle de qualidade.

GUARDE ESTE MANUAL. ELE É SEU. USE-O!



Sumário

INTRODUÇÃO	7
HEPATITES VIRAIS	7
introdução	9
principais vírus	10
formas de transmissão e distribuição geográfica	12
manifestações clínicas	13
vacinas	14
TRIAGEM SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE E DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS HEPATITES VIRAIS	15
vírus investigados na triagem de doadores de sangue e vírus investigados para o diagnóstico etiológico	17
pesquisa do HDV e do HEV	17
principais marcadores sorológicos do HAV, do HBV e do HCV	18
deteção dos marcadores do HAV no curso sorológico típico da hepatite A	19
deteção dos marcadores do HBV no curso sorológico típico da hepatite B	20
caracterização sorológica da evolução para a forma crônica da infecção pelo vírus da hepatite B	22
identificação do marcador do HCV no curso sorológico típico da hepatite C	23
marcadores sorológicos pesquisados na triagem de doadores de sangue	23
fluxograma de testagem na triagem de doadores de sangue	24
procedimentos com doadores com resultados reagentes ou indeterminados	26
marcadores sorológicos pesquisados para o diagnóstico etiológico	26
fluxograma para diagnóstico das hepatites virais agudas	26
fluxograma para diagnóstico da hepatite C	28
METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS HEPATITES VIRAIS	31
dosagem bioquímica	33
métodos de biologia molecular	33
testes sorológicos	34
hemaglutinação	34
radioimunoensaio	35
quimioluminescência	35
imunoenzimático	35
testes imunoenzimáticos – ELISA e Imunoblot	35
ELISA – fase sólida, antígeno, anticorpo, enzima, substrato e cromógeno	36
tipos e seqüências das reações dos ELISA utilizadas na deteção dos marcadores sorológicos das hepatites A, B e C	37
sanduíche para pesquisa de antígeno	38



ELISA indireto	39
ELISA de captura para IgM	40
ELISA competitivo	43
definição de resultado no ELISA	43
cálculo da zona cinza	44
componentes do Imunoblot	44
seqüência de Imunoblot	44
definição do resultado no Imunoblot	46
critério para utilização do Imunoblot na testagem das amostras	46

PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DAS HEPATITES VIRAIS

	47
tipos de amostras	49
registro de amostras, distribuição em alíquotas, acondicionamento e conservação de amostras em laboratórios de unidades hemoterápicas	49
registro de amostras, distribuição em alíquotas, acondicionamento e conservação de amostras em laboratórios de saúde pública	50
equipamentos e materiais para execução do ELISA e do Imunoblot	51
procedimentos gerais para execução do ELISA	53
procedimentos gerais para execução do Imunoblot	54
garantia de qualidade dos testes imunoenzimáticos	56

ANEXOS

	57
anexo 1: relação entre os resultados dos marcadores sorológicos da hepatite B, o estágio e a evolução da infecção	59
anexo 2: exemplo de planilha de resultados em serviço de hemoterapia	60
anexo 3: exemplo de planilha de resultados de sorologia de hepatites utilizada em laboratórios de saúde pública	61
anexo 4: exemplo de protocolo de ELISA em microplaca	62
anexo 5: exemplo de protocolo de Imunoblot	63
anexo 6: exemplo de planilha de resultados para teste complementar – Imunoblot	64

BIBLIOGRAFIA

65



Introdução

Hepatites Virais

INTRODUÇÃO - HEPATITES VIRAIS



Introdução

A hepatite é uma inflamação do fígado que pode estar relacionada a causas diversas, tais como: uso de alguns medicamentos, intoxicação por defensivos agrícolas, uso excessivo de bebidas alcoólicas e agentes infecciosos. Os vírus são os principais agentes infecciosos causadores das hepatites.

As hepatites virais apresentam distribuição mundial e ampla e estão entre as doenças infecciosas de maior importância em saúde pública.

Antes da descoberta dos vírus, a diferenciação dos tipos de hepatite só era possível pela observação do tempo de incubação da doença e forma provável de contágio. Assim, eram identificados apenas dois tipos de hepatite: de transmissão fecal-oral, por exemplo pela água ou alimentos contaminados, e a de transmissão sanguínea.

Na década de 60, Blumberg, pesquisando as proteínas do sangue, observou no soro de um australiano a presença de um antígeno que denominou de "antígeno Austrália", hoje reconhecido como o antígeno de superfície do vírus da hepatite B. Desde então, a rápida evolução dos conhecimentos possibilitou a detecção de diferentes vírus capazes de causar hepatites na espécie humana.

Nos anos 70, foram descritas as partículas do vírus da hepatite B, por Dane, do vírus da hepatite A, por Feinstone e da hepatite D, por Rizzetto. Na década de 80, Choo descobriu o vírus da hepatite C e Balayan o vírus da hepatite E.

A medida em que os vírus foram sendo descobertos, os testes para sua identificação puderam ser desenvolvidos, possibilitando o diagnóstico.

A utilização rotineira dos testes sorológicos em unidades hemoterápicas tem contribuído, de forma decisiva, para a redução do número de casos de hepatites B e C pós-transfusionais.



Quais os principais vírus que causam hepatites na espécie humana?

São os vírus das hepatites A, B, C, D e E. Esses vírus têm estrutura, forma e classificação diferentes, como você pode ver na **Figura 1**.

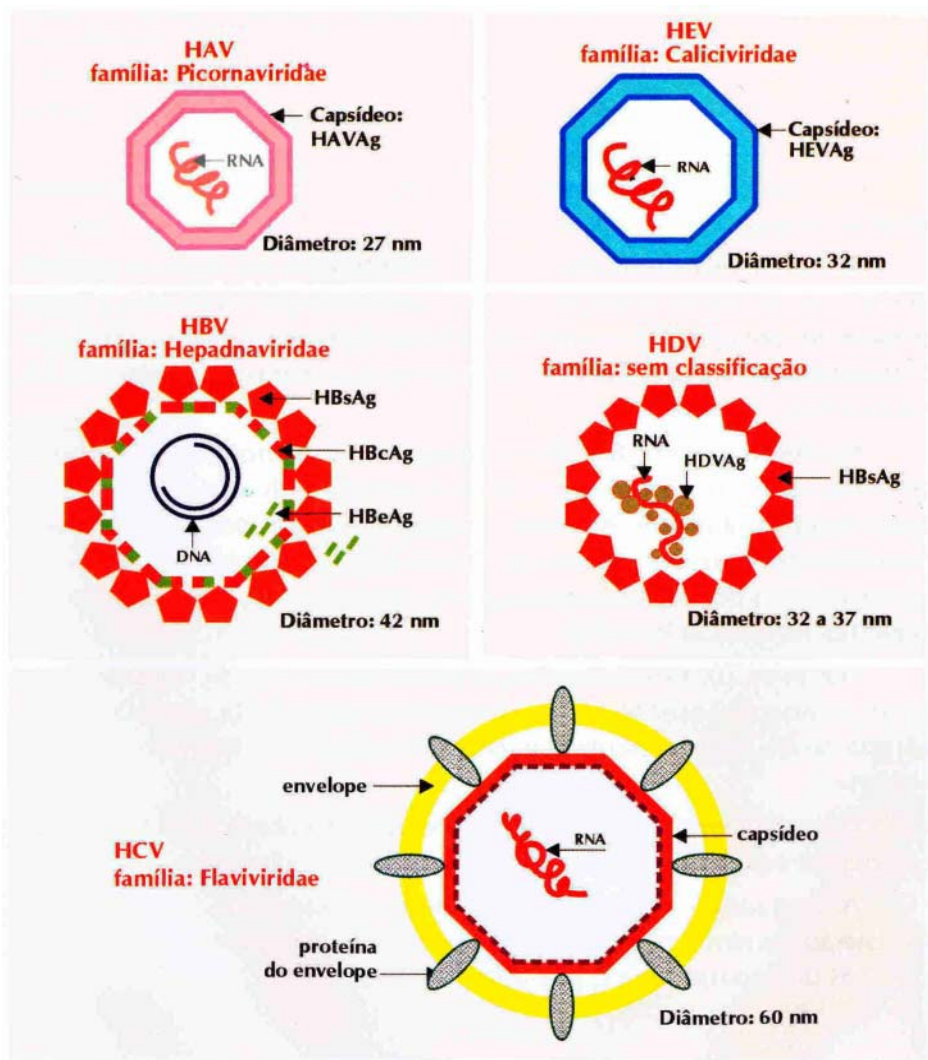


Figura 1 - Vírus das Hepatites A, B, C, D e E

Observe que as partículas virais são constituídas por uma molécula de **ácido nucleico**, envolvida por uma estrutura proteica chamada **capsídeo**.

Ácido nucleico viral é o material genético constituído pelo RNA (ácido ribonucleico) ou DNA (ácido desoxiribonucleico) onde estão contidas as informações para a produção de novos vírus.

O **HAV - Vírus da Hepatite A** - e o **HEV - Vírus da Hepatite E** - são vírus de RNA com capsídeos formados pelos antígenos **HAVAg** e **HEVAg**, respectivamente.

Antígeno - Ag - é qualquer substância que o organismo identifica como estranha e que induz a produção de proteínas específicas (anticorpos) pelo sistema imune.

Observe, também, que o **HBV - Vírus da Hepatite B** - é o único com DNA e, além disso, ele é revestido por duas camadas:

- ▼ uma externa constituída por **HBsAg** - antígeno de superfície do vírus da hepatite B;
- ▼ uma interna, ou *core*, constituída por **HBcAg** - antígeno **c** do vírus da hepatite B.

O **HBV** possui, ainda, uma outra proteína, **HBeAg** - antígeno **e** do vírus da hepatite B.

Veja que o ácido nucleico do **HDV - Vírus da Hepatite D** - também chamado vírus **Delta**, é constituído de RNA com um antígeno associado - o **HDVAg**. O envoltório do HDV é constituído pelo **HBsAg** que é o antígeno de superfície do vírus da hepatite B, do qual o Delta depende para penetrar na célula e se multiplicar. Por isso, a infecção pelo HDV está sempre associada à infecção pelo HBV.

Finalmente, você pode ver que o **HCV - Vírus da Hepatite C** - é um vírus RNA que possui capsídeo e um envoltório mais externo, o **envelope**, de constituição lipoproteica.

Além das diferenças de estrutura e classificação, os vírus apresentam formas de transmissão e distribuição geográfica distintas. Confira no próximo item.



Quais as formas de transmissão e como se distribuem geograficamente os vírus das hepatites?

De acordo com sua forma de transmissão os vírus podem ser divididos em dois grupos:

- ▼ vírus transmitidos por via fecal-oral – HAV e HEV;
- ▼ vírus transmitidos pelo sangue, contato sexual e fluidos corporais – HBV, HCV e HDV.

Os vírus das hepatites A, B e C são encontrados no mundo inteiro, com predominância maior ou menor, dependendo da região geográfica.

Para melhor compreensão, veja, a seguir, as fontes mais importantes de contaminação de cada grupo de vírus nas diversas regiões.

■ vírus transmitidos por via fecal-oral

O **HAV** atinge principalmente crianças e adultos jovens. Além da transmissão por meio da água e dos alimentos, o uso de utensílios contaminados e o contato direto com fezes de indivíduos infectados são fontes de contaminação importantes. No Brasil, devido à precariedade das condições sanitárias, a hepatite A é responsável por mais de 50% dos casos de hepatite viral em crianças e adultos jovens.

A transmissão do **HEV** tem sido relacionada, desde sua descoberta, à veiculação por água. No entanto, a maior ocorrência da infecção pelo HEV em adultos jovens tem sugerido a possibilidade de sua transmissão por via sexual. O risco da infecção pelo vírus da hepatite **E** está limitado a certas regiões geográficas como: Índia, África, Sudoeste Asiático e México.

■ vírus transmitidos pelo sangue, contato sexual e fluidos corporais

A forma de transmissão do **HBV** varia em função da maior ou menor predominância em cada região. Assim, nas regiões onde sua ocorrência é muito elevada, como na região Amazônica, a transmissão ocorre principalmente por fluidos orgânicos no contato interpessoal, quando há lesões de pele e mucosas. Nas regiões do Brasil onde o HBV é menos freqüente, a transmissão sexual e a sangüínea, por compartilhamento de seringas no uso indevido de drogas, são, atualmente, as principais formas de contaminação.

O **HDV**, como você já sabe, se transmite pelas mesmas vias do HBV, do qual depende para se multiplicar. O vírus da hepatite D pode ser transmitido junto com o HBV (coinfecção), ou infectar portadores crônicos do HBV (superinfecção): No Brasil, a ocorrência da infecção pelo HDV está restrita à Região Amazônica.



A infecção pelo **HCV** ocorre principalmente por via sangüínea atingindo, com maior freqüência, indivíduos que fazem uso compartilhado de seringas e os doentes crônicos, como por exemplo os doentes renais e os hemofílicos, que são expostos, constantemente, ao risco de contaminação em transfusões e em equipamentos de uso comum durante a diálise.

O estabelecimento de critérios cada vez mais rigorosos para a triagem sorológica dos doadores de sangue vem permitindo reduzir quase totalmente o risco de transmissão transfusional das hepatites B e C.

Quais são as manifestações clínicas mais freqüentes nas hepatites virais?

Clinicamente, as hepatites provocadas por vírus podem se apresentar de modo sintomático ou assintomático. Em geral, elas se apresentam de modo assintomático. Nas hepatites virais sintomáticas, as manifestações variam desde um mal-estar generalizado até o comprometimento hepático fulminante. São sintomas freqüentes: a falta de apetite, dor abdominal, náuseas, vômitos, icterícia, urina escura, fezes esbranquiçadas e febre.

Com ou sem sintomas, as hepatites podem evoluir de forma aguda ou crônica em função, entre outros fatores, do tipo de vírus. Confira, no Quadro 1, a evolução clínica das hepatites relacionadas a cada vírus.

Quadro 1 - Evolução das hepatites virais

TIPO DE VÍRUS	INCUBAÇÃO (DIAS)	FORMA DE EVOLUÇÃO
HAV Hepatite A	15 - 45	aguda não há forma crônica
HBV Hepatite B	30 - 180	aguda crônica: 5% a 10% dos casos em adultos e 90% em neonatos
HCV Hepatite C	15 - 150	aguda crônica: 85% dos casos
HDV Hepatite D	30 - 50	aguda crônica: 5% a 10% nos casos de coinfeção e 70% a 80% na superinfecção
HEV Hepatite E	28 - 48	aguda não há forma crônica

Como você pode ver, não há formas crônicas nas hepatites A e E. Observe que na hepatite B a evolução para a forma crônica está relacionada à idade em que o indivíduo adquiriu a infecção.



Existem vacinas para prevenir as hepatites virais?

As hepatites A e B são doenças imunopreveníveis, ou seja, elas podem ser evitadas por meio de vacinas comerciais disponíveis no mercado.

Ainda não foi possível a seleção de um agente imunizante para a produção de uma vacina eficaz contra o HCV, vírus responsável pela hepatite C.

A infecção causada pelo vírus Delta é evitada pela mesma vacina da hepatite B.

Os estudos sobre o desenvolvimento de uma vacina contra a hepatite E são mais recentes e ainda inconclusivos.

Vacine-se contra a hepatite B! Os profissionais de saúde, pela exposição freqüente a esse vírus, apresentam um risco duas a dez vezes maior de adquirir a doença, do que a população em geral.



Triagem sorológica de doadores de sangue e diagnóstico sorológico das hepatites virais



TRIAGEM SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS HEPATITES VIRAIS

Quais os vírus investigados na triagem sorológica de doadores de sangue?

Para a triagem de doadores, devido ao alto risco de transmissão transfusional, são investigados os vírus das hepatites **B** e **C**.

Como a infecção pelo vírus Delta está sempre associada ao vírus da hepatite B, é desnecessária a sua investigação.

Quais os principais vírus investigados para o diagnóstico etiológico das hepatites?

O **HAV**, o **HBV** e o **HCV** são os principais vírus a serem investigados para o **diagnóstico etiológico** das hepatites. As pesquisas do **HDV** e do **HEV** estão restritas a laboratórios de referência.

Como proceder se for solicitada a pesquisa do HDV e do HEV?

Se for solicitada a pesquisa para detecção de marcadores do HDV e HEV, **faça** contato com os seguintes laboratórios:

Para HDV:

Laboratório de Referência para Hepatites Virais
Instituto Evandro Chagas (IEC)
Av. Almirante Barroso 492 - CEP 66090-000 - Belém – PA
Fax: (091) 226-1284

Para HEV:

Laboratório de Referência para Hepatites Virais
Fiocruz - Instituto Oswaldo Cruz - Departamento de Virologia
Pavilhão Rocha Lima - 5º andar
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ Fax:
(021) 270-6397

Atenção: no manual "Coleta de Sangue" do TELELAB você encontra orientações sobre o acondicionamento das amostras para transporte.



Como são detectados os vírus das hepatites A, B e C no soro dos indivíduos?

A presença dos vírus das hepatites no soro dos indivíduos é detectada através dos marcadores sorológicos. Os marcadores sorológicos são os antígenos e os anticorpos específicos de cada vírus detectáveis no soro ou plasma de pessoas infectadas.

Anticorpo - Ac - também chamado imunoglobulina - Ig, é uma proteína produzida pelo sistema imune em resposta a um determinado antígeno. O anticorpo se liga de maneira específica ao antígeno.

Quais os principais marcadores sorológicos da infecção pelo vírus das hepatites A, B e C?

Veja, no Quadro 2, os principais marcadores sorológicos da infecção pelos vírus das hepatites A, B e C.

Quadro 2 - Principais marcadores sorológicos da infecção pelos vírus das hepatites A, B e C

VÍRUS	MARCADORES	SIGNIFICADO
HAV	anti-HAV IgM	anticorpo IgM contra o vírus da hepatite A
	anti-HAV	anticorpo total (IgM + IgG) contra o vírus da hepatite A
HBV	HBsAg	antígeno de superfície do vírus da hepatite B
	anti-HBs	anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
	anti - HBc IgM	anticorpo IgM contra o antígeno core do vírus da hepatite B
	anti - HBc	anticorpo total (IgM + IgG) contra o antígeno core do vírus da hepatite B
	HBe Ag	antígeno "e" do vírus da hepatite B
	anti - HBe	anticorpo contra o antígeno "e" do vírus da hepatite B
HCV	anti - HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C

Como você já sabe, o vírus da hepatite B possui também uma proteína interna chamada **HBcAg**. Este antígeno está no tecido hepático, mas não circula no sangue e, portanto, não é um marcador sorológico.



Quando são identificados os marcadores do HAV no curso sorológico típico da hepatite A?

Veja, na Figura 2, a representação gráfica do curso sorológico da infecção pelo vírus da hepatite A.

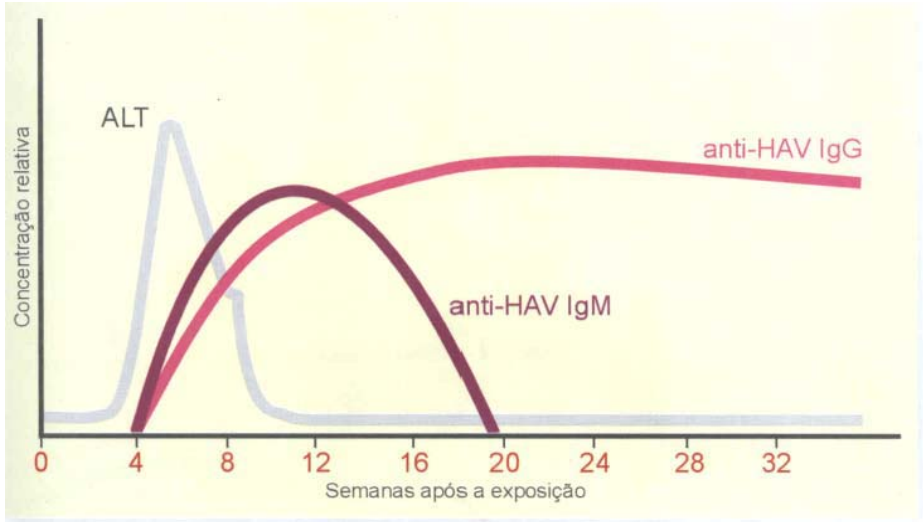


Figura 2 - Curso sorológico típico da hepatite A

Observe que:

- ▼ os anticorpos **anti-HAV IgM** aparecem em torno de quatro semanas após a exposição, caracterizando a **infecção aguda** que coincide com o aparecimento dos sintomas e com os níveis máximos de ALT.

ALT - alanina aminotransferase. Veja no bloco "Metodologias para diagnóstico das Hepatites Virais" mais informações sobre essa enzima.

- ▼ o anti-HAV IgM desaparece, em geral, em torno de 16 a 20 semanas após a infecção, o que o classifica como um marcador de infecção recente;
- ▼ anticorpos **anti-HAV IgG** substituem gradativamente os anticorpos anti-HAV IgM e persistem por toda a vida, sendo indicativos de **imunidade** contra o vírus da hepatite A. O anti-HAV IgG pode também ser detectado para avaliar a **resposta vacinal**.

Quando são identificados os marcadores do HBV no curso sorológico típico da hepatite B?

Os marcadores sorológicos da hepatite B aparecem em vários momentos da infecção, sendo que:

- ▼ o **HBsAg** e o **anti-HBc IgM** caracterizam a infecção aguda; o **HBeAg**, o **anti-HBc IgG**, o **anti-HBe** e o **anti-HBs** permitem avaliar a evolução clínica da infecção.

Para compreender melhor, veja a Figura 3.

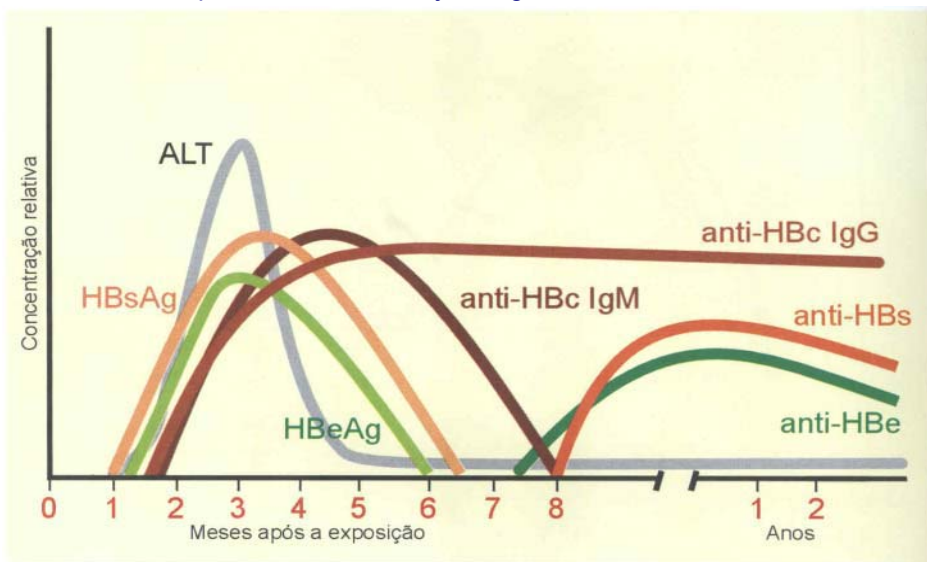


Figura 3 - Curso sorológico típico da hepatite B

Observe que:

- ▼ o **HBsAg** está presente no soro antes mesmo do início das alterações da ALT e do aparecimento dos sintomas. Este é, portanto, o primeiro marcador a aparecer e sua concentração máxima coincide com os sintomas. Por isso, é um dos marcadores pesquisados tanto na triagem de doadores de sangue em **unidades hemoterápicas** quanto no diagnóstico em **laboratórios de saúde pública**;
- ▼ o **HBeAg** surge no início da infecção e pode ser detectado durante várias semanas. Este marcador indica intensa **multiplicação viral** e, portanto, um maior potencial de transmissão;



- ▼ o **anti-HBc IgM** surge na fase aguda, podendo permanecer detectável até oito meses após o início da infecção;
- ▼ o **anti-HBc IgG** substitui gradativamente o anti-HBc IgM e, em geral, persiste por toda vida, sendo útil para indicar que houve em algum momento infecção pelo vírus da hepatite B;
- ▼ o **anti-HBc (IgM+IgG)** é o único marcador que define a etiologia da doença, detectável entre o desaparecimento dos antígenos e o aparecimento dos anticorpos. Por isso, o **anti-HBc** é pesquisado tanto na triagem de doadores de sangue, em **unidades hemoterápicas**, quanto no diagnóstico em **laboratórios de saúde pública**;
- ▼ o **anti-HBe** pode ser detectado após o desaparecimento do **HbeAg** indicando diminuição da multiplicação viral e a **provável** evolução para a cura da infecção;
- ▼ o **anti-HBs** pode ser detectado após o desaparecimento do **HBsAg**. A presença de **anti-HBs** indica **imunidade** em relação à infecção ou à **resposta vacinal**.

Em cerca de 5% a 10% dos casos de infecção pelo vírus da hepatite B não há desenvolvimento de imunidade, configurando a evolução para a forma crônica.



Como é caracterizada sorologicamente a evolução para a forma crônica da infecção pelo vírus da hepatite B?

Confira, na Figura 4, como se caracteriza sorologicamente a evolução para a forma crônica da infecção pelo vírus da hepatite B:

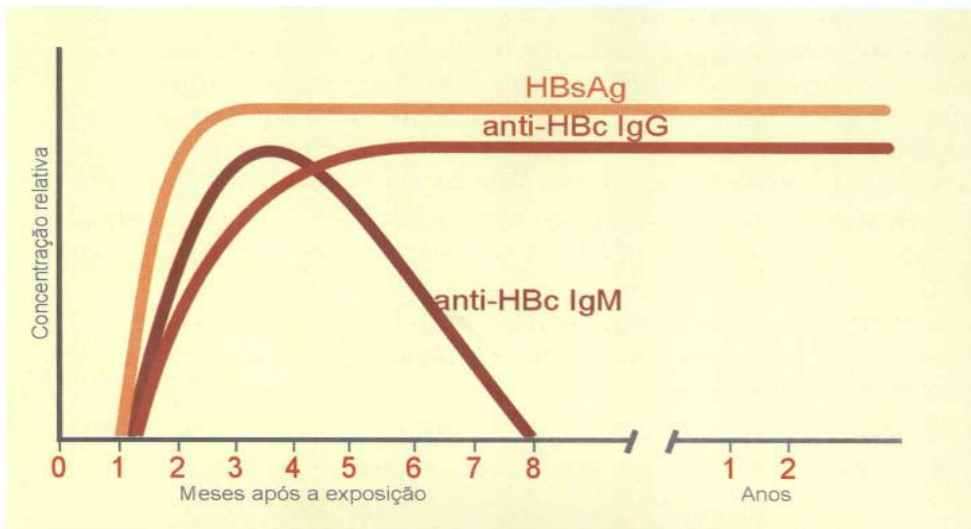


Figura 4 - Curso sorológico da infecção crônica pelo vírus da hepatite B

Observe que a permanência do **HBsAg** por mais de seis meses caracteriza a forma crônica da infecção. Este marcador está sempre presente ao longo do curso sorológico da forma crônica.

No curso sorológico da infecção crônica pode ainda ser detectado o **HBeAg** ou o **anti-HBe**:

- ▼ a presença do **HBeAg** sinaliza uma forma mais grave da infecção;
- ▼ o **anti-HBe** é indicador de um estágio com diminuição da multiplicação viral.

No Anexo 1, você encontra um quadro que relaciona os marcadores sorológicos da hepatite B com o estágio e a evolução da infecção.

Quando é identificado o marcador do HCV no curso sorológico típico da hepatite C?

Veja, na Figura 5, a representação gráfica do curso sorológico da infecção pelo vírus da hepatite C.

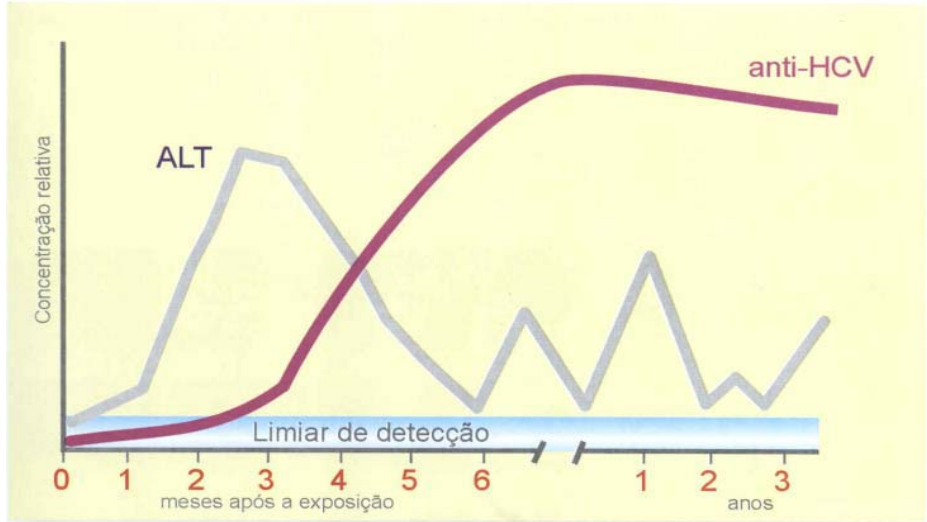


Figura 5 - Curso sorológico da hepatite C

Como você pode ver, o **anti-HCV** é detectado tardiamente, ou seja, cerca de três meses após a infecção. Assim, na faixa identificada como limiar de detecção, só é possível caracterizar a infecção pela identificação do RNA, por métodos de biologia molecular. Veja o bloco de "Metodologias para Diagnóstico Sorológico das Hepatites Virais".

Observe, também, que a dosagem de ALT no soro apresenta níveis variáveis ao longo da infecção pelo HCV.

Quais os marcadores pesquisados na triagem sorológica de doadores de sangue?

Na triagem de doadores são pesquisados obrigatoriamente, conforme a portaria 1.376 de 19/11/93 do Ministério da Saúde, os marcadores **HBsAg**, **anti-HBc** e o **anti-HCV**. Além disso, é obrigatória também, a dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT). A obrigatoriedade da realização destes testes visa a **proteção do receptor e não o diagnóstico** das hepatopatias entre os candidatos voluntários à doação de sangue.



Qual o fluxograma recomendado para a pesquisa dos marcadores HBsAg, anti-HBc e anti-HCV na triagem sorológica de doadores de sangue?

Veja, a seguir, o fluxograma recomendado para a testagem dos marcadores HBsAg, anti-HBc e anti-HCV em **unidades hemoterápicas**:

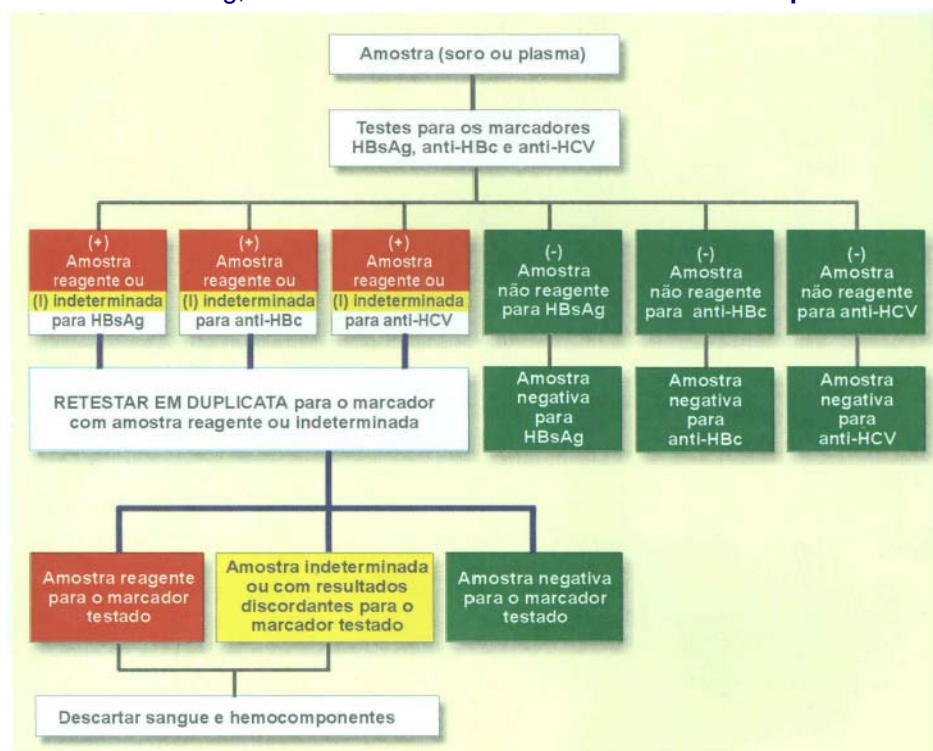


Figura 6 - Fluxograma de triagem sorológica de doadores de sangue para os marcadores das hepatites B e C

Para a compreensão deste fluxograma, é importante observar que:

- a amostra (soro ou plasma) é testada para detecção dos marcadores sorológicos HBsAg, anti-HBc e anti-HCV:
 - ▼ a amostra não reagente para o marcador testado será considerada amostra negativa para o mesmo;



▼ a amostra reagente ou indeterminada para qualquer um dos marcadores deve ser retestada em duplicata com o mesmo conjunto diagnóstico;

■ **na retestagem em duplicata:**

▼ a amostra não reagente para o marcador testado será considerada amostra negativa para o mesmo.

Importante: Em caso de amostras reagentes na testagem inicial e não reagentes na retestagem, **não** libere nenhum dos resultados obtidos com as outras **amostras testadas no mesmo protocolo**. Isto porque é possível que tenha havido erro de transcrição no protocolo ou troca de amostras. Se o protocolo estiver correto, **faça** novamente o teste de **todas** as amostras.

▼ serão descartados os hemocomponentes correspondentes à amostra reagente, indeterminada ou com resultados discordantes para **qualquer um** dos marcadores sorológicos testados;

▼ a definição do resultado de cada amostra deve obedecer aos critérios apresentados no Quadro 3:

Quadro 3 - Critérios para definição do resultado final da triagem sorológica de doadores de sangue para os marcadores das hepatites B e C

Resultados da Triagem	Resultados da retestagem em duplicata	Resultados final
(-)		Negativo
(+) OU (I)	(-/-)	Negativo
(+) OU (I)	(+/+)	Reagente
(+)	(+/-) ou (-/+) ou (+/I) ou (I/+)	Reagente
(+) OU (I)	(-/I) ou (I/-) ou (I/I)	Indeterminado

(-) não reagente, (+) reagente ou (I) indeterminado

Atenção: a liberação dos hemocomponentes só pode ser feita quando todos os testes sorológicos obrigatórios, conforme as normas vigentes do Ministério da Saúde, apresentarem resultados negativos.



Quais os procedimentos com os doadores que apresentarem resultados reagentes ou indeterminados?

Os doadores com resultados reagentes ou indeterminados para **qualquer um** dos marcadores das hepatites devem ser encaminhados aos serviços de saúde para diagnóstico.

As unidades hemoterápicas devem, obrigatoriamente, notificar casos positivos para HBsAg e/ou anti-HCV, à vigilância epidemiológica local.

Quais os marcadores sorológicos pesquisados para o diagnóstico etiológico das hepatites virais em laboratórios de saúde pública?

Para definição do diagnóstico etiológico das hepatites em laboratórios de saúde pública são pesquisados os marcadores anti-HAV IgM, HBsAg, anti-HBc IgM e o anti-HCV.

Para testagem desses marcadores, são recomendados dois tipos de fluxogramas:

- ▼ **um para a testagem dos marcadores** HBsAg, anti-HBc IgM e anti-HAV IgM **no diagnóstico das hepatites virais agudas;**
- ▼ **um para a testagem do anti-HCV no diagnóstico da hepatite C.**

Qual o fluxograma recomendado para o diagnóstico das hepatites virais agudas em laboratórios de saúde pública?

O Sistema de Vigilância Epidemiológica para as hepatites virais do Ministério da Saúde propõe que a pesquisa dos marcadores sorológicos para os casos de infecção aguda, seja realizada somente quando a dosagem da ALT indicar valores iguais ou maiores do que três vezes o normal.

Veja, na página seguinte, o fluxograma para o diagnóstico etiológico das hepatites virais agudas.



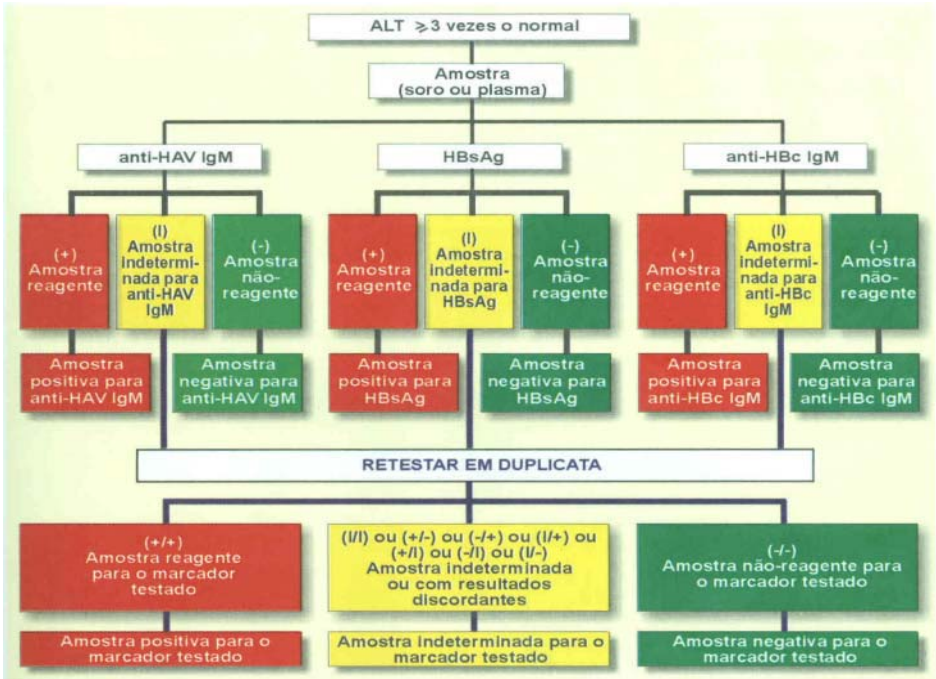


Figura 7 - Fluxograma para diagnóstico sorológico das hepatites agudas

Para a compreensão do fluxograma de **diagnóstico etiológico das hepatites virais agudas**, é importante observar que:

- ▼ a amostra **reagente** tem seu resultado definido como "Amostra Positiva para o marcador testado";
- ▼ a amostra **não-reagente** tem seu resultado definido como "Amostra Negativa para o marcador testado";
- ▼ a amostra **indeterminada** para qualquer um dos marcadores deve ser retestada em duplicata com o **mesmo** conjunto diagnóstico;

■ na retestagem em duplicata

- ▼ a amostra **reagente** tem seu resultado definido como "Amostra positiva para o marcador testado";
- ▼ a amostra **não-reagente** em duplicata tem seu resultado definido como "Amostra Negativa para o marcador testado";
- ▼ a amostra indeterminada ou com resultados discordantes tem seu resultado definido como "Amostra Indeterminada para o marcador testado".



Qual o fluxograma recomendado para o diagnóstico da hepatite C em laboratórios de saúde pública?

Observe a seguir o fluxograma recomendado para o diagnóstico da hepatite C:

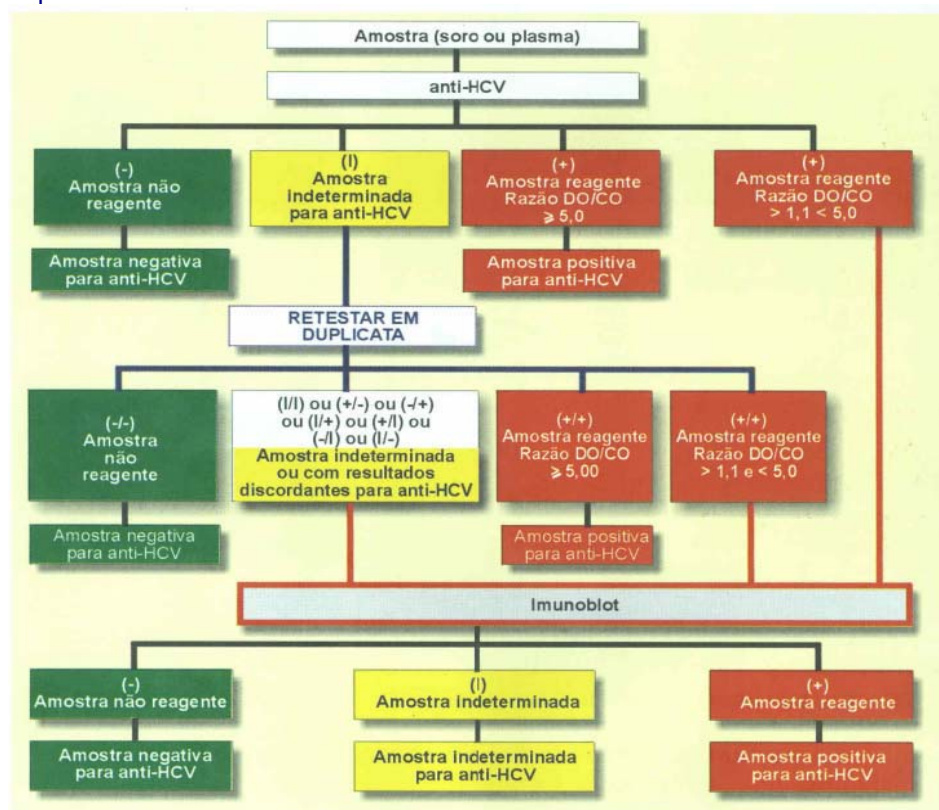


Figura 8 - Fluxograma para diagnóstico sorológico da hepatite C

Para compreensão deste fluxograma é importante observar que:

- a amostra deve ser submetida a um ELISA para detecção do **anti-HCV** e seu resultado interpretado de acordo com os seguintes critérios:
 - ▼ se a razão DO/CO (densidade ótica/cut-off) for **menor que 0,9** a amostra será considerada **não reagente** e seu resultado definido como "**amostra negativa para anti-HCV**";



- ▼ se a razão **DO/CO** for **maior que 0,9** e **menor que 1,1**, a amostra será considerada **indeterminada para anti-HCV** e deverá ser testada em **duplicata**, com o mesmo conjunto diagnóstico;
- ▼ se a razão **DO/CO** for **igual ou maior do que 5,0** a amostra será considerada **reagente** e seu resultado definido como **"amostra positiva para anti-HCV"**;
- ▼ se a razão **DO/CO** for **maior do que 1,1** e **menor do que 5,0**, a amostra será considerada **reagente com baixa relação DO/CO** devendo ser testada por **Imunoblot**;
- **na retestagem em duplicata:**
 - ▼ a amostra será considerada **negativa, indeterminada, reagente ou reagente com baixa relação DO/CO** para anti- HCV, de acordo com os mesmos critérios definidos para a testagem anterior;
 - ▼ a amostra indeterminada, com resultados discordantes ou **reagente com baixa relação DO/CO** deverá ser testada por **Imunoblot**.
- **no teste de Imunoblot:**
 - ▼ a amostra reagente tem seu resultado definido como **"amostra positiva para anti-HCV"**;
 - ▼ a amostra não reagente tem seu resultado definido como **"amostra negativa para anti-HCV"**;
 - ▼ a amostra indeterminada tem seu resultado definido como **"amostra indeterminada para anti-HCV"**.

Atenção: no bloco "Metodologias para Diagnóstico Sorológico das Hepatites Virais", você encontra mais informações sobre o critério recomendado para definir as amostras reagentes a serem testadas por Imunoblot.

Lembre-se: os laboratórios de saúde pública devem notificar casos de hepatites virais à vigilância epidemiológica local.



Metodologias para diagnóstico sorológico das hepatites virais

METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS HEPATITES VIRAIS



Quais os métodos utilizados para o diagnóstico laboratorial das hepatites?

Para o diagnóstico das hepatites utilizam-se:

- ▼ dosagem bioquímica;
- ▼ métodos de biologia molecular; e
- ▼ testes sorológicos.

Em que consiste a dosagem bioquímica?

A dosagem bioquímica consiste na quantificação por meio de provas bioquímicas das aminotransferases (ALT e AST). Essas enzimas se apresentam com seus níveis aumentados no soro de indivíduos com doenças hepáticas.

ALT - alanina aminotransferase, chamada anteriormente de TGP - transaminase glutâmico-piruvica.

AST - aspartato aminotransferase, denominada anteriormente de TGO - transaminase glutâmico-oxalacética.

A dosagem bioquímica por sua simplicidade, é o método de primeira escolha para se detectar laboratorialmente a inflamação no fígado.

Na maioria das hepatites virais, a elevação da ALT é o primeiro indicador do processo inflamatório. Por isso, o Ministério da Saúde, obriga que, na triagem sorológica de doadores de sangue, seja realizada a dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT).

Além disso, a ALT é importante na avaliação da evolução da doença e da eficácia do tratamento.

Mas para se definir qual a etiologia, ou seja, o agente causador da doença é preciso realizar testes sorológicos ou métodos de biologia molecular.

Em que consistem os métodos de biologia molecular?

Os métodos de biologia molecular detectam o ácido nucleico do agente infeccioso. Dentre os vários métodos existentes, a reação de amplificação de ácidos nucleicos é a mais empregada atualmente.

Amplificação de ácido nucleico - seqüência de reações que promove o aumento de cópias de uma molécula de DNA ou RNA.

A reação de amplificação de ácidos nucleicos permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos do DNA que se deseja detectar na amostra, a partir de um molde inicial do material genético (ácidos nucleicos). Para a detecção de vírus RNA, torna-se necessário fazer primeiro a **transcrição reversa** para DNA, ou seja, síntese do DNA, a partir do RNA, realizada pela enzima transcriptase reversa.



Os métodos de biologia molecular são amplamente utilizados em laboratórios de pesquisa e de referência, mas ainda não estão disponíveis para a rede de laboratórios. Por isso, a partir daqui serão enfocados os testes sorológicos que são rotineiramente empregados no diagnóstico das hepatites virais.

Em que consistem os testes sorológicos?

Os testes sorológicos são testes imunológicos que detectam antígenos virais e/ou anticorpos específicos no soro ou plasma, permitindo o diagnóstico etiológico das hepatites e o acompanhamento da evolução da infecção.

A ligação específica entre o antígeno e o anticorpo constitui a base dos testes imunológicos. Nesses testes são investigados antígenos virais e/ou anticorpos específicos como as imunoglobulinas da classe M (IgM), que são as primeiras a aparecerem e caracterizam uma infecção aguda, e as da classe G (IgG) que surgem em seguida permanecendo, muitas vezes, por toda a vida.

Que testes sorológicos podem ser utilizados no diagnóstico das hepatites virais?

Para o diagnóstico das hepatites virais são utilizados os seguintes testes sorológicos: hemaglutinação, radioimunoensaio, quimioluminescência e imunoenzimático.

■ teste de hemaglutinação

É o teste em que a reação antígeno-anticorpo é evidenciada pela aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígenos ou anticorpos. A leitura, em geral, é feita a olho nu.

Os testes de hemaglutinação para pesquisa de marcadores sorológicos das hepatites virais são realizados em placa de microtitulação, com diluições seriadas das amostras a serem testadas, permitindo uma análise quantitativa do título de antígenos ou anticorpos presentes. O **título** corresponde à última diluição da amostra em que foi observada aglutinação.

Embora seja um teste de fácil execução e com boa sensibilidade e especificidade, não existem, atualmente, conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado.



A **sensibilidade** de um teste é a sua capacidade de dar um resultado positivo quando o indivíduo está verdadeiramente infectado.

A **especificidade** de um teste é a sua capacidade de dar um resultado negativo quando o indivíduo não está infectado.

■ teste radioimunoensaio (RIA)

É o teste que utiliza uma substância radioativa para detecção da reação antígeno-anticorpo. O resultado é definido pela medida da radioatividade e sua leitura é feita em equipamento próprio. Embora bastante sensível, o RIA **não** é muito utilizado devido aos riscos de manipulação, ao curto prazo de validade e às exigências sanitárias para o descarte do material radioativo.

■ teste de quimioluminescência

É o teste que emprega uma substância luminescente para detecção da reação antígeno-anticorpo. O resultado é definido por emissão de luz que é captada e analisada em equipamento próprio. Embora seja muito sensível e específico, o sistema de detecção por quimioluminescência exige equipamentos especiais e ainda tem custo elevado.

■ teste imunoenzimático

É o teste onde a interação antígeno-anticorpo é evidenciada pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, e revelada por um cromógeno.

Cromógeno - substância que revela a ação de uma enzima sobre o substrato por meio de mudança de cor.

Os testes imunoenzimáticos são os mais utilizados porque são de fácil execução, baixo custo e possibilitam a automação. Por isso, daqui para a frente você vai ver com detalhes os testes imunoenzimáticos.

Quais os testes imunoenzimáticos mais utilizados em unidades hemoterápicas e em laboratórios de saúde pública?

O teste imunoenzimático mais comumente usado em unidades hemoterápicas e em laboratórios de saúde pública é o **ELISA** (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Como você já sabe, no diagnóstico da hepatite C, em função dos resultados obtidos no ELISA, algumas amostras são testadas também por **Imunoblot**.



A forma de combinar esses componentes caracteriza diferentes tipos de ELISA possibilitando a pesquisa de antígenos e anticorpos específicos.

Quais os tipos de ELISA utilizados para detecção dos marcadores sorológicos das hepatites A, B e C?

Veja, no Quadro 5, os tipos de ELISA mais utilizados para o diagnóstico da infecção pelo vírus das Hepatite A, B e C:

Quadro 5 - Tipos de ELISA mais utilizados

HEPATITES	MARCADORES SOROLÓGICOS	ELISA
A	anti-HAV IgM	Captura para IgM
	anti-HAV	Competitivo
B	HbsAg e HBe Ag	Sanduíche para pesquisa de antígeno
	anti-HBc IgM	Captura para IgM
	anti-HBc e anti-HBe	Competitivo
	anti-HBs	Indireto e sanduíche para pesquisa de anticorpo
C	anti-HCV	Indireto

Atenção: os conjuntos diagnósticos para anti-HAV e anti-HBc detectam anticorpos totais (IgM +IgG).

Nos próximos itens você vai acompanhar a seqüência da reação em cada um dos tipos de ELISA.



Qual a seqüência de um ELISA sanduíche para pesquisa de antígeno?

Veja essa seqüência com uma **amostra reagente**, na Figura 9.

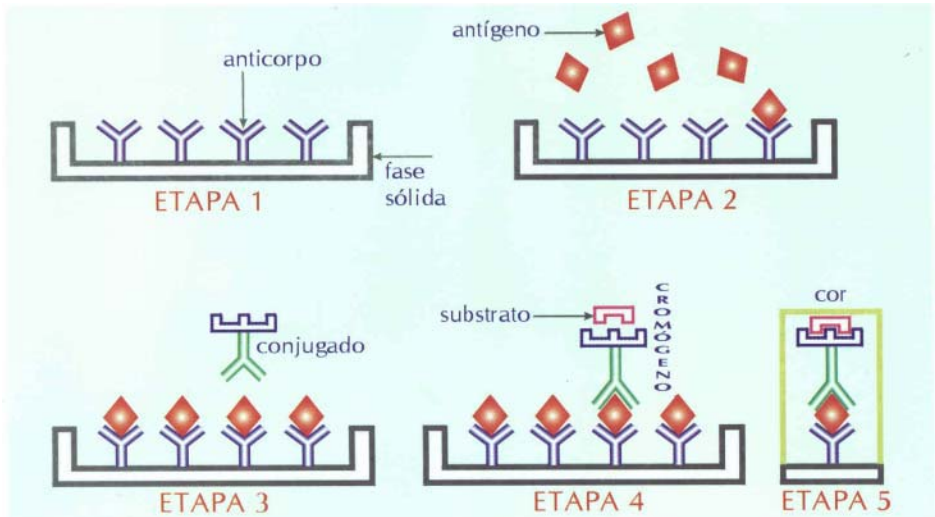


Figura 9 - Seqüência esquemática de um ELISA sanduíche para pesquisa de antígeno com uma amostra reagente

Observe que:

- ▼ na **etapa 1**, os **anticorpos específicos** estão adsorvidos à fase sólida;
- ▼ na **etapa 2**, é adicionada a amostra que, sendo reagente, contém antígenos específicos que se ligam aos anticorpos da fase sólida;
- ▼ na **etapa 3**, é adicionado um conjugado, composto de uma enzima ligada a um anticorpo também específico que interage com o antígeno da amostra;
- ▼ na **etapa 4**, adiciona-se o substrato e o cromógeno;
- ▼ na **etapa 5**, a ação da enzima no substrato é revelada pelo cromógeno que sofre um processo de oxidação dando origem a um produto com **cor** na amostra **reagente**. A cor varia de acordo com o tipo de cromógeno utilizado. Nesta etapa, é adicionada uma solução de bloqueio que interrompe o processo de oxidação. Se esse processo não for interrompido, haverá aparecimento de cor em todas as amostras levando a resultados falso-positivos.

Se **não** houver **antígeno** específico na amostra, ou seja, se ela for uma amostra **não reagente**, a reação **não** acontecerá e, conseqüentemente, **não** haverá desenvolvimento de cor.



Qual a seqüência de um ELISA indireto?

A Figura 10 apresenta essa seqüência com uma amostra reagente.

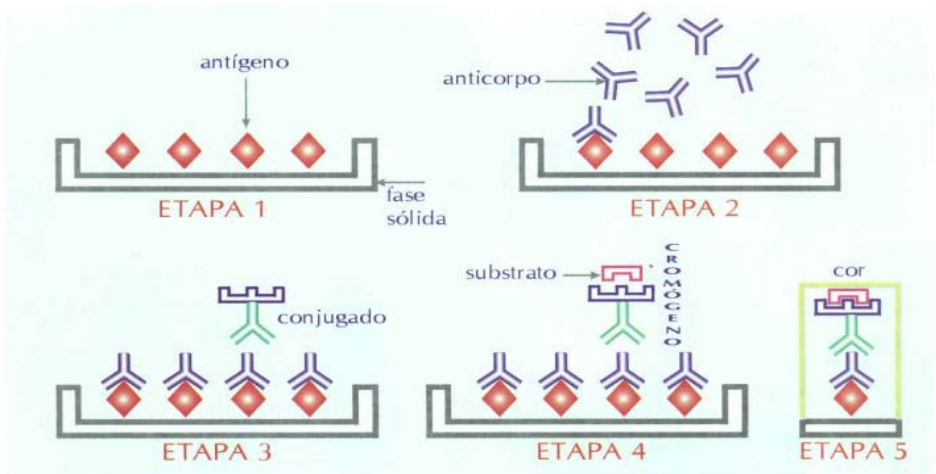


Figura 10 - Seqüência esquemática de um ELISA indireto com uma amostra reagente

No ELISA indireto você deve observar que:

- ▼ na **etapa 1**, os **antígenos** estão adsorvidos à fase sólida;
- ▼ na **etapa 2**, é adicionada a amostra que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam ao antígeno da fase sólida;
- ▼ na **etapa 3**, com a adição de um conjugado composto de uma enzima ligada a um **anti-anticorpo** (anti-imunoglobulina humana) ocorre a interação anti-anticorpo e anticorpo da amostra. Neste caso, o conjugado **não** utiliza um anticorpo específico para o antígeno, mas um anti-anticorpo humano, e por isso o teste é considerado indireto;
- ▼ na **etapa 4**, é adicionado o substrato e o cromógeno;
- ▼ na **etapa 5**, como você já viu no ELISA tipo sanduíche, a ação da enzima do substrato é revelada pelo cromógeno, que possibilita o **desenvolvimento de cor na amostra reagente**. Nesta etapa, é adicionada uma solução de bloqueio que interrompe o processo de oxidação do cromógeno para evitar a ocorrência de **resultados falso-positivos**.

Se **não** houver anticorpo específico na amostra, ou seja, se ela for **não reagente**, a reação **não** acontecerá e conseqüentemente **não** haverá desenvolvimento de cor.

Qual a seqüência de um ELISA de captura para IgM?

A Figura 11 apresenta essa seqüência com uma amostra reagente.

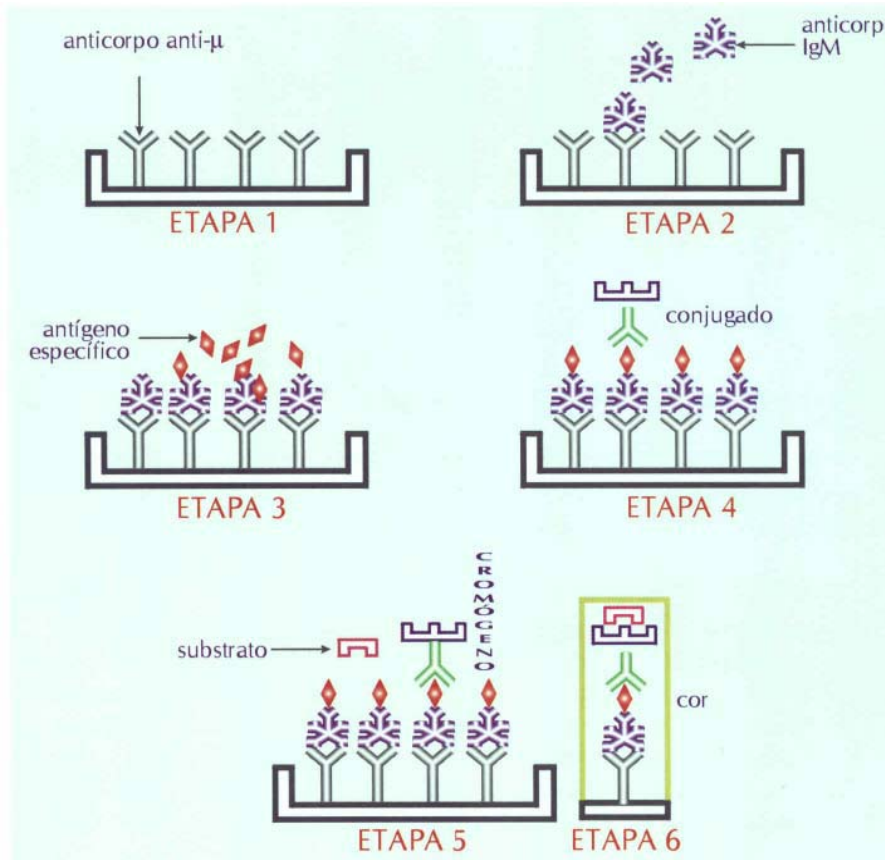


Figura 11 - Seqüência esquemática de um ELISA de captura para IgM com uma amostra reagente

Na seqüência de um ensaio de captura para IgM, é importante você observar que:

- ▼ na **etapa 1**, os **anticorpos anti- μ** (anti-IgM humano) estão adsorvidos à fase sólida;
- ▼ na **etapa 2**, é adicionada a amostra que, sendo reagente, contém anticorpos IgM que se ligam aos anticorpos da fase sólida. Os anticorpos anti- μ da fase sólida **capturam** os anticorpos IgM da amostra;
- ▼ na **etapa 3**, acrescenta-se antígeno específico do teste que se liga aos anticorpos IgM específicos da amostra;
- ▼ na **etapa 4**, adiciona-se um conjugado composto de uma enzima ligada a um anticorpo contra esse antígeno específico;
- ▼ na **etapa 5**, adiciona-se o substrato e o cromógeno;
- ▼ na **etapa 6**, do mesmo modo que nos ELISA sanduíche e indireto, a ação da enzima sobre o substrato é revelada pelo cromógeno que sofre um processo de oxidação, dando origem a um produto com **cor** na amostra **reagente**. A solução de bloqueio, adicionada nesta etapa, interrompe o processo de oxidação do cromógeno evitando aparecimento de cor em todas as amostras, o que levaria a resultados falso-positivos.

Se **não** houver na **amostra** anticorpo IgM específico para o antígeno utilizado no teste, ou seja, se ela for **não reagente**, a reação **não** acontecerá e, conseqüentemente, **não** haverá desenvolvimento de cor.



Qual a seqüência de um ELISA competitivo?

Veja, na Figura 12, a seqüência de um ELISA competitivo.

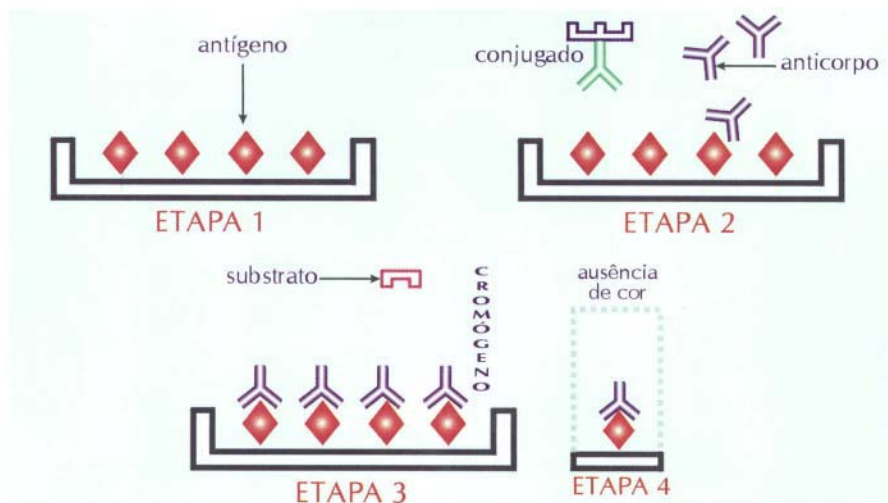


Figura 12 - Seqüência esquemática de um ELISA tipo competitivo com uma amostra reagente

Como você pode ver:

- ▼ na **etapa 1**, os **antígenos** estão adsorvidos à fase sólida;
- ▼ na **etapa 2**, são adicionados a amostra e o conjugado. O conjugado é composto de uma enzima ligada a um anticorpo específico. Quando existem anticorpos na amostra eles competem com o anticorpo específico do conjugado pela ligação com o antígeno adsorvido à fase sólida;
- ▼ na **etapa 3**, adiciona-se o substrato e o cromógeno;
- ▼ na **etapa 4**, no ELISA competitivo, quando a amostra é **reagente** a ligação do conjugado **não** acontece, **não** há ação da enzima sobre o substrato e, conseqüentemente, **não** há desenvolvimento de cor pelo cromógeno.

Observe que, ao contrário dos outros testes, no ELISA competitivo a **ausência de cor** ao final da reação indica que a **amostra é reagente** e a presença **de cor** caracteriza a **amostra não reagente**.



Atenção: se **não** houver anticorpo específico na amostra, ou seja, se ela for uma amostra **não reagente**, a ação do conjugado sobre o substrato acontecerá e será evidenciada pelo desenvolvimento de cor promovido pela oxidação do cromógeno. Por isso, nesta etapa é adicionada uma solução de bloqueio que interrompe esse processo de oxidação para evitar o aparecimento de cor em todas as amostras levando a **resultados falso-negativos**.

Como definir se um resultado de um ELISA é reagente, não reagente ou indeterminado?

No ELISA, o resultado de uma reação é definido pela leitura da absorvância ou densidade ótica (DO) em espectrofotômetro, utilizando um filtro com comprimento de onda indicado pelo fabricante do conjunto diagnóstico. Usualmente, cada conjunto tem sua forma de calcular o *cut-off* - CO (ponto de corte), acima ou abaixo do qual as amostras são consideradas reagentes, não reagentes ou indeterminadas.

Para os ELISA **sanduíche**, **indireto** e **captura para IgM**, uma amostra é **reagente** quando a DO encontrada estiver **acima** do *cut-off*, e é **não** reagente quando a DO estiver **abaixo** do *cut-off*.

Para os ELISA **competitivos**, uma amostra é **reagente** quando a DO encontrada estiver **abaixo** do *cut-off*, e é **não** reagente quando a DO estiver **acima** do *cut-off*.

Em qualquer tipo de ELISA são consideradas indeterminadas as amostras com valores de DO incluídos na **zona cinza** (*borderline*). A zona cinza corresponde à faixa de valores em torno do *cut-off* dentro da qual não se pode ter certeza do resultado.



Como estabelecer a zona cinza no ELISA?

Em geral, o fabricante do conjunto diagnóstico indica como estabelecer a zona cinza.

Quando **não** existir a orientação do fabricante recomenda-se, por medida de segurança, que sejam consideradas indeterminadas as amostras com valores de DO incluídas no intervalo de 10% a 20% abaixo ou acima do valor do *cut-off*.

Acompanhe um exemplo do cálculo da zona cinza com um intervalo de 10%:

Elisa com CO = 0,076

$$10\% \text{ do CO} = \frac{0,076}{10} = 0,0076$$

Limite inferior da zona cinza = CO – 10 % = 0,076 – 0,0076 = **0,068**

Limite superior da zona cinza = CO + 10% = 0,076 + 0,0076 = **0,083**

Como você pode ver, neste exemplo, são consideradas indeterminadas as amostras com DO de 0,068 a 0,083.

Quais os componentes do Imunoblot para o diagnóstico da hepatite C?

Confira, no Quadro 6, as variações encontradas nos componentes do Imunoblot para o diagnóstico da hepatite C.

Quadro 6 – Componentes do Imunoblot para o diagnóstico da hepatite C

Fase sólida	membrana: fitas de nitrocelulose
Antígeno do vírus da hepatite C	peptídeo sintético; ou recombinante de diferentes frações antigênicas do vírus da hepatite C
Enzima	peróxidase
Substrato	peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
Cromógeno	4-cloro 1-naftol

Qual a seqüência de um Imunoblot?

Na Figura 13 está apresentada a seqüência de um Imunoblot com uma amostra reagente.



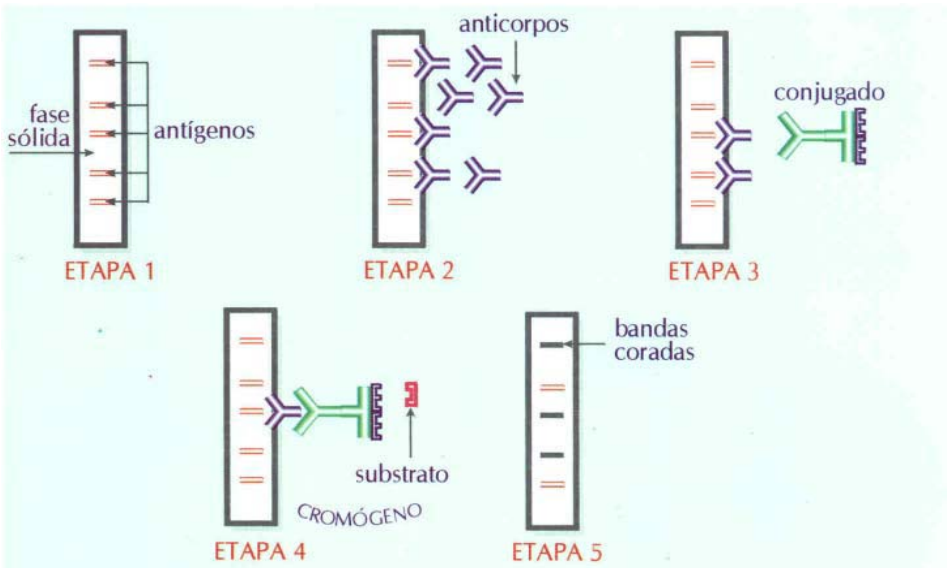


Figura 13 - Seqüência esquemática de um Imunoblot de uma amostra reagente

É importante você observar que:

- ▼ na **etapa 1**, ou seja, na fase sólida, diferentes antígenos estão adsorvidos em uma fita de nitrocelulose;
- ▼ na **etapa 2**, é adicionada a amostra que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam aos diferentes antígenos da fase sólida;
- ▼ na **etapa 3**, é adicionado um conjugado composto de uma enzima ligada a um anti-anticorpo (anti-imunoglobulina humana) que interage com o anticorpo da amostra;
- ▼ na **etapa 4**, é adicionado o substrato e o cromógeno;
- ▼ na **etapa 5**, quando a amostra é reagente a ação da enzima sobre o substrato dá origem a um produto insolúvel que se precipita sobre a fita. A oxidação do cromógeno promove o aparecimento de cor no local da reação dando origem às bandas. Nesta etapa, é adicionada água para lavagem e eliminação da coloração inespecífica que impede a leitura do resultado.

Se **não** houver anticorpo específico na amostra, ou seja, se ela for uma amostra **não reagente**, a reação **não** acontecerá e, conseqüentemente, **não** serão visualizadas as bandas características.



Como definir o resultado do teste Imunoblot?

No Imunoblot o resultado de uma reação é definido pela observação das bandas, comparando-se o padrão de bandas da amostra com o padrão de bandas da fita controle, de acordo com os critérios fornecidos pelo fabricante.

As amostras poderão ser reagentes, não reagentes ou indeterminadas.

Qual o critério recomendado para definir as amostras que devem ser testadas por Imunoblot em função dos resultados obtidos no ELISA?

Recomenda-se o seguinte critério:

Testar por Imunoblot as amostras que, na investigação da Hepatite C, obtiveram, no ELISA, resultados indeterminados ou reagentes com valores da razão DO/CO maior do que 1,1 e menor do que 5,0.

Este critério baseia-se em resultados obtidos por COUROUCÉ e colaboradores (1991), MARTINS e colaboradores (1994) e GONÇALES (1997). Acompanhe um exemplo da aplicação deste critério:

Num EISA para investigar Hepatite C com **CO = 0,329**, duas amostras obtiveram os seguintes resultados:

▼ **amostra 1:** DO = 0,600

$$\text{calculando a razão } \frac{DO}{CO} = \frac{0,600}{0,329} = 1,8$$

▼ **amostra 2:** DO = 1,800

$$\text{calculando a razão } \frac{DO}{CO} = \frac{1,800}{0,329} = 5,4$$

Como você pode ver, neste exemplo, a razão DO/CO **1,8** indica que a **amostra 1** deve ser testada **também** por **Imunoblot**; a razão DO/CO 5,4 indica que a **amostra 2** tem seu resultado definido no **ELISA** como amostra **positiva** para anti-HCV e, neste caso, é **dispensável** o teste por **Imunoblot**.



Procedimentos para realização dos testes sorológicos para diagnóstico das hepatites virais



PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS
PARA DIAGNÓSTICOS DAS HEPATITES VIRAIS

Que tipo de amostra deve ser utilizada para o diagnóstico das infecções pelos vírus das hepatites?

Soro ou plasma. Veja informações sobre a preparação das amostras no manual TELELAB "Coleta de Sangue".

Atenção: as amostras **não** podem estar turvas, lipêmicas ou hemolisadas. Em qualquer desses casos elas devem ser descartadas e novas amostras devem ser solicitadas.

Manipule sempre as amostras como material potencialmente infeccioso.

Como registrar a entrada das amostras em unidades hemoterápicas?

O registro pode ser feito por sistema manual ou informatizado.

De qualquer modo, é importante que você:

- ▼ copie, do rótulo da amostra, e registre na planilha de resultados os dados de identificação do doador e a data da coleta.

Os dados devem sempre ser conferidos por duas pessoas. Erros de identificação podem:

- ▼ expor o receptor a riscos de contaminação
- ▼ levar à rejeição de um doador apto.

Veja um exemplo de planilha de resultados no Anexo 2 deste manual.

Em quantas alíquotas devem ser distribuídas as amostras, antes das análises, em unidades hemoterápicas?

Em unidades hemoterápicas, antes de serem analisadas, as amostras de soro ou plasma devem, **obrigatoriamente**, ser distribuídas em no mínimo duas alíquotas:

- ▼ uma para os testes de rotina;
- ▼ outra para a contraprova.

Recomenda-se se que a alíquota da contraprova tenha um volume de aproximadamente 1 ml.

A distribuição em um número maior de alíquotas e o volume das mesmas fica a critério de cada serviço.

A alíquota da contraprova deve ficar armazenada obrigatoriamente a **- 20°C** e estar disponível por seis meses para a vigilância sanitária.



Como acondicionar e conservar as alíquotas, antes de fazer as análises nas unidades hemoterápicas?

- ▼ Distribua as alíquotas para os testes de rotina, em tubos ou frascos com tampa, previamente identificados com os dados correspondentes;

Atenção: as alíquotas das amostras podem ser conservadas em geladeira, entre **2 °C** e **8 °C** por **72 horas** no máximo. Depois desse período, elas precisam ser congeladas a **-20°C;**

- ▼ distribua em frascos **próprios para congelamento** a alíquota da contraprova e demais alíquotas a serem congeladas;
- ▼ acondicione esses frascos em caixas de papelão ou plástico rígido identificadas com informações que facilitem a localização dessas alíquotas.

Como registrar a entrada das amostras em laboratórios de saúde pública?

O registro pode ser feito por sistema manual ou informatizado. De qualquer modo, é importante que você:

1. verifique se a identificação da amostra é a mesma da solicitação do(s) teste(s);
2. copie da solicitação, e registre numa planilha de resultados, os seguintes itens básicos:
 - ▼ número de registro da amostra;
 - ▼ nome ou iniciais;
 - ▼ procedência da amostra (unidade que solicitou);
 - ▼ data da coleta;
 - ▼ sexo;
 - ▼ idade;
 - ▼ resultados da ALT.

Atenção: os dados devem sempre ser conferidos por duas pessoas. Erros de identificação podem levar à troca de resultados.

Veja um exemplo de planilha de resultados no Anexo 3 deste manual.



É preciso distribuir em alíquotas as amostras para análises nos laboratórios de saúde pública?

Nos **laboratórios de saúde pública** não existe a obrigatoriedade da alíquota para contraprova. No entanto, recomenda-se que a amostra seja distribuída no mínimo em duas alíquotas:

- ▼ uma para realizar os testes solicitados, e
- ▼ outra para atender necessidades relacionadas, por exemplo, à execução de testes complementares.

Para acondicionar e armazenar as amostras utilize os mesmos procedimentos já apresentados no item anterior.

Quais os materiais necessários para executar um ELISA e um teste de Imunoblot?

No Quadro 7 estão os materiais geralmente fornecidos pelo fabricante.

Quadro 7 - Materiais geralmente fornecidos pelo fabricante

ELISA	Imunoblot
✓ placa de microtitulação ou pérolas sensibilizadas com antígenos ou anticorpos	✓ fitas de nitrocelulose com proteínas adsorvidas em bandas ✓ pinças plásticas para manipulação de fitas de nitrocelulose ✓ canaletas plásticas para a colocação das fitas
✓ selos ou tampas de cobertura	✓ selos ou tampas de cobertura
✓ soro-controle negativo	✓ soro-controle negativo
✓ soro-controle positivo	✓ soro-controle positivo
✓ soluções-tampão para a diluição das amostras e do conjugado	✓ soluções-tampão para a diluição das amostras e do conjugado
✓ solução-tampão para a lavagem	✓ solução-tampão para a lavagem
✓ conjugado	✓ conjugado
✓ substrato e cromógeno	✓ substrato e cromógeno
✓ solução-tampão para diluir o substrato	✓ solução-tampão para diluir o substrato
✓ solução de bloqueio de reação	

No Quadro 8, a seguir, você pode conferir os outros materiais necessários mas não fornecidos pelo fabricante.



Quadro 8- Materiais não fornecidos pelo fabricante para o ELISA e Imunoblot

✓	pipetas manuais de volume ajustável (5 a 50 μl, de 50 a 200 μl e de 200 a 1.000 μl) mono e multicanal
✓	ponteiras descartáveis para pipetas ajustáveis
✓	pipetas sorológicas de 5 ml, 10 ml e 20 ml
✓	pêra de borracha ou outro auxiliar de pipetagem
✓	barquetes (reservatórios) para a utilização de pipetas multicanal (ELISA)
✓	béquer de 1.000 ml
✓	provetas de 1.000 ml, 500 ml e 100 ml
✓	frasco com tampa de 1.000 ml
✓	bastão de vidro
✓	equipamentos de proteção individual: luvas, máscaras, avental ou jaleco
✓	recipiente de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%.
✓	soro para controle de qualidade interno da reação. Veja orientações no curso TELELAB – "Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública"
✓	protocolos (vide bloco "Anexos")

Observe que as pipetas multicanal são utilizadas apenas para os ELISA e os outros materiais são necessários nos dois testes.

Além dos materiais constantes dos Quadros 7 e 8, o laboratório deve estar equipado com: banho-maria com termostato para regulagem de temperatura; agitador orbital; estufa com termostato regulável e sistema de lavagem e de leitura compatíveis com os métodos empregados e com as especificações dos conjuntos diagnósticos disponíveis.

Antes de iniciar um procedimento, verifique se os equipamentos estão em condições adequadas de uso. No curso TELELAB "Equipamentos - Utilização e Monitoramento em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública", você encontra as orientações necessárias.



Quais os procedimentos para executar o ELISA ?

Os procedimentos variam segundo o marcador sorológico que se deseja detectar, e às vezes para um mesmo marcador, de acordo com o fabricante do conjunto diagnóstico. Alguns procedimentos gerais, no entanto, devem ser observados:

1. confira o conjunto diagnóstico (componentes, materiais e reagentes) verificando se ele está sob condições adequadas de conservação e dentro do prazo de validade;
2. leia todas as instruções do conjunto diagnóstico antes de iniciar a reação;
3. providencie os outros materiais, não fornecidos pelo fabricante, necessários para a realização dos testes;

Atenção: providencie uma ponteira descartável para cada amostra e para cada tipo de reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.

4. leia, antes de iniciar o teste, como preparar todas as soluções. Utilize exatamente os volumes indicados, não faça qualquer alteração com o intuito de economizar tempo ou reagentes;
5. deixe as amostras e os reagentes que serão utilizados atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação;

A temperatura ambiente em laboratórios deve estar entre **20°C e 26°C**.

6. homogeneize as amostras;
7. inclua, além dos controles fornecidos pelo fabricante, o controle de qualidade interno (CQI) da reação. Veja orientações no curso TELELAB – "Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública";
8. faça um protocolo de trabalho, relacionando os controles e as amostras. Veja um exemplo de um protocolo de ELISA no Anexo 4 deste manual;
9. siga rigorosamente os tempos, as formas de homogeneização, os ciclos de incubação e lavagem indicados pelo fabricante, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das amostras;
10. faça a leitura da absorbância em espectrofotômetro, utilizando o filtro recomendado pelo fabricante do conjunto diagnóstico;

Siga as orientações do fabricante de cada conjunto para o cálculo do *cut-off*.



11. verifique se os resultados obtidos para os controlos estão de acordo com os critérios definidos pelo fabricante. Caso contrário, faça novamente o teste procurando identificar e corrigir as causas dos resultados inadequados. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controlos estiverem de acordo com os critérios do fabricante.
12. registre os resultados em sua planilha, no campo correspondente ao marcador sorológico testado.
13. despreze as amostras e os resíduos do conjunto diagnóstico utilizado, conforme as orientações do curso TELELAB - "Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e em Laboratórios de Saúde Pública".

Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.

Utilize sempre equipamentos de proteção individual e manipule as amostras como material potencialmente infeccioso.

Quais os procedimentos para executar um Imunoblot?

Lembre-se: de acordo com o fluxograma, no diagnóstico da hepatite C, utiliza-se o **Imunoblot** para as amostras indeterminadas e para auxiliar na avaliação dos resultados das amostras reagentes **com DO/CO maior do que 1,1 e menor do que 5,0**, obtidos nos ELISA.

Os procedimentos variam de acordo com o fabricante do conjunto diagnóstico. Seja qual for o conjunto utilizado, alguns procedimentos gerais devem ser observados:

1. confira o conjunto diagnóstico (componentes, materiais e reagentes) verificando se ele está sob condições adequadas de conservação e dentro do prazo de validade;
2. leia todas as instruções do conjunto diagnóstico antes de iniciar a reação;
3. providencie os outros materiais necessários para a realização dos testes, não fornecidos pelo fabricante;

Atenção: pegue uma ponteira descartável para cada amostra e para cada tipo de reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.



4. leia atentamente como preparar todas as soluções antes de iniciar o teste. Utilize exatamente os volumes indicados, não faça qualquer alteração com o intuito de economizar tempo ou reagentes;
5. deixe as amostras e os reagentes que serão utilizados atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação;
6. faça um protocolo de trabalho, relacionando os controles e o registro das amostras com o número existente em cada fita de nitrocelulose. Veja um exemplo de protocolo de Immunoblot no Anexo 5 deste manual;
7. utilize pinças plásticas para manipular as fitas de nitrocelulose;
8. coloque cada uma das fitas em uma canaleta, mantendo a face numerada voltada para cima;
9. mantenha as canaletas cobertas de modo a evitar a mistura do conteúdo das mesmas;
10. siga rigorosamente os ciclos de lavagem indicados pelo fabricante, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das amostras;
11. observe, rigorosamente, todos os volumes, os tempos e as formas de homogeneização e os períodos de incubação recomendados pelo fabricante;
12. faça a leitura e interprete os resultados de acordo com as recomendações do fabricante;
13. verifique se os resultados obtidos para os controles estão de acordo com os critérios definidos pelo fabricante. Caso contrário, faça novamente o teste procurando identificar e corrigir as causas dos resultados inadequados. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios do fabricante;
14. registre os resultados do teste, de acordo com o seu protocolo de trabalho, em uma planilha de resultados de testes complementares como a apresentada no Anexo 6;
15. despreze as amostras e os resíduos do conjunto diagnóstico utilizado, conforme as orientações do curso TELELAB - "Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e em Laboratórios de Saúde Pública".



Como proceder para garantir a qualidade dos resultados dos testes imunoenzimáticos?

- ▼ Não utilize as amostras de soro ou plasma que apresentem turvação, hemólise ou lipemia. Para maiores informações consulte o manual "Coleta de Sangue" do TELELAB;
- ▼ não use conjuntos diagnósticos ou reagentes com prazo de validade vencido;
- ▼ verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso.
- ▼ não misture controles, conjugados, tampões, reagentes, pérolas, placas, strips ou fitas de diferentes lotes e/ou fabricantes;
- ▼ armazene os conjuntos para diagnóstico de acordo com as recomendações do fabricante;
- ▼ não exponha o substrato à luz durante o armazenamento ou incubação da reação, evitando assim a fotodecomposição do mesmo;
- ▼ não coloque o substrato em contato com substâncias oxidantes ou metais, para evitar sua degradação evidenciada pela alteração de cor, tornando o produto impróprio para uso;
- ▼ faça a limpeza e a manutenção periódica dos equipamentos de lavagem, evitando dessa maneira o acúmulo de sais e outros compostos químicos;
- ▼ verifique se o filtro usado para a leitura da absorbância é aquele indicado pelo fabricante;
- ▼ Faça a limpeza e a manutenção periódica dos equipamentos utilizados na reação.

A segurança e a confiabilidade dos testes para diagnóstico dependem também, entre outros parâmetros, da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

A **sensibilidade** de um teste é a sua capacidade de dar um resultado positivo quando o indivíduo está verdadeiramente infectado.

A **especificidade** de um teste é a sua capacidade de dar um resultado negativo quando o indivíduo não está infectado.

A **reprodutibilidade** de um teste é a sua capacidade de obter repetidamente os mesmos resultados em diferentes testes realizados com a mesma amostra, empregando a mesma metodologia e o mesmo conjunto diagnóstico.



Anexos

ANEXOS



ANEXO 1

CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS RESULTADOS DOS TESTES DOS MARCADORES DA HEPATITE B E O ESTÁGIO/EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO

Resultados dos testes dos marcadores sorológicos da Hepatite B						Estágio/evolução da infecção
HBsAg	HBeAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc	Anti-HBe	Anti-HBs	
+	-	-	-	-	-	Período de incubação
+	+	+	+	-	-	Hepatite B aguda
+	+	-	+	-	-	Hepatite B aguda ou Hepatite B crônica
+	-	-	+	+	-	
+	-	-	+	-	-	Início da fase de convalescência
-	-	+	+	-	-	Exposição ao HBV
-	-	-	+	-	-	Imune – infecção passada
-	-	-	+	+	+	
-	-	-	-	-	+	Imune – resposta vacinal
-	-	-	-	-	-	Suscetível à infecção pelo HBV



ANEXO 4

EXEMPLO DE PROTOCOLO ELISA EM MICROPLACA

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Teste: _____ Data: __/__/__

Fabricante: _____ Lote: _____ Validade: __/__/__

Técnico responsável: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Média dos controlos negativos: _____

Média dos controlos positivos: _____

Valor do *cut off*: _____



Bibliografia

BIBLIOGRAFIA



- BALAYAN, M. S.; ANDJAPARIDZE, A. E.; SANVINSKAYA, S. S. et al - Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. **Intervirology** **20**: 23-31, 1983.
- BENSABATH, G.; CATÁGENAS, P. R. B.; DIAS, L. B.; CRESCENTE, J. A. B.; MIRANDA, E. C. B. M. - Hepatites por vírus, cap 20, pp 313-343 *in* Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Coord.: Raimundo Nonato Queiroz de Leão, Editora CEJUP, Universidade do Pará e Instituto Evandro Chagas, 826 p, Belém, 1997.
- BLUMBERG, G. S.; ALTER, H. J.; VISNICH, S. - A new antigen in leukemia sera. **JAMA**, **191**: 541-546, 1965.
- CASTILLO, E.; BENSABATH, G.; MORAES, D. - Hepatites Virais, Capítulo XVI. In: Brasil. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Guia de Vigilância Epidemiológica. Editado pela Fundação Nacional de Epidemiologia. Brasília, DF, Brasil. 1994, pp 179-196.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A and E. Set Information Packet. <http://www.cdc.gov/publications.htm>. 1998.
- CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. - Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, **244**: 359-362, 1989.
- COUROUCÉ, A. M.; JANOT, C. & THE HEPATITIS STUDY GROUP OF THE FRENCH SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION - Recombinant Immunoblot Assay First and Second Generations on 732 Blood Donors Reactive for Antibodies to Hepatitis C Virus by ELISA. **Vox Sang** **61**: 177-180, 1991.
- FEINSTONE, S. M.; KAPIKIAN, A. Z.; PURCELL, R. H. - Hepatite A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science**, **182**: 1026-1028, 1973.
- GONÇALES, N. S. L. - Hepatite C em doadores de sangue: Diagnóstico por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase e sua correlação com os testes imunoenzimáticos e "Imunoblot" recombinante, Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Médicas, Tese, 1997.



- JANEWAYJR, C. A.; & TRAVERS, P. - Imunologia - O sistema imunológico na saúde e na doença, 2ª edição, Editora Artes Médicas Sul Ltda., Porto Alegre, 1996.
- MARTINS, R. M. B.; VANDERBORG, B. O. M.; ROUZERÉ, C.; SANTANA, C. L.; MORI, D. N.; FERREIRA, R. G.; YOSHIDA, C. F. T. - Anti-HCV PCR and risk factor analysis in blood donor population of Central Brazil. **Rev. Inst. trop. Med. Trop. São Paulo** **36**: 501-506, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Manual TELELAB - HIV TRIAGEM, Brasília, 1997.
Manual TELELAB - HIV Testes Confirmatórios, 1997.
- MURPHY, F. A., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., GHABRIAL, S. A., JARVIS, A. W., MARTELLI, G. P., MAYO, M. A., SUMMERS, M. D., (eds): Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report Committee of International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division. International Union of Microbiological Societies. Springer Verlag, New York, 1995.
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE: Diagnóstico de laboratório da hepatite Viral in: Boletim Informativo del Programa Ampliado de Inmunización - ano XIX, nº 3, junho, 1997.
- RIZZETTO, M.; SCAVESE, M. G.; ARICO, S.; CRIVELI, O.; TREPO, C.; BONINO, F.; VERME, G. - Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (delta/anti-delta) associated to the hepatitis B virus in the liver and in serum of HBsAg carriers. **Gut.**, **18**: 997-1003, 1997.
- ROUQUARYOL, M. Z. - Epidemiologia e saúde, 4ª edição - MEDSI - Editora Médica e Científica Ltda., Rio de Janeiro, 1994.
- SAEZ-ALQUÉZAR, A., BASSIT, L., SABINO, E. C. Hepatites in: FERREIRA, A. W. & ÁVILA, S. L. M. - Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.



Agradecimentos:

Fundação Hemocentro de Brasília
Instituto de Saúde do Distrito Federal – ISDF
Instituto Oswaldo Cruz – IOC – FIOCRUZ
Fundação Nacional de Saúde – FNS
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas HEMOAM
Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual
de Campinas – UNICAMP
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
Editora da Universidade de Brasília – EDUNB

Agradecimento Especial:

Beatriz Mac Dowell Soares, José Antônio de Farias Vilaça e aos servidores da
Fundação Hemocentro de Brasília, pelo apoio incondicional para a execução
deste projeto.

Projeto Gráfico, arte-final e impressão:



(061) 347-4125



Ministério da Saúde
Secretaria de Políticas de Saúde
Coordenação Nacional de DST e Aids
Coordenação de Sangue e Hemoderivados

