

**Álvaro da Silva Ribeiro**

**CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO PARA CONTROLE DA  
QUALIDADE DE CONJUNTOS DE DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO  
DO ANTI - HIV**

**Programa de Pós - Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária  
Fundação Oswaldo Cruz  
2006**

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**  
**Programa de Pós - Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária**

**Álvaro da Silva Ribeiro**

**CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO PARA CONTROLE DA  
QUALIDADE DE CONJUNTOS DE DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO  
DO ANTI - HIV**

Orientação: Prof<sup>a</sup> . Helena Cristina Balthazar Guedes Borges

Laboratório de Sangue e Hemoderivados - INCQS - FIOCRUZ

Rio de Janeiro  
janeiro - 2006

**CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO PARA CONTROLE DA  
QUALIDADE DE CONJUNTOS DE DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO  
DO ANTI - HIV**

**Por**

**Álvaro da Silva Ribeiro**

Monografia apresentada à Coordenação do Programa de Pós - Graduação  
*Lato Sensu* em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde - INCQS / FIOCRUZ, como requisito parcial à obtenção  
do certificado de especialista em Controle da Qualidade de Produtos,  
Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Helena Cristina Balthazar Guedes Borges  
Laboratório de Sangue e Hemoderivados - INCQS - FIOCRUZ

Rio de Janeiro  
janeiro - 2006

**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**  
**Programa de Pós - Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária**

Esta Monografia de Pós - Graduação *Lato Sensu*, intitulada:

**CONFECÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO PARA CONTROLE DA  
QUALIDADE DE CONJUNTOS DE DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO  
DO ANTI - HIV,**

Apresentada por

Álvaro da Silva Ribeiro

Foi avaliada e aprovada, em \_\_/\_\_/2006, pela Banca Examinadora, da qual fizeram parte:

Prof.<sup>a</sup>. Helena Cristina B. G. Borges (Orientador) \_\_\_\_\_

INCQS - FIOCRUZ

Prof.<sup>a</sup>. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki \_\_\_\_\_

INCQS - FIOCRUZ

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Helena Pereira da Silva Zamith \_\_\_\_\_

INCQS - FIOCRUZ

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Célia Maria C. P. Romão (Suplente) \_\_\_\_\_

INCQS - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

janeiro - 2006

## Ficha Catalográfica

Ribeiro, Álvaro da Silva

Confecção de painel sorológico para controle da qualidade de conjuntos de diagnósticos para detecção do anti - HIV. / Álvaro da Silva Ribeiro. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2006.

xvi, 30p.; il,tab,enc.

Monografia (Lato Senu) em Vigilância Sanitária, Programa de Pós - Graduação *Lato Senu* em Vigilância Sanitária / INCQS, 2006. Orientador: Helena Cristina Balthazar Guedes Borges.

1. Controle de Qualidade. 2. HIV. 3. Validação. 4. Kits de diagnóstico

I. Título.

Agradeço a Deus por ter permitido e auxiliado durante todo trabalho e conclusão desta Monografia.

Aos meus Pais, que me deram a vida, amor e alegrias. Dedicaram a mim, e aos meus irmãos sua própria vida, seu tempo, seu amor e tudo mais, dedico este trabalho.

À **minha esposa, Jacqueline e minha filha Livia**, cuja existência em minha vida, além do amor, carinho, dedicação e **muita paciência**, me motivam buscar a melhor maneira de viver minha carreira.

*“Quando você interrompe suas metas no meio do caminho, você está atropelando seu destino e interrompendo a sua própria história”.*

*Décio Silva*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta empreitada. Embora a memória e a emoção cismem em me deixar na mão, me adianto em agradecer a todos que estiveram comigo antes e durante esta especialização.

- Obrigado Deus! Pelos meus pais, que realmente me souberam criar, mesmo diante de muitas dificuldades, me prepararam para a vida, com muito amor e dedicação; pelos meus irmãos, pela minha esposa e filha e pelos meus amigos.
- Helena Cristina, minha orientadora. Por acreditar e realmente ajudar muito na confecção desta monografia.
- Marisa Adati (Não estou puxando!!), pela sua capacidade de investir, de promover o crescimento profissional de **todos** os profissionais sob sua liderança. Por colocar no plano principal, aqueles que para muitos outros, apenas compõem o fundo do cenário. Valeu Marisa!!
- Helena Zamith. Esta me proporcionou a oportunidade de, pelo menos, tentar uma vaga no Mestrado também do ano de 2005. Mesmo sem conhecer profundamente o nosso trabalho no LSH (argumento usado pelos outros 07 aos quais solicitei que fosse meu orientador). Isto também é promover o crescimento das pessoas. Obrigado Helena!!
- Valéria, Jorge Possas, Danielle, Eduardo, Vanderlei, Margaret, Fatinha, Jorge Mesquita, Carlos Renato, Deuse, Roberto, Rodrigo, Helena. Enfim, esta peãozada maluca (eu estou na meiúca também) que não foge da raia, rala feito "cachorro doido" e ainda torna o trabalho divertido. Galera, Valeu!!!
- A Coordenação do Programa de Pós - Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária do INCQS pela oportunidade de ingressar neste curso de especialização.

- Neide, Célia Romão e Eugênio, pensaram que me esqueceria?  
Que nada! Obrigado mesmo! Eugênio, não esqueça: 09/01/06 às  
15:00 horas. Reza por mim e ótimas férias!!! Valeu, pessoal!!!!

## RESUMO

O controle de qualidade dos conjuntos para detecção do anti-HIV-1/2 tanto os testes de triagem quanto os testes confirmatórios, é de essencial importância, já que são utilizados em Serviços de Hemoterapia, com a finalidade de qualificar ou excluir uma possível doação de sangue. Desta forma, devem possuir sensibilidade e especificidades adequadas, evitando a ocorrência de resultados falso-negativos, devido ao risco sanitário ou falso-positivos por conta do prejuízo social e emocional causado ao doador. Este trabalho buscou caracterizar unidades de plasma para compor um painel de referência para HIV a ser utilizado na avaliação da qualidade dos conjuntos para diagnóstico do anti-HIV-1/2 e, conseqüentemente, aumentar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados do Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde – INCQS. A fim de atender o objetivo proposto analisamos no período de abril de 1996 a setembro de 1997, 561 unidades de plasma provenientes dos Serviços de Hemoterapia localizados nas regiões sudeste e nordeste. Tal amostragem foi analisada para anti-HTLV-I/II, anti-HCV, HBsAg, anti-HBc, Doença de Chagas, Sífilis e inicialmente 02 testes para anti-HIV-1/2. As unidades de plasma que obtiveram resultados positivos exclusivamente para anti-HIV-1/2 foram submetidos a qualificação sorológica adicional, a fim de conferir padronização e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Nesta fase, foram utilizados outros 06 testes para triagem sorológica do anti-HIV-1/2 com metodologias e/ou composição antigênicas diferentes e 02 testes confirmatórios. Das 561 unidades de plasma recebidas, apenas 41 apresentaram resultados verdadeiramente positivos, padronizados, lineares e reprodutíveis para anti-HIV-1/2, e desta forma ampliar o painel sorológico anti-HIV-1/2 e conseqüentemente a capacidade analítica do laboratório.

## ABSTRACT

The quality control of the anti-HIV-1/2 detection kits for the selection tests and confirming tests is of considerable importance because these tests are used in Hemotherapy Services to see if the blood is contaminated or not with HIV virus. Therefore, they must have appropriate sensibility and specificity, avoiding results false-negatives, due to sanitary risks, or false-positives to bring about social and emotional damages to the donor. This work tried to characterize the plasma unities to compose a reference panel for HIV to be used in the quality evaluation to diagnostic tests of HIV and consequently raise the analytic capacity of Blood and Plasma Derivatives Laboratory that belongs Immunology Department of National Institute of Quality Control in Health – INCQS. With intention to attend the goal, we analyzed, from April 1996 to September 1997, 561 plasma unities originated from Hemotherapy Services in the Northeast and southeast regions. This sample was analyzed anti-HTLV-I/II, anti-HCV, HBsAg, anti-HBc, Doença de Chagas, Sífilis and initially two tests for anti-HIV-1/2. The plasma unities with positive results exclusive to anti-HIV-I/II were submitted to additional serological qualifications to establish the standardization and reproducibility of the results. In this phase were used other 6 selection tests of anti-HIV-1/2 with different methodologies and/or antigenic composition and 2 confirming tests. Of 561 plasma unities received, only 41 presented truly positive result, slandered, linearity and reproducibility to anti-HIV-1/2 and thereby broaden the serological panel anti-HIV-1/2 and consequently the lab analytical capacity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1.  | Morfologia do vírus HIV.....   | 2  |
| Figura 2.  | Curso da infecção pelo HIV na ausência de terapia anti-retroviral.....                             | 4  |
| Figura 3.  | Obtenção das unidades de plasma.....   | 12 |
| Figura 4.  | Modelo de cadastro das amostras de plasma no LSH .....   | 13 |
| Figura 5.  | Processamento das unidades de plasma.....  | 14 |
| Quadro 1.  | Conjuntos de diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica para anti HIV-1/2.         | 16 |
| Figura 6.  | Algoritmo realizado para caracterização das unidades de plasmas enviadas ao LSH.....               | 17 |
| Quadro 2.  | Critérios de interpretação das bandas identificadas no Western Blot.                               | 19 |
| Figura 7.  | Distribuição das unidades de plasma recebidas de acordo com a sorologia indicada na rotulagem..... | 20 |
| Figura 8.  | Distribuição dos resultados sorológicos.....   | 21 |
| Figura 9.  | Média dos valores individuais de racio dos ensaios imunoenzimáticos para HIV- 1/2.....             | 22 |
| Figura 10. | Distribuição da freqüência de aparecimento das bandas na técnica de Western Blot.....              | 23 |

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Distribuição dos resultados da sorologia..... 21

## SUMÁRIO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO.....   | 1  |
| 1.1.   | Histórico.....  | 1  |
| 1.2.   | Epidemiologia da doença.....                                      | 2  |
| 1.3.   | O vírus.....  | 2  |
| 1.4.   | Formas de transmissão.....  | 3  |
| 1.5.   | Infecção pelo HIV.....  | 3  |
| 1.6.   | Diagnóstico sorológico do HIV.....                                | 4  |
| 1.6.1. | Teste de triagem.....   | 5  |
| 1.6.2. | Testes confirmatórios.....  | 6  |
| 1.7.   | Outros testes.....  | 7  |
| 1.7.1. | Pesquisa de antígenos.....  | 7  |
| 1.7.2. | Detecção do vírus HIV.....  | 7  |
| 1.8.   | Evolução dos testes para HIV.....                                 | 7  |
| 1.9.   | Controle de Qualidade.....  | 8  |
| 1.9.1. | Conceitos.....  | 8  |
| 1.9.2. | Testes Sorológicos.....   | 9  |
| 2.0.   | OBJETIVOS.....  | 11 |
| 3.0.   | METODOLOGIA.....  | 12 |
| 3.1.   | As unidades de plasmas.....                                       | 12 |
| 3.2.   | Recebimento, Cadastro e Identificação das Unidades de Plasma..... | 13 |
| 3.3.   | Processamento das Unidades de Plasma.....                         | 13 |
| 3.4.   | Caracterização das Unidades de Plasma.....                        | 14 |
| 3.5.   | Testes Sorológicos empregados na caracterização do painel.....    | 17 |
| 3.5.1. | Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....                               | 17 |
| 3.5.2. | Quimioluminescência.....  | 18 |
| 3.5.3. | Teste Rápido e Aglutinação.....                                   | 18 |
| 3.5.4. | Western Blot (WB).....  | 18 |
| 3.5.5. | Imunofluorescência Indireta (IFI).....                            | 19 |
| 4.0.   | RESULTADOS.....   | 20 |
| 4.1.   | Das Unidades de Plasma Recebidas.....                             | 20 |
| 4.2.   | Dos Resultados Sorológicos Obtidos.....                           | 21 |

|      |                   |    |
|------|-------------------|----|
| 5.0. | DISCUSSÃO.....    | 24 |
| 6.0. | CONCLUSÃO.....    | 26 |
| 7.0. | PERSPECTIVAS..... | 27 |
| 8.0. | BIBLIOGRAFIA..... | 28 |



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 – Histórico

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi descrita e reconhecida oficialmente em 1981, nos Estados Unidos, a partir da identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais que apresentaram sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e comprometimento do sistema imune, o que levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível (ABBAS, 2000; Ministério da Saúde, 2004).

Somente em 1983, o vírus da imunodeficiência humana foi isolado pela primeira vez, na França, pelo grupo liderado por Luc Montaigner onde recebeu a denominação de LAV (Vírus Associado à Linfadenopatia) por ter sido obtido de paciente com quadro de linfadenopatia crônica. Neste mesmo período, a identificação desse novo vírus foi confirmada nos Estados Unidos pelo Dr. Robert Gallo, que o denominou de *Human T Lymphotropic Virus type III* (HTLV-III) em função de sua morfologia e tropismo por linhagens celulares de células T CD4+. A partir de 1987, conforme proposta do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, recebeu a denominação de Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV (Choi & Goldani, 2006; Brasil, 1997).

Em 1985, são liberados os primeiros testes diagnósticos, baseados na detecção de anticorpos anti-HIV, estabelecendo o ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) para HIV-1 como a primeira ferramenta de triagem diagnóstica. A sua implantação ocorreu, primeiramente, nos Serviços de Hemoterapia e, posteriormente, como método diagnóstico para os indivíduos de risco para a infecção pelo HIV-1 (Aldovini & Walker, 1990).

Em 1986 foi isolado na África Ocidental um segundo vírus com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2, mas com algumas glicoproteínas do envelope diferentes o suficiente para não ser detectado pelos testes da época, os quais logo foram substituídos por técnicas que permitiam revelar os dois tipos de vírus (Cassele & Duarte, 2006; Ministério da Saúde, 2004).

No Brasil, o primeiro caso de isolamento e identificação do HIV aconteceu somente em 1987, na Fundação Oswaldo Cruz, pela equipe coordenada pelo professor Galvão Castro, a partir de um caso de AIDS adquirida por transfusão

sangüínea (Galvão-Castro, 1987).

## 1.2 – Epidemiologia da Doença

Dados recentes do Relatório Mundial UNAIDS/OMS revelaram que apesar da redução da taxa de infecção em alguns países, o número de pessoas vivendo com HIV continua a crescer em todas as regiões do mundo, exceto no Caribe.

O número de casos atingiu seu maior nível em 2005 com cerca de 40,3 milhões de pessoas infectadas. Mais de três milhões de pessoas morreram de doença relacionada à AIDS em 2005, dessas, 500.000 eram crianças (OMS, 2005).

No Brasil, no período de janeiro 1980 a junho de 2005 foram registrados 371.827 casos da doença, com maior concentração na região Sudeste (234.736 casos) seguida das regiões Sul (67.006), Nordeste (38.837), Centro-Oeste (21.009) e Norte com 10.149 de casos (Brasil, 2005).

## 1.3 - O vírus

O HIV pertence à família *Retroviridae* e possui uma enzima denominada transcriptase reversa, que é capaz de sintetizar, a partir do ácido ribonucléico (RNA) viral, um ácido desoxirribonucléico (DNA). Por ocasião da multiplicação viral, o DNA sintetizado pode se incorporar ao material genético celular e ser transmitido às células filhas (Constantine, 1991) (Figura 1).

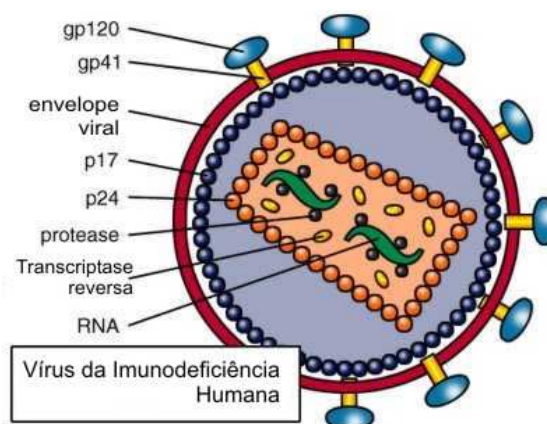


Figura 1. Morfologia do vírus HIV

O HIV-1 pode ser dividido em 3 grupos (variantes genômicas) determinados através da técnica de seqüenciamento e genotipagem do vírus HIV: M (major), O

(outlier) e N (new). O grupo M é o mais encontrado no mundo e evoluiu geneticamente para formar os subtipos que vão de A ao J. No Brasil há predominância do subtipo B (80% das infecções), seguidos dos subtipos F e C (Choi & Goldani, 2006; Cassele & Duarte, 2006).

O subtipo B do HIV-1 é responsável pela quase totalidade das infecções nos Estados Unidos da América e na Europa. No que diz respeito ao HIV-2, são pouco freqüentes os registros de infecção no país, sendo restrito à África Subsaariana, onde foram identificados cinco subtipos de A ao E (Ministério da Saúde, 2004).

O HIV-1 no Brasil tem se mostrado mais virulento e com período médio de incubação menos prolongado do que o HIV-2. Entretanto, ambos apresentam semelhança genética de aproximadamente 40 a 45%, o que justifica a possível reação cruzada nos testes sorológicos (Cassele & Duarte, 2006).

#### **1.4 - Formas de Transmissão**

As principais formas de transmissão do HIV 1/2 são: sexual, sangüínea (em receptores de sangue ou hemocomponentes não testados e em usuários de drogas injetáveis) e pré-natal (transmissão da mãe para o filho durante a gestação, parto ou por aleitamento materno). Além destas formas mais freqüentes, pode ocorrer em menor escala a transmissão ocupacional (ocasionada por acidente de trabalho), em profissionais da área da saúde que sofrem ferimentos com instrumentos pérfuro-cortantes contaminados com sangue de pacientes infectados pelo HIV.

#### **1.5 - Infecção pelo HIV**

A infecção pelo HIV pode ser dividida em quatro fases clínicas: infecção aguda, fase assintomática, também conhecida como latência clínica, fase sintomática inicial ou precoce e AIDS. A infecção aguda ocorre em cerca de 50% a 90% dos casos. O tempo entre a exposição e a manifestação dos sintomas varia de 5 a 30 dias e duram, em média, 14 dias. Após a resolução da fase aguda, ocorre a viremia que se estabiliza em níveis variáveis, definido pela velocidade da replicação e depuração viral. Na fase assintomática, são poucas ou inexistentes as alterações no estado geral. Na fase sintomática inicial, podem surgir sinais e sintomas inespecíficos, de intensidade variável e processos oportunistas de pouca gravidade, principalmente em pele e mucosas.

Logo após haver a interação vírus-hospedeiro, na fase mais precoce da infecção, o sistema imunológico apresenta capacidade de resposta imune satisfatória tanto por meio de resposta humoral (anticorpos anti-HIV) como celular (respostas das células T citotóxicas).

Anticorpos contra o HIV aparecem principalmente no soro ou plasma de indivíduos infectados, em média, 3 a 12 semanas após a infecção. O período compreendido entre o início da doença e o aparecimento dos anticorpos é denominado de janela imunológica. Durante este período os níveis de anticorpos anti-HIV são muito baixos e não detectáveis pelos testes disponíveis (Figura 2). Após a soroconversão os anticorpos atingem níveis detectáveis e persistem durante toda a vida (Cassele & Duarte, 2006; Choi & Goldani, 2006).

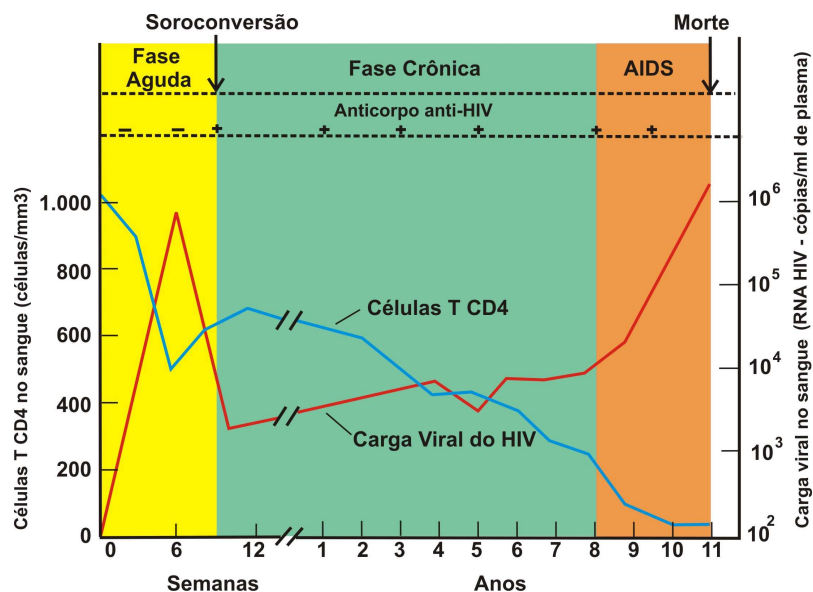


Figura 2. Curso da infecção pelo HIV na ausência de terapia anti-retroviral.

### 1.6 – Diagnóstico Sorológico do HIV

A detecção de anticorpos tem sido a principal ferramenta utilizada no diagnóstico da infecção pelo vírus HIV e na triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia.

O Ministério da Saúde, de acordo com a Portaria nº 59/03 preconiza a realização de um teste imunoenzimático – ELISA - para diagnóstico sorológico do HIV em laboratórios clínicos.

No que diz respeito aos Serviços de Hemoterapia, a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 153/04 torna obrigatória a realização de dois (02) testes para

liberação de bolsas de sangue e hemocomponentes, ou seja, “ um dos testes deve ser imunoenzimático e o segundo poderá ser por quimioluminescência ou por outra técnica com princípio metodológico ou antigênico distinto do primeiro”.

Unidades de plasma reativas nos ensaios de triagem devem ter seu resultado confirmado através da realização de testes confirmatórios (Brasil, 2003).

### **1.6.1 – Testes de Triagem**

O ELISA é o ensaio mais freqüentemente empregado na detecção de antígenos e/ou anticorpos anti-HIV, sendo o teste de escolha na triagem de doadores por sua facilidade de automação, custo relativamente baixo e elevada sensibilidade e especificidade. Emprega antígenos ou anticorpos ligados à fase sólida, que podem ser detectados por um antígeno ou anticorpo complementar marcado com uma enzima, capaz de reagir com um substrato cromogênico. A presença de antígenos ou anticorpos pode ser detectada pelo desenvolvimento de um produto final colorido, cuja intensidade é medida por espectrofotômetro com comprimento de onda indicado pelo fabricante do conjunto de diagnóstico empregado (geralmente de 450 ou 492 nm, com um segundo comprimento que pode ser de 620 a 655 nm). A intensidade da coloração é diretamente proporcional à presença de antígenos/anticorpos na amostra (Constantine, 1991).

Inclui-se ainda aos testes de triagem, o ensaio de quimioluminescência, com o mesmo princípio metodológico do ELISA, entretanto a reação é evidenciada pela ação de um reagente capaz de emitir fluorescência, medida por equipamento específico.

Além dos testes sorológicos de triagem convencionais empregados no diagnóstico da infecção pelo HIV, foram desenvolvidos os chamados “testes rápidos”, cuja reação é evidenciada em cerca de trinta (30) minutos. São denominados imunocromatográficos, e empregam geralmente antígenos virais fixados a um suporte sólido, como membranas de celulose ou *nylon*, látex, micropartículas ou cartelas plásticas. São de simples execução e possuem sensibilidade comparável aos testes ELISA.

Dentro do contexto de metodologias aplicáveis a triagem sorológica, inclui-se ainda o ensaio de aglutinação (teste simples). Este se caracteriza pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos em sua superfície. A

aglutinação pode ocorrer tanto com partículas que apresentam determinantes antigênicos naturais em sua superfície (hemácias, bactérias, protozoários, etc) como partículas inertes (látex, poliestireno, etc.), ou mesmo com células antigenicamente não relacionadas (hemácias, bactérias) às quais adsorvem ou se fixam antígenos solúveis.

Testes rápidos e simples possuem sistema de leitura visual, o que dispensa o uso de equipamento laboratorial, facilitando sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos e em laboratórios de pequeno porte. Entretanto, por se tratar de leitura visual, deverá ser executado por técnico habilitado (Aldovini & Walker, 1990).

### **1.6.2 – Testes Confirmatórios**

No que diz respeito aos testes confirmatórios, o Western-Blot (WB) é considerado “padrão ouro” para confirmação do resultado reativo obtido na etapa de triagem. Tem alta especificidade e sensibilidade, mas seu custo é elevado. O antígeno viral é fracionado através da técnica de eletroforese em um gel de poliacrilamida com sulfato de duodecil sódio (SDS PAGE) de acordo com o peso molecular. Em seguida, os antígenos assim separados são transferidos para uma membrana, geralmente de nitrocelulose. A partir desta fase, o teste segue o mesmo princípio do ELISA, entretanto a detecção da sua reação é realizada por cromatografia, nas próprias tiras de nitrocelulose. Na técnica de WB, existe a possibilidade de se revelar à presença de anticorpos contra nove (9) proteínas do HIV: gp160, gp120, gp41, p66, p51, p31, p55, p24, p17. As três primeiras proteínas são codificadas pelo gene *env*, as três seguintes, pelo gene *pol* e as restantes, pelo gene *gag*.

A Imunofluorescência Indireta (IFI), empregada também como teste confirmatório, utiliza antígenos padronizados fixados a lâminas de vidro. A amostra de soro ou plasma é diluída, colocada sobre o antígeno e incubada para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Após lavagens, a preparação é incubada com o conjugado fluorescente e, se houver anticorpo no soro/plasma, o conjugado (fluoresceína ligada a anti-imunoglobulina) reage com o anticorpo específico para o antígeno. A reação é evidenciada através de microscópio de fluorescência (Aldovini & Walker, 1990; Constantine, 1991).

## **1.7 – Outros Testes**

### **1.7.1 - Pesquisa de Antígenos**

Os testes que pesquisam antígenos o antígeno p24 possuem indicação no diagnóstico laboratorial precoce de infecções pelo HIV, na fase anterior à conversão sorológica e no diagnóstico da infecção pelo HIV no recém-nascido de mãe soropositiva (Aldovini & Walker, 1990).

### **1.7.2 - Detecção do Vírus HIV**

Testes de detecção do vírus, ou de suas partículas, são mais complexos e de custo elevado e por isso restritos a ensaios clínicos e pesquisas. Algumas metodologias são empregadas na rotina de tratamento e acompanhamento do doente e não para o diagnóstico. Dentre estas, estão os testes de amplificação do genoma do vírus (carga viral): análise quantitativa da carga viral por técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos. Têm alta sensibilidade, permitindo o acompanhamento da resposta à terapêutica anti-retroviral, contagem de TCD4+ em sangue periférico: a contagem de células TCD4+ em sangue periférico mede a imunocompetência celular; é útil no acompanhamento de soropositivos (Aldovini & Walker, 1990).

## **1.8 – Evolução dos Testes para HIV**

Desde sua introdução em 1985, os testes de triagem e confirmatórios empregados no diagnóstico sorológico do HIV estão em constante evolução tecnológica. A busca por testes mais sensíveis e específicos levou ao desenvolvimento de ensaios de diferentes gerações, classificados de acordo com antígeno empregado. São denominados de testes de 1ª geração aqueles obtidos por lise viral a partir de cultivo do vírus em linfócitos humanos. Testes de 2ª geração empregam proteínas recombinantes, obtidas a partir da inserção de um fragmento do genoma viral em um veículo biológico (bactérias, leveduras ou linhagens celulares) resultando em um produto gênico (antígeno -Ag) pelo veículo modificado. Ensaios de 3ª geração empregam peptídeos sintéticos, obtidos após a determinação da seqüência de aminoácidos de um antígeno, a mesma pode ser construída a

partir de um pool de aminoácidos livres, usando um sintetizador de peptídeos. Os testes de 4ª geração (combinados), compreendem combinações de antígenos e de anticorpos das diferentes gerações (Choi & Goldani, 2006).

## **1.9 – Controle da Qualidade**

Para ilustrar o controle de qualidade dos testes para diagnóstico do HIV é fundamental definir alguns conceitos.

### **1.9.1 - Conceitos**

**Análise prévia** - a efetuada em determinados produtos sob o regime de vigilância sanitária, a fim de ser verificado se os mesmos podem ser objeto de registro.

**Análise fiscal** - a efetuada sobre os produtos submetidos ao sistema instituído pela legislação, em caráter de rotina, para a apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual.

**Análise controle** - é a análise efetuada em produtos sob o regime de vigilância sanitária, após sua entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro.

**Anticorpos** - produzido pelo sistema imune em resposta a um agente externo que pode ser vírus ou bactéria.

**Antígenos** - é a parte do vírus ou bactéria que o sistema imune reconhece como ser estranho.

**Assintomático** - indivíduo infectado pelo HIV, contudo, não apresenta sinais ou sintomas referentes à doença.

**Especificidade Clínica ou Diagnóstica** - Incidência de resultados verdadeiramente negativos, obtidos quando o teste é aplicado em indivíduo sabidamente não portadores da doença em estudo.

**Falso Negativo (FN)** - ensaio com resultado negativo obtido de amostra de indivíduo



infectado.

**Falso Positivo (FP)** - ensaio com resultado positivo obtido de amostra de indivíduo não infectado.

**Janela imunológica** - o tempo entre a infecção pelo HIV e a produção de anticorpos suficientes para positivar um teste sorológico de detecção de anticorpos do HIV.

**Ponto de corte (“cut off”- CO)** - corresponde à média das leituras dos resultados negativos mais dois ou três desvios padrão.

**Sensibilidade Clínica ou Diagnóstica** - Incidência de resultados verdadeiramente positivos, obtidos quando um teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em estudo.

**Serviço de Hemoterapia** - entidade com a finalidade de prestar assistência e apoio hemoterápico e/ou hematológico à rede de serviços de saúde.

**Verdadeiro Positivo (VP)** - ensaios sucessivos com resultados positivos obtido de uma amostra de indivíduo infectado.

**Verdadeiro Negativo (VN)** - ensaios sucessivos com resultados negativos obtido de uma amostra de indivíduo não infectado.

**Testes Confirmatórios** - quando um teste suplementar é utilizado para confirmar um diagnóstico inicial positivo para a infecção do HIV.

**Western Blot** - teste suplementar usado na confirmação do diagnóstico do HIV.

### 1.9.2. Testes Sorológicos

Testes que detectam antígenos ou anticorpos anti-HIV1/2 devem possuir alta sensibilidade (100%) e especificidade (> ou = a 99,5%) a fim de impedir a ocorrência resultados falso-negativos e falso-positivos, respectivamente. Resultados falso-negativos acarretam risco sanitário, constituindo agravo à saúde. Resultados falso-

positivos expressam prejuízo social ao doador.

A sensibilidade analítica é avaliada pela incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente portadores da doença em questão. A especificidade analítica é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos sabidamente não reagentes para a doença em questão. (Constantine, 1991).

Em resumo, a segurança e confiabilidade dos testes para diagnóstico sorológico do HIV dependem, entre outros parâmetros, da sua sensibilidade e especificidade.

A diversidade dos conjuntos para diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica do HIV, e sua variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade, justificam a importância do controle da qualidade desses produtos.

O monitoramento efetivo dos conjuntos para diagnóstico de uso "in vitro" para a detecção de anti-HIV, encontra-se regulamentado por força de legislação sanitária tornando obrigatória a avaliação da sua qualidade antes do mesmo ser disponibilizado no mercado através da Portaria nº 8/96/SVS/MS (Brasil, 1996).

A necessidade de efetivar sistemas que garantam a qualidade de produtos e serviços ligados à saúde vem sendo uma preocupação constante do setor terapêutico. Garantir a qualidade de insumos utilizados na qualificação do sangue e seus componentes implica na confiabilidade do diagnóstico e conseqüentemente na segurança do sangue utilizado no país.

Neste contexto, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (LSH/INCQS), em atendimento à demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS, vem analisando sistematicamente conjuntos de diagnóstico através de análise prévia, fiscal e de controle, quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade diagnóstica, empregando painéis sorológicos específicos.

## 2- OBJETIVOS

Diante do conjunto de dados que ilustram a importância do controle da qualidade de reagentes para o diagnóstico sorológico do HIV, os objetivos do nosso trabalho foram:

- Caracterizar unidades de plasma para compor painel de referência a ser empregado na avaliação de conjuntos diagnósticos utilizados na triagem e no diagnóstico laboratorial do HIV.
- Implementar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH/INCQS), no controle da qualidade dos conjuntos de diagnóstico para a detecção do anti-HIV, em suas diferentes metodologias.
- Atender a demanda gerada pela Unidade de Produtos para Diagnóstico de Uso "in vitro" da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS), da Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CNDST e AIDS) e Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) entre outros, no contexto das análises prévias, fiscais e de controle conforme preconizado na Lei nº 6360/77.

### 3 - METODOLOGIA

#### 3.1 – As Unidades de Plasma

A confecção do painel anti-HIV deu-se a partir da obtenção de unidades de plasma provenientes de Serviços de Hemoterapia das regiões do país.

Através de solicitação formal, no período de abril de 1996 a setembro de 1997, Serviços de Hemoterapia foram contatados para envio de unidades de plasma que após realização dos testes de triagem sorológica, preconizados pela RDC nº 153/04, apresentaram resultado reagente para uma ou mais das patologias testadas (HIV1/2, HTLV I/II, Hepatite B – (anticorpos contra o antígeno *core* do vírus B da Hepatite -anti-HBc - e antígeno de superfície do vírus B da Hepatite - HBsAg), Hepatite C- (anticorpos contra o vírus C da Hepatite - anti- HCV), Doença de Chagas e Sífilis) e portanto são consideradas impróprias para o uso terapêutico, segundo critérios estabelecidos na legislação vigente. As unidades de plasma foram obtidas a partir do fracionamento do sangue total de doadores, colhido com anticoagulante CPDA – 1 (Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina) (Figura 3).

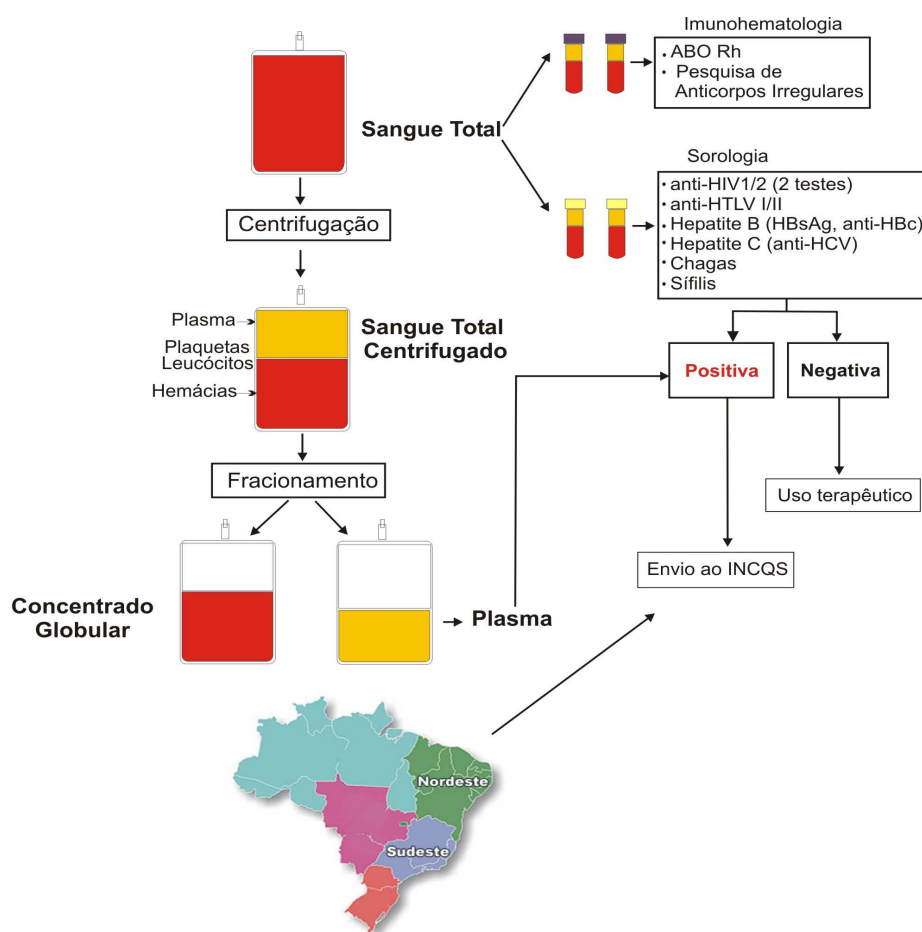


Figura 3. Obtenção das unidades de plasma

### 3.2 - Recebimento, Cadastro e Identificação das Unidades de Plasma.

As unidades de plasma foram encaminhadas ao LSH congeladas, acondicionadas em caixas de isopor e acompanhadas de documentação pertinente, constando volume aproximado de plasma e resultados de sorologia, quando aplicável. No ato do recebimento, foram cadastradas em caderno ata de acordo com o preconizado no POP número 65.3420.013, contendo as seguintes informações: iniciais do nome do doador, código alfa numérico, fabricante da bolsa, Serviço de Hemoterapia que encaminhou a unidade, data de coleta e o resultado sorológico. Finalizado o cadastro, as unidades receberam identificação alfanumérica própria do LSH (Figura 4).

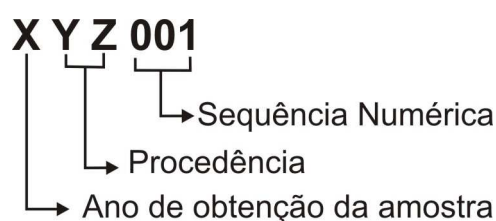


Figura 4. Modelo de Cadastro das unidades de plasma no LSH

### 3.3 - Processamento das Unidades de Plasma

Somente as unidades de plasma com volume aproximado ou superior a 200 mL foram selecionadas para processamento. As unidades foram descongeladas à temperatura ambiente e seu conteúdo filtrado, individualmente, em gaze hidrófila (09 fios/cm<sup>2</sup>, 05 dobras – 08 camadas) para eliminação da fibrina. As unidades de plasma fracionadas não receberam nenhum tipo de solução conservante. Após filtração, as unidades foram distribuídas e estocadas da seguinte forma: (Figura 5).

- aproximadamente 100 mL em garrafas Nalgene™ com capacidade para 250 mL estocados à temperatura igual ou inferior a -20°C;
- 40 mL em dois tubos Falcon™ com capacidade para 50 mL cada estocados à temperatura igual ou inferior -20°C e;
- 20 mL distribuídos em 10 criotubos com volume aproximado de 2 mL cada. Um total de 9 criotubos foram estocados à temperatura igual ou inferior a -20°C e 1 criotubo estocado a 4°C (± 2°C), este último, utilizado para realização dos testes sorológicos.

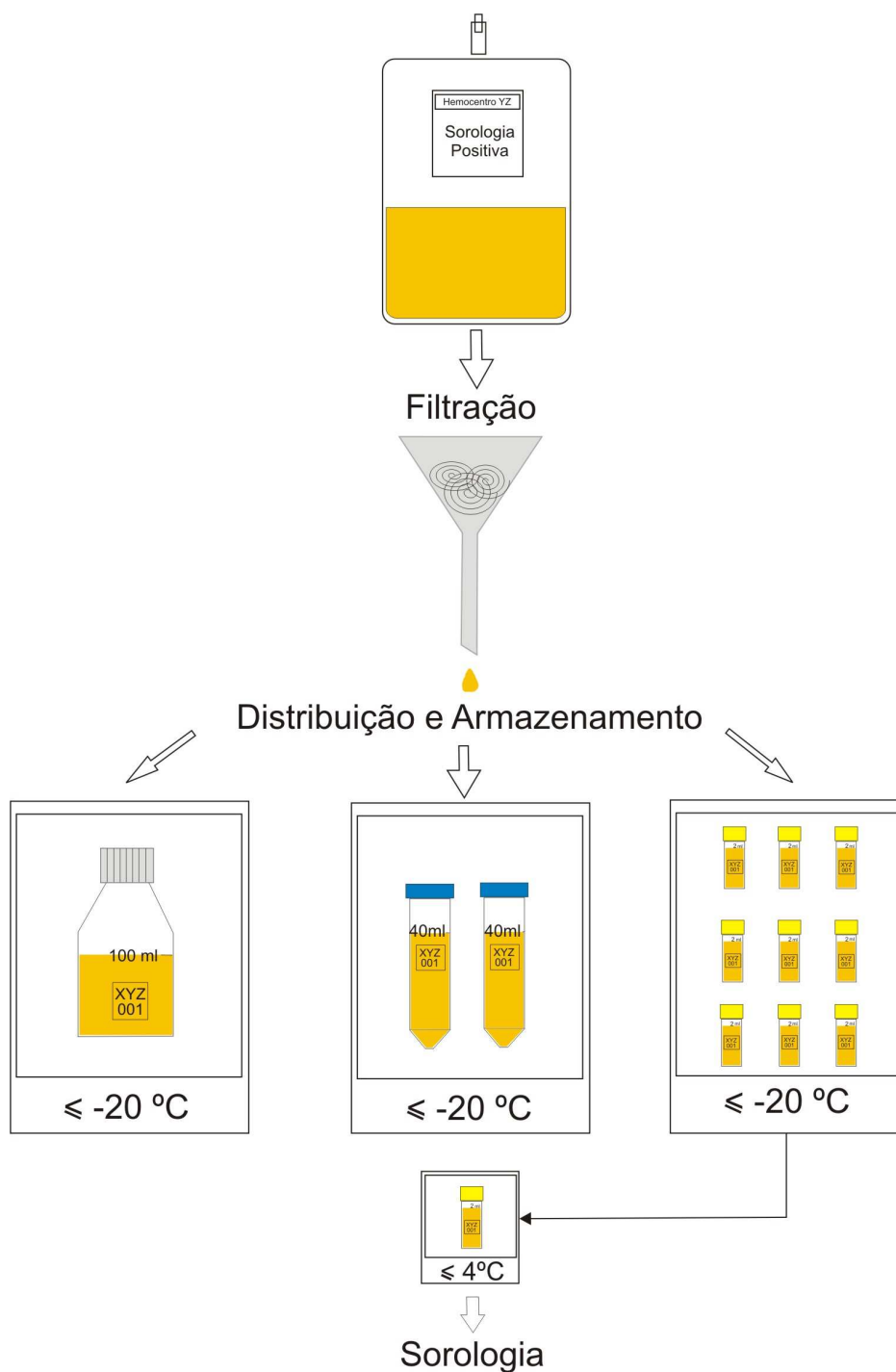


Figura 5. Processamento das unidades de plasma

### 3. 4 - Caracterização das Unidades de Plasma

A caracterização das unidades de plasma fracionadas foi realizada seguindo-se rigorosamente a legislação vigente aplicável à triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia. As unidades de plasma foram testadas frente a diferentes patologias: HIV1/2, HTLV-I/II, Hepatite B, Hepatite C, Doença de Chagas e Sífilis.

Foram realizados, em cumprimento a RDC nº 153/04 os testes abaixo discriminados:

- 02(dois) ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com princípios metodológicos ou antigênicos distintos denominados de ELISA I e ELISA II para anti-HIV
- 01(um) teste imunoenzimático - ELISA para detecção de anticorpos anti-HTLVII, anti-HBc, anti-HCV, anti-*T.cruzi* (Chagas);
- 01(um) ELISA para detecção do HBsAg e;
- 01 (um) teste não treponêmico (VDRL - Venereal Disease Research Laboratory) para Sífilis.

As unidades de plasma reativas nos testes ELISA I e II foram avaliadas frente a outras metodologias objetivando melhor caracterização do painel HIV. Para tal foram realizados:

- 02 (dois) ELISAs (III e IV - empregando antígenos diferentes dos utilizados na triagem inicial das unidades;
- 01 (um) ensaio de quimioluminescência (V);
- 02 (dois) testes imunocromatográficos (testes rápidos) número VI e VII e;
- 01 (um) ensaio de aglutinação de partículas (VIII), sumarizados no Quadro 1.

A presença de anticorpos dirigidos a proteínas diversas do HIV-1/2 foi confirmada através da utilização da técnica de Western Blot (IX), considerada padrão ouro. Além do WB, também foi empregada a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) na confirmação da reatividade para anti-HIV-1, utilizando-se células KE-37-03, comercialmente disponíveis (X).

Os testes realizados seguiram rigorosamente as instruções de uso do fabricante. Todos os conjuntos de diagnóstico utilizados possuem registro na ANVISA/MS.

Quadro 1. Conjuntos de diagnóstico empregados nos testes de triagem e confirmação sorológica do HIV1/2.

|                       | Teste | Metodologia                 | Princípio metodológico | Sensibilização (antígeno)  |
|-----------------------|-------|-----------------------------|------------------------|--|
| Testes de Triagem     | I     | ELISA                       | Indireto               | Peptídeo Sintético (gp41, gp120 e gp36).   |
|                       | II    | ELISA                       | Indireto               | Antígenos recombinantes de HIV ½ e Peptídeo Sintético  |
|                       | III   | ELISA                       | Indireto               | Mistura de ag do HIV: p24, gp160, peptídeo ANT70 de HIV-1 peptídeo env (aminoácidos 592-603) HIV-2.            |
|                       | IV    | ELISA                       | Sanduíche              | Mistura de ag do HIV: gp160, peptídeo ANT70 de HIV-1 e peptídeo env (aminoácidos 592-603) de HIV-2 e anti-p24. |
|                       | V     | Quimioluminescência         | Indireto               | Antígenos recombinantes (env e core de HIV-1 e env HIV-2)  |
|                       | VI    | Teste Rápido                | Indireto               | Antígenos recombinantes (p24 e gp41 de HIV-1 e p24 e gp36 de HIV-2).   |
|                       | VII   | Teste Rápido                | Indireto               | Antígenos recombinantes de HIV ½ e Peptídeo Sintético  |
| Testes Confirmatórios | VIII  | Aglutinação                 | Indireta               | Lisado viral   |
|                       | IX    | Western Blot                | Indireto               | gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p39,p31, p24,p17 peptídeo sintético do env do HIV-2                         |
|                       | X     | Imunofluorescência Indireta | Indireto               | Células K 37-3 infectadas pelo HIV-1   |

ELISA: Ensaio Imunoenzimático; env: envelope; gp: glicoproteína, ag:antígeno

O algoritmo preconizado para caracterização das unidades de plasma nas suas diferentes etapas de triagem e confirmação sorológica está representado na Figura 6.



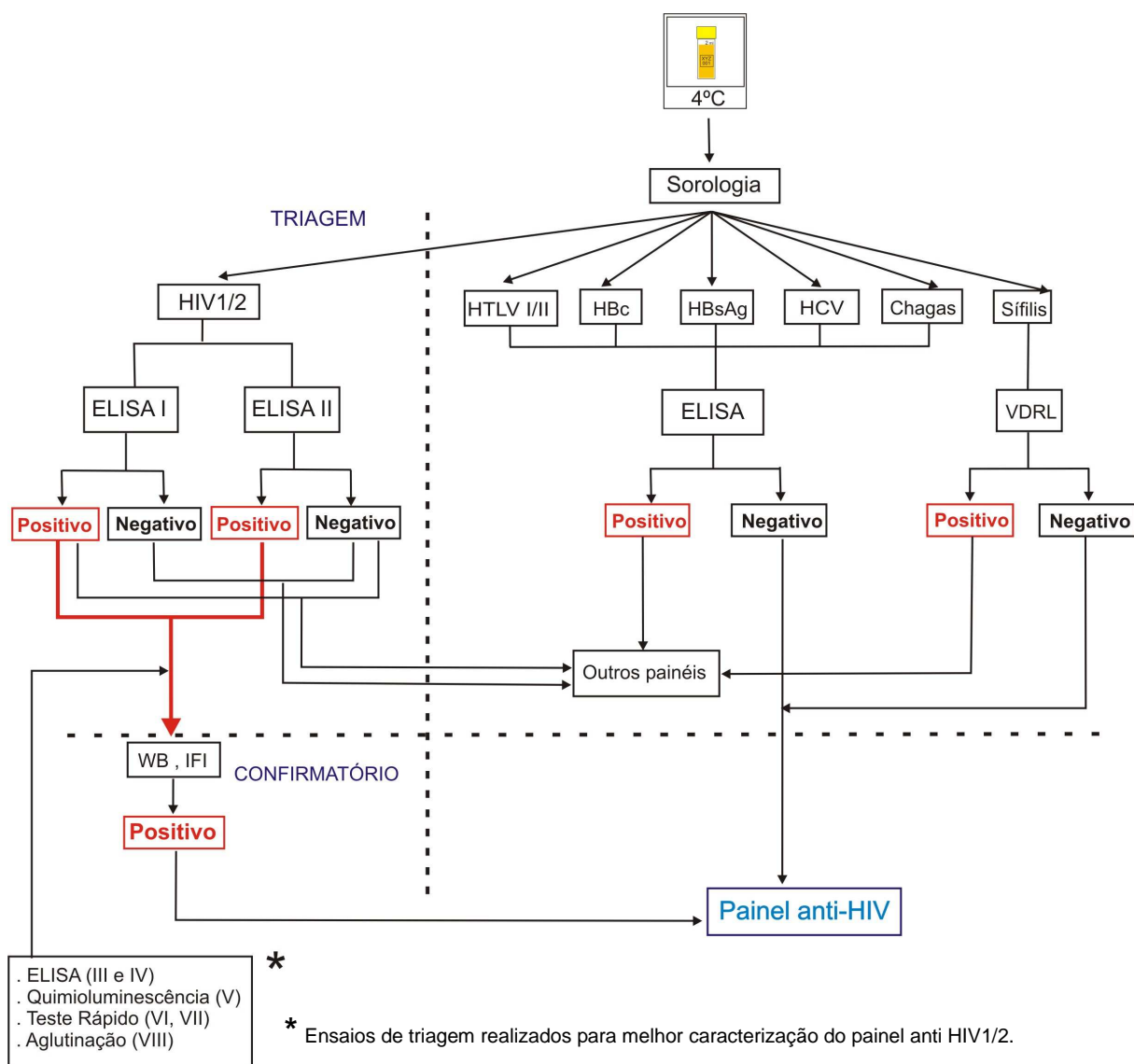


Figura 6. Algoritmo realizado para caracterização das unidades de plasma enviadas ao LSH.

### 3.5– Testes Sorológicos Empregados na Caracterização do Painel

#### 3.5.1 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Conforme o procedimento adotado no LSH a interpretação dos testes ELISA, empregados na caracterização das unidades de plasma para as diferentes patologias, foi realizada respeitando-se e seguindo-se rigorosamente os critérios estabelecidos pelos fabricantes, para validação do ensaio e cálculo do ponto de corte (cut-off).

Para homogeneização de resultados obtidos nos diferentes ensaios imunoenzimáticos, a positividade foi determinada pela razão dos valores de

densidade ótica (D.O.) entre os plasmas avaliados e o “cut-off” (ponto de corte) denominado de Racio.

$$\frac{\text{D.O. do plasma teste}}{\text{“Cut-off” (ponto de corte)}} = \text{Racio}$$

As unidades de plasma que apresentaram valores de racio superiores ou iguais a 1,0 foram consideradas positivas e valores inferiores a 1,0 negativas. (Constantine, 1991).

### **3.5.2 - Quimioluminescência**

Os valores de Racio na técnica de quimioluminescência foram obtidos segundo instruções do fabricante do conjunto de diagnóstico, pela razão entre a Unidade Relativa de Luminescência (RLU) obtida em cada amostra de plasma, sobre o cut-off do teste (ponto de corte).

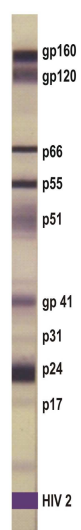
### **3.5.3 - Teste Rápido e Aglutinação**

Os testes de aglutinação e testes rápidos utilizados na detecção de anticorpos anti-HIV1/2 foram interpretados como reagentes ou não reagentes segundo instruções dos diferentes conjuntos de diagnóstico empregados na análise.

### **3.5.4 - Western Blot (WB)**

Para interpretação do WB, utilizamos os critérios estabelecidos pelo fabricante do conjunto de diagnóstico (Quadro 2).

Quadro 2. Critérios de interpretação das bandas identificadas no Western Blot



(\*)

| Padrão   | Interpretação                        |
|--|--------------------------------------|
| Nenhuma banda viral específica presente  | Negativo                             |
| Detecção de anticorpos contra p17 (unicamente) e ausência total de outras bandas.  | Negativo                             |
| Detecção de 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) ou POL (p31, p51, p66).   | HIV-1 Positivo                       |
| Detecção de 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17,p24, p55) ou POL (p31, p51, p66) e a banda específica de HI V- 2 é visível                 | HIV-1 Positivo com indícios de HIV-2 |
| Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para POSITIVO   | Indeterminado                        |
| Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para POSITIVO e a banda específica de HIV- 2 é visível. | Indeterminado com Indícios de HIV-2  |

\* perfil de distribuição das bandas no Western Blot

### 3.5.5 - Imunofluorescência Indireta (IFI)

A interpretação dos resultados da IFI foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante. As unidades de plasma foram classificadas como reagentes quando cerca de 25 a 30% das células apresentam fluorescência na membrana e parte da célula. As unidades de plasma com ausência de fluorescência em todas as células foram classificadas como não reagentes e qualquer padrão diferente dos descritos foi considerado indeterminado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 – Das Unidades de Plasma Recebidas

Foram recebidas no Laboratório de Sangue e Hemoderivados, 564 unidades de plasma provenientes das regiões Sudeste e Nordeste das quais 03 foram descartadas por volume insuficiente, totalizando 561 unidades. Destas, 58 unidades apresentavam identificação da sorologia para anti-HIV descrita na rotulagem, 23 para anti-HTLV-I/II, 33 para anti-HCV, 28 para HBsAg, 15 para anti-HBc, 03 para Doença de Chagas, 230 para Sífilis, 33 positivas para mais de uma patologia e 140 unidades não constavam em sua rotulagem para qual sorologia eram reagentes (Figura 7).

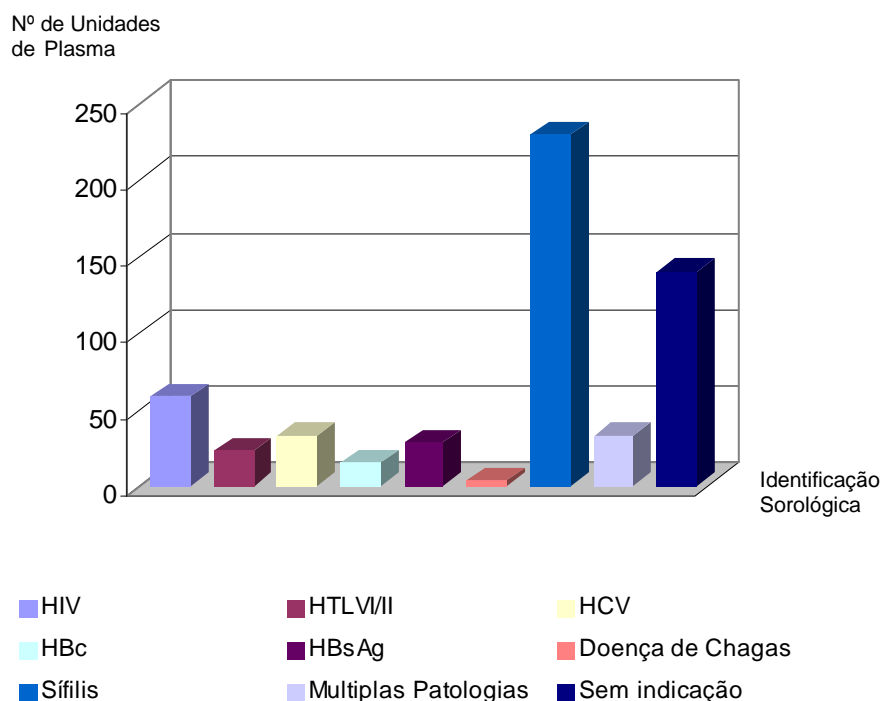


Figura 7. Distribuição das Unidades de plasma recebidas de acordo com a sorologia indicada na rotulagem.

### 4.2 – Dos Resultados Sorológicos Obtidos

Das 561 unidades de plasma analisadas, 78 (13,7%) foram reativas para anti-HIV1/2 nos testes de triagem realizados no LSH. Destas, 41 (53,2%) foram reativas

somente para HIV1/2 e 36 (46,7%) apresentaram positividade para anti-HIV1/2 associado a outras patologias (Tabela 1).

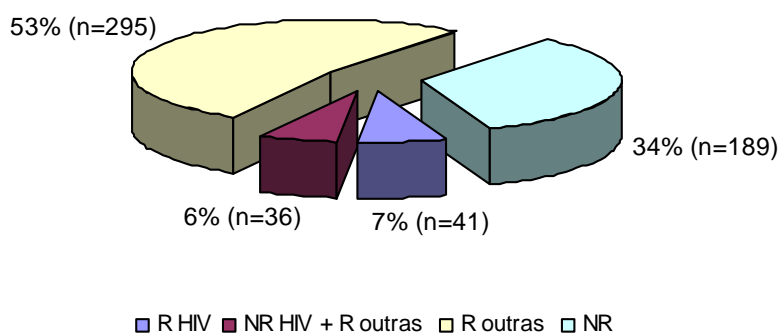
Tabela 1- Distribuição dos resultados da sorologia

| Resultados dos Testes Sorológicos                             | Nº de Amostras |
|---|----------------|
| Reagentes para anti-HIV 1/2                                   | 41             |
| Reagentes para anti-HIV 1/2 e outras patologias               | 36             |
| Não Reagentes para HIV 1/2 e Reagentes para outras patologias | 295            |
| Não Reagentes   | 189            |
| Total   | 561            |

Verificamos que 295 (53%) unidades de plasma apresentaram reatividade para uma ou mais patologias, exceto para anti-HIV1/2.

Um total de 189 (34%) unidades de plasma apresentou resultados não reagentes para as patologias avaliadas.

Desta forma, para composição do painel, foram selecionadas apenas 41 unidades de plasma reativas exclusivamente para anti-HIV1/2, representando 7% do total de amostras analisadas (Figura 8).



R: reagente, NR: Não reagente, outras: outras patologias

Figura 8. Distribuição dos resultados dos testes sorológicos

A média dos valores individuais de racio nos ensaios imunoenzimáticos variou de 3,6 a 16,7 e a média global foi de 13,7. Para fins de interpretação, vale ressaltar que valores de racio entre 1,0 e 2,5 são considerados de baixa reatividade, entre 2,6 e 4,5 são considerados de média reatividade, e valores superiores a 4,5 são considerados de alta reatividade. Na Figura 9 estão plotados os valores médios de racio obtidos nos testes ELISA e de quimioluminescência realizados. Em resumo, as

unidades de plasma são em sua maioria alta reatividade para HIV1/2.

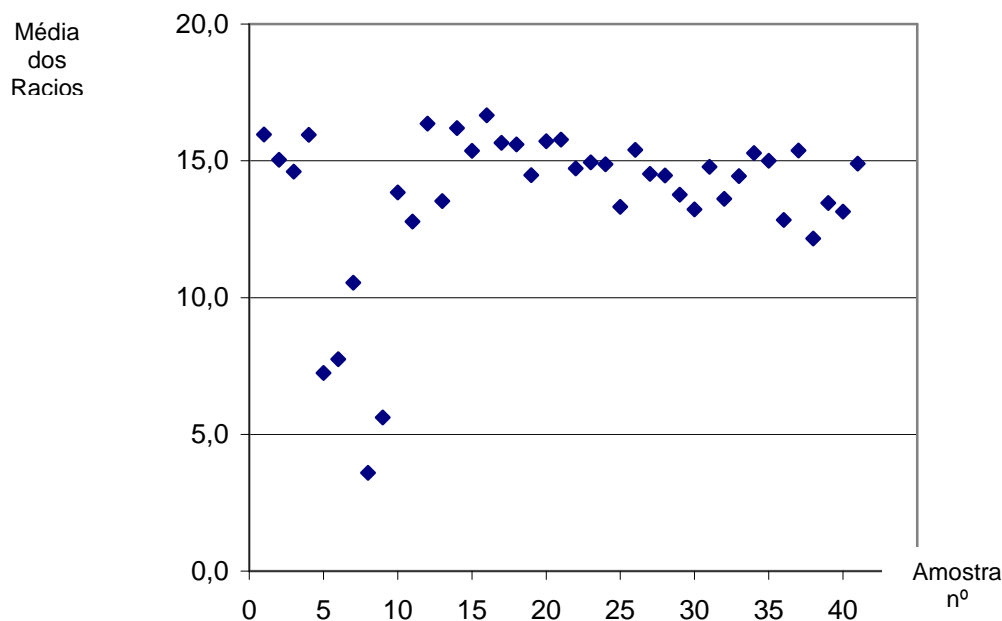


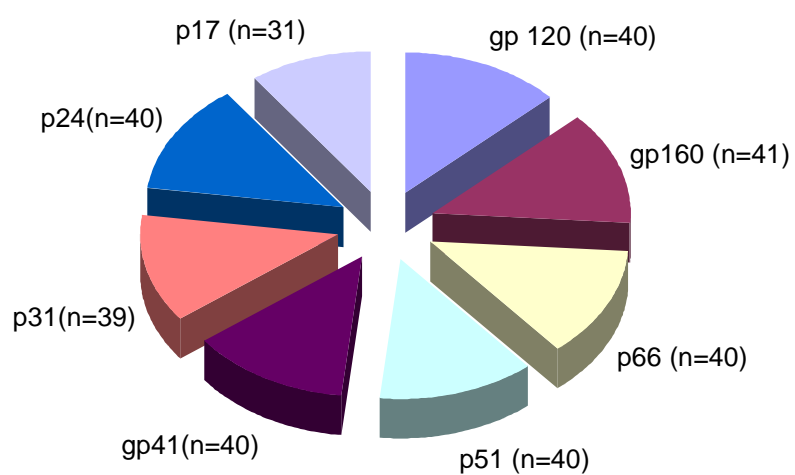
Figura 9 - Média dos valores individuais de rácio nos ensaios imunoenzimáticos para HIV1/2.

As 41 unidades de plasma positivas nos testes de triagem para anti-HIV 1/2 foram submetidas aos ensaios confirmatórios – Western Blot e IFI.

Um total de 97,6% (40/41) das unidades de plasma reativas nos testes imunoenzimáticos (ELISA e Quimioluminescência) teve sua reatividade confirmada com o WB.

A distribuição da frequência de aparecimento das bandas nas diferentes unidades de plasma analisadas deu-se de forma homogênea. A banda mais frequentemente reconhecida no Western Blot foi a gp160 (100%) seguida da gp120, p66, p51, gp41, p24 (97,6%), p31 (95,1%) e p17 (75,6%). Apenas uma (01) das unidades de plasma foi considerada indeterminada, por apresentar a banda gp 160 do HIV-1 (Figura 10).

Cem por cento (100%) das unidades de plasma foram reagentes na técnica de imunofluorescência indireta.



n= número de unidades de plasma

Figura 10. Distribuição da frequência de aparecimento das bandas na Técnica de Western Blot.

## 5- DISCUSSÃO

O diagnóstico da infecção pelo HIV é realizado, geralmente, pela detecção de anticorpos anti-HIV no soro ou plasma humano. A possibilidade de um resultado falso negativo, tanto em laboratórios clínicos quanto em Serviços de Hemoterapia, representa um sério e grave risco sanitário. Levando em consideração o grande número de conjuntos de diagnóstico disponíveis para a detecção do anti-HIV, torna-se necessário confeccionar um painel para o controle da qualidade destes produtos antes de sua liberação para o mercado nacional.

Na tentativa de obtenção de unidades de plasma provenientes de diferentes regiões, foram encaminhadas solicitações para diversos Serviços de Hemoterapia do país. Na ocasião, os Serviços de Hemoterapia das regiões Sudeste e Nordeste foram os primeiros a atender tal solicitação. Vale ressaltar que a região Sudeste detém o maior número de indivíduos infectados e o Nordeste sustenta o 3º lugar em número de casos da doença (Boletim Epidemiológico Aids e DST /2005).

Das 561 unidades de plasma analisadas, 140 não apresentaram identificação da sorologia em sua rotulagem. Tal fato, não constitui não conformidade do Hemocentro frente à legislação vigente (Brasil, 2004), uma vez que em seus registros internos consta o real motivo de descarte destas unidades. Segundo a legislação vigente não é obrigatório identificar o motivo do descarte no rótulo fixado nas unidades de plasma descartadas. Atualmente, grande parte dos Serviços de Hemoterapia no Brasil dispõe de sistema informatizado no qual disponibiliza etiqueta identificando o motivo do descarte.

No que diz respeito ao tratamento das amostras, optamos por não adicionar conservantes por dois motivos: o custo elevado e as possíveis interferências destas substâncias nos resultados dos testes.

Não foram utilizadas unidades de plasma recalcificadas, pois observamos que as mesmas induzem a resultados falsos negativos na maioria dos conjuntos de diagnósticos utilizados. Da mesma forma, não diluímos as unidades de plasma em plasma negativo, o que acarreta queda de sua reatividade, diminuindo o prazo de validade do painel. Até o momento a conservação é realizada a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  negativos, e seus resultados têm se mostrado uniformes.

Das 372 unidades de plasma reagentes após caracterização sorológica, foram selecionadas 41(7%) amostras verdadeiramente positivas para anti HIV1/2, ou



seja, com resultados padronizados, lineares e reprodutíveis. Amostras reativas para anti-HIV1/2 associadas a outras patologias não foram incluídas no painel anti-HIV, a fim de evitar a possibilidade de que a associação a outros marcadores acarrete prejuízo na avaliação da qualidade dos conjuntos de diagnóstico.

As unidades de plasma que compõem o painel anti-HIV, são de média e na sua grande maioria, de alta reatividade. Existe a necessidade de complementação do painel com unidades de plasma de baixa reatividade (soroconversão), entretanto o acesso a esta matéria prima é complexo e de custo elevado. Para obtenção das mesmas seria necessário o acompanhamento de indivíduo desde a infecção inicial pelo vírus até o aparecimento de anticorpos anti-HIV.

As 189 unidades de plasma consideradas impróprias para uso terapêutico por apresentar sorologia reagente e, quando testadas no LSH/INCQS, apresentaram resultados negativos, não apontam para erro durante a triagem sorológica no Serviço de Hemoterapia de origem. Esse fato ocorre devido a uma maior precaução adotada pelos Serviços de Hemoterapia buscando desta forma, melhorar a qualidade e a aumentar segurança transfusional.

Um total de 295 unidades de plasma apresentou resultados reagentes para outros marcadores sorológicos diferentes do HIV1/2 (HTLV-I/II, HBc, HBsAg, HCV, Chagas, e Sífilis). Estas amostras irão compor painéis que no futuro serão empregados na avaliação de conjuntos de diagnóstico para as patologias supracitadas.

As unidades de plasma que compõem o painel anti-HIV, apresentaram resultados dentro dos padrões internacionais para o Western Blot, ou seja, presença de no mínimo 02 (duas) bandas referentes às proteínas do gene *env* (gp 160, gp 120 e gp41) 01 (uma) banda referente às proteínas do gene *gag* (p17, p24, p55) e 01 (uma) banda referente às proteínas do gene *pol* (p31, p51e p66).

A amostra que apresentou reatividade somente para a banda gp160 considerada indeterminada foi mantida na constituição do painel, pois indica a possibilidade de uma amostra de soroconversão.

Por se tratar de material esgotável, a inserção de unidades de plasma no painel é realizada de forma randômica, uma vez que não é preconizado na literatura um número máximo de unidades de plasma para composição do painel. As unidades de plasma são caracterizadas e adicionadas ao painel na medida em que vão atendendo as especificações para composição do mesmo.

## **6- CONCLUSÃO**

Foram caracterizadas 41 unidades de plasma verdadeiramente positivas para HIV, possibilitando ampliação da capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados no controle da qualidade de conjuntos para diagnóstico sorológico do HIV.

Em resumo, as unidades de plasma caracterizadas neste trabalho constituem uma ferramenta de uso potencial na ampliação da capacidade analítica do LSH, no controle de qualidade dos conjuntos para diagnóstico do HIV. Estes conjuntos de diagnóstico são utilizados em dois momentos distintos: em laboratórios clínicos como apoio ao diagnóstico da infecção pelo HIV e em Serviços de Hemoterapia na triagem sorológica dos doadores de sangue.

## **7- PERSPECTIVAS**

Empregar o painel anti-HIV confeccionado para avaliar a qualidade dos conjuntos empregados no diagnóstico sorológico do HIV existentes no mercado nacional, quanto à sua sensibilidade e especificidade analítica.

Futuramente, o desempenho analítico dos conjuntos para diagnóstico sorológico do HIV será objeto de meu trabalho de mestrado.

## 8- BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular & Molecular**. Brasil: Revinter, 2000. 479p.

ALDOVINE A.; WALKER B.D. **Techniques in HIV Research**. United States and Canada: Stockton Press, 1990. 285p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR / ISO 17025. **Credenciamento de laboratórios. Laboratórios de ensaio, calibração e garantia da qualidade**. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

BRASIL. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos saneantes e outros produtos, e dá outras providências. [on line] Disponível em [www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis.lei.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis.lei.htm). Acesso em: 02 jun. 2005.

BRASIL. Decreto nº 79094 de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos produtos de higiene, saneantes e outros produtos. [on line] Disponível em [www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis.lei.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis.lei.htm). Acesso em: 02 jun. 2005.

BRASIL. Resolução RDC nº 153 de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, a placenta e da medula óssea. [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br/sangue/legis/leis.htm](http://www.anvisa.gov.br/sangue/legis/leis.htm). Acesso em: 02 jun. 2005.

BRASIL. Portaria nº 8 de 23 de janeiro de 1996. Dispõe sobre a alteração no registro de produtos correlatos na Secretaria de Vigilância Sanitária, indicando os documentos necessários para registro, revalidação, alteração, isenção ou cancelamento do registro junto a esta Secretaria. [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br/produtos/legis\\_esp.htm](http://www.anvisa.gov.br/produtos/legis_esp.htm). Acesso em: 11 jan. 2006.

BRASIL. Portaria nº 59 de 28 de janeiro de 2003. Dispõe sobre a sub-rede de Laboratórios do Programa Nacional de DST e AIDS. [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br/sangue/legis/resolucoes.htm](http://www.anvisa.gov.br/sangue/legis/resolucoes.htm). Acesso em: 11 jan. 2006.

BRASIL. MANUAL de controle das doenças sexualmente transmissíveis. Brasília: Coordenação Nacional de DST/Aids, 3ª ed, 1999,

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diagnóstico sorológico do HIV - Testes de Triagem. Brasília: Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 1997, 67p.

CADASTRO, Distribuição e Armazenamento De Plasma Para Confecção De Painéis Sorológicos In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. seção 10. (65.3420.013), 2002, 4p.

CASSEB, J.; DUARTE, A. J. S. **Imunodeficiência Adquirida** in: LOPES, A.C. Tratado de Clínica Médica, v.3. São Paulo: ROCA, 2006, p. 3723 – 3736.

CHOI, H. K.; GOLDANI, L. Z. **Infecção pelo HIV** in : XAVIER, R.M.; ALBUQUERQUE, G. C.; BARROS, E. **Laboratório na prática clínica**. Rio Grande do Sul: Artmed, 2006, p. 395 – 407.

CONSTANTINE, N.T. Serologic tests for the retroviruses approaching a decade of evolution. **AIDS**, v. 7, n. 1, 1993, p. 1-13.

CRITÉRIOS de definição de casos de AIDS em adultos e crianças. Brasília: Programa Nacional de DST e Aids. Série Manuais nº 6 0, 2003, 56p.

CURA, E & WENDEL,S. Manual de Procedimientos de controle da calidad para os laboratórios de serologia de los bancos de sangre. Organización Panamericana de la Salud. 1994.

FERREIRA, A.W; Ávila, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guabanara Koogan, 2ª ed, 1996, p. 1-102.

GALVÃO-Castro, B ; Ivo-dos-Santos J ; Couto - Fernandez JC ; Bongertz V ; Chequer-Bou-Habib D ; Sion FS ; Barth OM ; Pessoa MH ; Pereira MS . Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil.. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 82, n. 4, p. 453-456, 1987.

HOLMES, K.K; DeLAY, P.R; COHEN, M.S. – Controle de DST: uma prioridade de saúde pública. In: Controle de doenças sexualmente transmissíveis: Manual de Planejamento e Coordenação de Programas. Rio de Janeiro, Te Corá, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE/FIOCRUZ. **Manual de coleta de amostras de produtos sujeitos a vigilância sanitária.** Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 1998, 59p.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Normas para Apresentação de Dissertações e Teses.** INCQS/FIOCRUZ, 2001. 14p.

PIOT, P; ISLAM, M.Q. Sexually transmitted diseases in the 1990s: global epidemiology and challenges for control. **Sex. Transm. Dis.** n. 21, 1994, p. S7-S13.

SANCHES, M.L. et al. Mejoria continua de la calidad – Guia para los laboratorios clinicos de America Latina. Editora Médica Panamericana, 1995.

SEGHATCHIAN M. J.; STIVALA J. F. A. Conceptual acceptance of quality assurance and the implementation of total quality management in blood transfusion services, 1992.