

CLAUDIA BASTOS BARROSO

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA HIV-1 (IFI) FRENTE A OUTROS
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV/AIDS.**

**PPGVS / INCQS
FIOCRUZ
2010**

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA HIV -1 (IFI) FRENTE A OUTROS
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV/AIDS.

Claudia Bastos Barroso

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de
Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à
Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Lucia Maria Corrêa Werneck
José Antônio Sá Ferreira

Rio de Janeiro
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA HIV -1 (IFI) FRENTE A OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV/AIDS.

Claudia Bastos Barroso

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Prof. – Maria Aparecida Affonso Boller - INCQS/FIOCRUZ

Prof. – Pedro Paulo Ferreira Ribeiro – BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ

Prof. – Michel Vergne Félix Sucupira – BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ

Orientadora: – Lucia Maria Correa Werneck - INCQS/FIOCRUZ

Orientador: José Antônio Sá Ferreira – BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Barroso, Cláudia Bastos

Avaliação do desempenho da metodologia de imunofluorescência indireta IFI para HIV-1 frente a outros métodos de diagnóstico da infecção pelo HIV/aids / Cláudia Bastos Barroso. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2010.

xiii, 42p. , il. , graf.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Lucia Maria Correa Werneck

José Antonio Sá Ferreira

1. HIV - 2. Diagnóstico Sorológico 3. IFI/HIV-1

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio desta conquista, porque estando com ele tudo posso.

Aos meus orientadores Lucia Maria Werneck e José Antônio Sá Ferreira, incansáveis na orientação, ensinamentos, perseverança e dedicação na realização deste Estudo.

A meus pais e meu irmão, pelo amor, carinho, incentivo, valores, determinação e paixão para concretizar os sonhos.

A meu noivo Miro pelo incentivo, carinho e compreensão nos momentos de dificuldade.

À Direção de Bio-Manguinhos por permitir o desenvolvimento profissional de seus funcionários.

A Raouf Sykora, chefe do Departamento de Produção de Reativos para Diagnóstico e a Marco Lemos, Chefe da Produção de Reativos, pela autorização para a realização do Curso e das atividades envolvidas para a finalização deste Estudo.

Ao Antonio Gomes Pinto Ferreira (Tuninho), Gerente de Desenvolvimento de Reativos para Diagnóstico, pelo estímulo e interesse no desenvolvimento deste Estudo.

A Dra. Maria de Lourdes, Chefe da ASCLIN e equipe, por todo o apoio na realização desta monografia.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação do INCQS pela oportunidade do desenvolvimento deste Estudo.

Ao Dr. Orlando Ferreira, do Laboratório de Virologia Molecular Animal, LAVIMOAN / UFRJ, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e equipe, pela discussão dos resultados, atenção e apoio na finalização deste Estudo.

Ao Adenauer Teixeira e José Wanderley Pissurno pelo apoio, incentivo e ensinamentos, que contribuíram muito para a realização deste Estudo.

Á Danielle Custódio e equipe do SECVI pelo apoio nos momentos em que eu estava no Curso, no LAVIMOAN / UFRJ e no LATED para a finalização desta monografia.

A equipe do SECVI (Danielle, Claudio, Alan, Anne, Regina Célia, Lilian), pessoas importantes durante o período do curso, por terem sempre uma palavra amiga nos momentos difíceis. Obrigada!

RESUMO

A Síndrome da imunodeficiência Adquirida (aids) é um grave problema mundial de Saúde Pública. Com a necessidade de se diagnosticar a infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi incentivado o desenvolvimento de testes dotados de elevada sensibilidade e especificidade, de baixo custo, para utilização em rotina, visando à detecção de anticorpos virais para o HIV no sangue humano. Esses testes sorológicos são usados como instrumentos para auxiliar no diagnóstico clínico, na proteção do suprimento de sangue e no monitoramento da infecção pelo HIV/aids. Bio-Manguinhos, Unidade Técnica da Fiocruz, voltada para o desenvolvimento e produção de imunobiológicos, biofármacos e reativos para diagnóstico têm estimulado o estabelecimento de plataformas tecnológicas que permitem o desenvolvimento e a incorporação de novos produtos e processos de interesse para a Saúde Pública. No presente Estudo, amostras de indivíduos soropositivos para a infecção pelo HIV/aids e de doadores de sangue foram usadas na Avaliação do desempenho da metodologia de imunofluorescência IFI HIV-1 Bio - Manguinhos frente a outros métodos de diagnóstico da infecção pelo HIV /aids. Dentre esses testes incluem-se um ensaio imunoenzimático comercial, um teste rápido de Bio-Manguinhos, um teste rápido confirmatório de Bio-Manguinhos ainda não registrado e um ensaio comercial de Western Blot. A reação de IFI HIV-1 Bio - Manguinhos apresentou desempenho comparável aos dos ensaios de triagem usados com sensibilidade igual a 100%, o que atende aos critérios estabelecidos pela ANVISA / MS. A reação de IFI HIV-1 Bio – Manguinhos revelou resultados mais concordantes com o ensaio de Western Blot do que com o teste rápido confirmatório de Bio-Manguinhos. Esse fato parece estar relacionado à necessidade de ajustes nos padrões de interpretação do teste rápido confirmatório. Quanto à especificidade da reação de IFI HIV-1 Bio – Manguinhos, o valor encontrado foi de 97,6%. Assim, faz-se necessário avaliar um maior número de amostras, além de realizar uma comparação mais abrangente com outros métodos confirmatórios de diagnóstico para que considerações mais precisas sobre o desempenho e eficiência desses métodos possam ser feitas.

ABSTRACT

AIDS is a serious global problem of Public Health. With the need to diagnose HIV/aids infection it has been encouraged the development of tests with high sensitivity and specificity, low cost, for use in routine, aimed at detecting antibodies to HIV in human blood. These serological tests are used as tools to help clinical diagnosis, to protect the blood supply and monitoring of HIV / aids. Bio-Manguinhos, Fiocruz Technical Unit, focused on the development and production of immunobiological products, biopharmaceuticals and diagnostic reagents has stimulated the establishment of technology platforms that enable the development and incorporation of new products and processes of interest to Public Health. In the present study samples of individuals seropositive for HIV / aids and blood donors were used in the performance assessment of Bio - Manguinhos HIV-1 IFA over other methods of diagnosis of HIV / aids. Among these tests are included a commercial enzyme immunoassay, a Bio-Manguinhos rapid test, a Bio-Manguinhos not registered rapid confirmatory test and a commercial Western Blot. The reaction of HIV-1 IFA Bio - Manguinhos a performance comparable to that of screening tests used with sensitivity equal to 100%, which meets the criteria established by ANVISA / Ministry of Health. The Bio - Manguinhos HIV-1 IFA showed results more consistent with the Western Blot assay than with the Bio-Manguinhos confirmatory rapid test. This fact seems to be related to the need for adjustments in the interpretation patterns of confirmatory rapid test. For the specificity of Bio – Manguinhos HIV-1 IFA the value found was 97.6%. Thus, it is necessary to evaluate a larger number of samples, and conduct a more comprehensive comparison with other confirmatory diagnosis methods in order that detailed considerations on the performance and efficiency of these methods can be made.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos subtipos no Brasil	5
Figura 2 – Estrutura esquemática do HIV	6
Figura 3 – Ciclo infeccioso do HIV	7
Figura 4 - Fluxograma para a detecção de anticorpos anti-HIV no Brasil	10
Figura 5 – Resultado não Reagente – TR	20
Figura 6 – Resultado reagente – TR	20
Figura 7 – Resultados inconclusivos ou inválidos - TR	20
Figura 8 – Disposição das amostras nas lâminas de imunofluorescência	21
Figura 9 – Padrão de leitura de amostra não reagente – IFI	22
Figura 10 – Padrão de leitura de amostra reagente – IFI	23
Figura 11 – Padrão de leitura de amostra indeterminada – IFI	23
Figura 12 – Padrão de leitura de amostra positiva – IR	25

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Sumário Global de HIV – Mundo 2009	2
Quadro 2 – Novas Infecções em 2008	2
Quadro 3 – Mortes por aids em 2008	3
Quadro 4 – Sumário global de HIV / Aids - 2008	4
Quadro 5 – Possibilidades de Resultado de um teste	28
Quadro 6 – Reatividade das amostras ao HIV	30
Quadro 7 – Reatividade das amostras – Reação de Western Blot	31
Quadro 8 – Valores de especificidade e sensibilidade	32

SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS / aids – Síndrome da Imunodeficiência adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCLIN – Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos

Bio – Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

CDC - Centers for Disease Control

cDNA – DNA complementar

CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DST – Doença Sexualmente Transmissível

EIE – Ensaio Imuno-enzimático

env – Envelope

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GAG – Gene antígeno de grupo específico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HU – Banco de Sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ;

IFI – reação de Imunofluorescência Indireta

INCQS – Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

IPEC – Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, FIOCUZ – RJ

IR – Immunoblot Rápido

LAB – Laboratório de origem das amostras

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LATED – Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

LAV – Vírus Associado a Linfadenopatia

LAVIMOAN – Laboratório de Virologia Molecular Animal

MS – Ministério da Saúde

p 12 – Proteína protease

p 17 – Proteína da matriz

p 24 – Proteína do capsídeo viral

p 32 – Proteína integrase

p66 – Proteína transcriptase reversa

PNDST/AIDS/MS – Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde

Pol – Polimerase

RNA – Ácido Ribunucleico

SECVI – Setor de Células e Vírus

SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

TELELAB – Sistema de educação à distância do Ministério da Saúde

TR – Teste Rápido

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNAIDS – *Joint United Nations Programme on HIV / AIDS*

WB – Western Blot

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1- Epidemiologia	02
1.2- O Agente Etiológico	04
1.3 – Formas de Transmissão	07
1.4- Diagnósticos Sorológicos	08
1.4.1 – Testes de Triagem	11
1.4.2 – Testes Confirmatórios	13
1.5 – Justificativa	16
2. Objetivos	17
2.1 – Gerais	17
2.2 – Específicos	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1 – Amostras de sangue e local de realização dos testes	18
3.2 – Ensaio Imunoenzimático – Procedimento resumido	18
3.3 – Teste Rápido – HIV – Bio-Manguinhos – Procedimento resumido	19
3.3.1 – Leitura e interpretação do teste	20
3.4 – Teste de imunofluorescência indireta (IFI) para HIV-1 de Bio-Manguinhos	20
3.4.1 – Leitura e interpretação	22
3.4.2 – Titulação do conjugado	23
3.5 – Imunoblot Rápido DPP HIV- 1 / 2 – Bio-Manguinhos – Procedimento resumido	24
3.5.1 – Leitura e interpretação do teste	25
3.6 – Reações de Western Blot – Procedimento resumido	26
3.6.1 – Leitura e interpretação da Reação de WB	27
3.7 – Determinações de sensibilidade e especificidade dos testes	28
4. Resultados	29
4.1 – Caracterizações da reatividade das amostras	29
4.2 – Determinação de sensibilidade e especificidade dos testes	31
5. Discussão	33
6. Conclusão	37
7. Referências	38

1 - Introdução

O vírus da imunodeficiência humana adquirida, denominado na língua inglesa *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2), agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) (BARRÉ-SINOUSSE et al.; 1983; POPOVIC et al.; 1984; CLAVEL et al., 1986) é o responsável por mais de 40 milhões de casos da doença em todo o mundo.

Nos Estados Unidos, em 1980 foram relatados os primeiros casos de aids, principalmente em adultos do sexo masculino (homossexuais) e usuários de drogas injetáveis. Esses indivíduos apresentavam sarcoma de Kaposi e infecção por *Pneumocystis carini* associados a uma imunodepressão profunda, infecções oportunistas e tumores malignos, com perda de peso e degeneração do Sistema Nervoso Central (SNC), entre outros (GOTTLIEB et al., 1981).

O HIV foi isolado primeiramente em 1983, na França, pelo grupo liderado por Luc Montagnier e recebeu a denominação de LAV (Vírus Associado a Linfadenopatia) por ter sido obtido de paciente com quadro de linfadenopatia crônica (BARRÉ-SINOUSSE et al.; 1983). No 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 TCD4+ auxiliares. Esse vírus é capaz de infectar vários outros tipos celulares do sistema imunológico, como os macrófagos e as células dendríticas (BARRÉ-SINOUSSE, 1996; CLAPHAM & WEISS, 1997).

Os primeiros testes para diagnóstico da infecção pelo HIV baseados na detecção de anticorpos para esse vírus tornaram-se disponíveis para uso em 1985 e o ensaio imunoenzimático foi a primeira ferramenta de triagem diagnóstica. A implantação dos testes ocorreu inicialmente como método diagnóstico para os indivíduos em risco para a infecção pelo HIV-1 (MACHADO AA & COSTA, 1999).

Em 1986, foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovírus, com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2. Nesse mesmo ano, um comitê internacional recomendou a designação HIV em substituição ao termo LAV usado anteriormente (CLAVEL et al., 1986).

No Brasil, o primeiro caso de isolamento e identificação do HIV-1 ocorreu em 1987 pela equipe do professor Galvão Castro e colaboradores, da Fundação Oswaldo Cruz, a partir de um caso de aids adquirida por transfusão sanguínea sendo a amostra de retrovírus isolada, caracterizada por microscopia eletrônica e pelo perfil antigênico (GALVÃO CASTRO et al., 1987).

1.1 - Epidemiologia

Cerca de três décadas após os primeiros casos relatados, o número de doentes e infectados pelo HIV em todo mundo, segundo o Boletim da Unaid, 2009, é de aproximadamente 36,1 milhões e a epidemia continua crescendo, principalmente em regiões mais pobres. Quase todos os países relatam casos da doença e pode-se afirmar que as regiões ainda não atingidas, um dia a enfrentarão. A seguir, Quadros 1, 2 e 3 com os principais informes epidemiológicos da doença no mundo.

Quadro 1 - Sumário Global de HIV – Mundo – 2009

Pessoas vivendo com HIV/AIDS em 2008	
Total	33,4 milhões
Adultos	31,3 milhões
Mulheres	15,7 milhões
Crianças < 15 anos	2,1 milhões

Fonte: www.unaids.org - 06/12/2009

Quadro 2 – Novas Infecções em 2008

Novas Infecções em 2008	
Adultos	2,3 milhões
Crianças < 15 anos	430 mil
Total	2,7 milhões

Fonte: www.unaids.org - 06/12/2009

Quadro 3 – Mortes por aids em 2008

Número de Mortes	
Adultos	1,7 mil
Crianças < 15 anos	280 mil
Total	2,0 milhões

Fonte: www.unaids.org - 06/12/2009

As tendências da epidemia e seus rumos no Brasil apontam para três direções importantes. Em primeiro lugar, aquela que é denominada por alguns autores como pauperização da epidemia brasileira.

Em segundo lugar, apesar da maior parte dos casos encontrarem-se concentrados em áreas urbanas e regiões metropolitanas verificou-se também um processo de interiorização da infecção para municípios de médio e pequeno porte.

Finalmente, a terceira e possivelmente, a mais grave das tendências da epidemia é o crescimento do número de mulheres infectadas pelo HIV, que ocorre pela sua maior vulnerabilidade quanto aos aspectos biológicos, epidemiológicos e sociais (PINTO, PINHEIRO, VIEIRA & ALVES, 2007). No Quadro 4 informações sobre a epidemia da aids no Brasil

Quadro 4 – Sumário Global de HIV/ Aids – Brasil – 2008

Pessoas vivendo com HIV/AIDS em 2008	Mulheres	172 mil
	Homens	325 mil
	Gestantes	42 mil
	Crianças < 13 anos	13 mil
	Total	509 mil
Categoria de exposição (adultos)	Sexual	299 mil
	Sanguínea	68 mil
	Vertical	12 mil
	Ignorada	50 mil
Mortes por AIDS em 2008	Total	206 mil

Fonte: Boletim epidemiológico AIDS / DST, Ministério da Saúde, 2008

1.2 - O Agente Etiológico

O HIV é um retrovírus citopático e não oncogênico com genoma RNA, da Família *Lentiviridae*. O vírus necessita, para multiplicar-se, de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral em uma cópia de DNA, que pode então se integrar ao genoma do hospedeiro.

A família dos retrovírus possui estrutura genômica semelhante com homologia em torno de 50%. Aparentemente o HIV-1 e o HIV-2 passaram a infectar o homem há várias décadas. O HIV-1 tem se mostrado mais virulento do que o HIV-2. Os vírus da imunodeficiência símia (SIV), que infectam com frequência os macacos verdes africanos, são muito próximos ao HIV-2, sugerindo uma evolução comum (HIRSCH et al., 1989; GAO et al., 1992).

Embora não se saiba ao certo qual a origem do HIV-1 existe uma grande família de retrovírus relacionados a ele entre primatas não humanos na África Sub-saariana. Por estes fatos supõe-se que o HIV tenha origem africana. Ademais, diversos estudos sorológicos realizados na África, utilizando amostras de soro armazenadas desde as décadas de 50 e 60, reforçam estas hipóteses (ZHU et al., 1998).

As análises filogenéticas de um grande número de amostras de pacientes infectados pelo HIV procedentes de diferentes regiões do mundo propiciaram a

sua classificação em tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes (CRFs). Assim, os isolados de HIV-1 são classificados em três grupos principais: o grupo M (*major*), o grupo O (*outlier*) e o grupo N (*new* – não M / não O) (GURTNER et al., 1994; SIMON et al., 1994; HOFFMANN & KAMPS, 2003). Especula-se a possibilidade de variantes virais possuírem diferentes índices de transmissibilidade e patogenicidade. No grupo M identificam-se nove subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H e I) e no grupo O apenas um. Em relação ao HIV-2 descrevem-se cinco subtipos: A, B, C, D e E.

No Brasil, o subtipo B é o mais prevalente, mas os subtipos C e F, bem como, as formas recombinantes circulantes BC e BF têm sido observadas (Figura 1) com diferentes frequências em varias regiões geográficas do País (MORGADO et al. 1994; 2002; CORNELISSEN et al., 1996; GUIMARÃES et al., 2002; MORGADO et al., 2002; SOARES et al., 2003; BRINDEIRO et al., 2003; COUTO-FERNANDEZ et al., 2005).



Figura 1 - Distribuição dos Subtipos do HIV no Brasil

Fonte: Adaptado de Mem.Inst. Oswaldo Cruz – Mariza Morgado /IOC /FIOCRUZ, 2007.

O genoma do HIV, similar aos demais retrovírus, contém três principais genes: *gag*, *pol*, e *env* que codificam os principais componentes estruturais e funcionais do HIV, incluindo as proteínas do envelope e a enzima transcriptase reversa (CONSTANTINE & ZINK, 2005).

Os principais componentes codificados por *env* são as glicoproteínas do envelope: gp 160, gp 120 e gp 41, enquanto os codificados pelo gene *gag* incluem as proteínas do nucleocapsídeo *core* p55, p40, p24 - antígeno do *core*,

p17 (matriz), e p7 (nucleocapsídeo). As proteínas importantes codificadas pelo gene *pol* são as enzimas p66 e p51 (transcriptase reversa), p11 (protease) e p32 (integrase). Na Figura 2 é apresentada a estrutura do HIV (CONSTANTINE & ZINK, 2005).

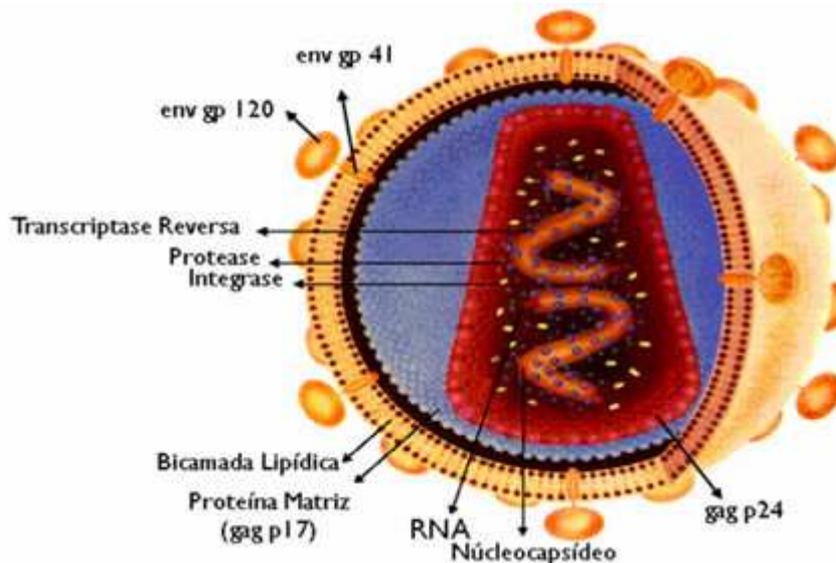


Figura 2 – Estrutura esquemática do HIV

Fonte: [http://www.brasilecola.com/upload/e/3\(23\).jpg](http://www.brasilecola.com/upload/e/3(23).jpg) – 15/12/2009

Para compreender adequadamente as técnicas diagnósticas é importante a descrição dos antígenos virais estruturais que fazem parte da partícula viral madura, pois é contra eles que são produzidos os anticorpos detectados nas técnicas de diagnóstico da infecção pelo HIV (CONSTANTINE & ZINK, 2005).

A infecção pelo HIV inicia-se com a entrada do vírus na célula, por meio da ligação da proteína de superfície (gp 120) com o receptor específico da superfície celular, principalmente CD4. A ligação da gp120 ao co-receptor proporciona uma alteração na conformação da estrutura tridimensional da glicoproteína do envelope, com a exposição de domínios da gp41, que se funde ao receptor de quimiocina presente na membrana celular.

O envelope viral e a membrana celular entram em contato, aderem-se um ao outro, permitindo a penetração do vírus e a entrada do capsídeo viral no interior da célula, com a liberação do complexo núcleo-protéico no citoplasma da célula hospedeira. O material genético (RNA) liberado na célula é convertido em duas fitas de DNA complementar (cDNA), após a ação da enzima transcriptase

reversa em um fenômeno conhecido como transcrição reversa ou retrotranscrição (CHAN et al.,1997).

O DNA viral integrado (provírus) que tem o papel de molde, as proteínas virais e o material genético que formará os novos virions serão sintetizados em um processo de multiplicação com participação de proteínas virais e da célula hospedeira. As proteínas virais produzidas regulam novos genomas virais e formam a estrutura externa de outros vírus que são liberados por brotamento pela célula hospedeira (CHAN et al.,1997) (Figura 3).

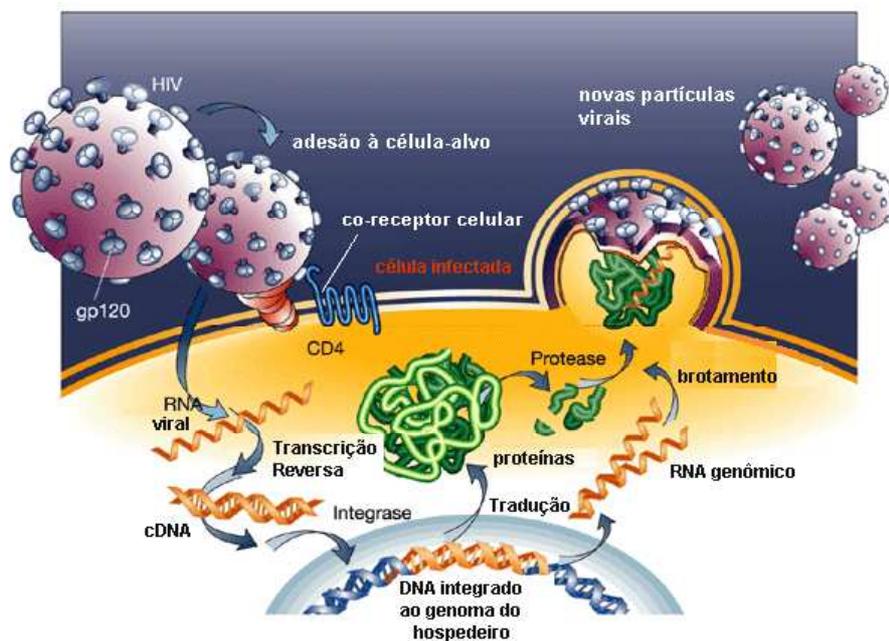


Figura 3 - Ciclo Infeccioso do HIV– 15/12/2009

Fonte: Adaptado de: http://www.fltdhiv_aids.htm

1.3 - Formas de Transmissão

As principais formas de transmissão da infecção pelo HIV 1 e 2 são: sexual, sanguínea (por sangue ou hemocomponentes não testados, por uso de drogas injetáveis), materno – fetal (da mãe para o filho durante a gestação, no momento do parto ou por aleitamento materno, além da parenteral).

Em menor escala, pode ocorrer a transmissão ocupacional ocasionada por acidentes de trabalho, entre profissionais de saúde com instrumentos perfuro-cortantes contaminados com sangue de pacientes infectados pelo HIV (BERTOZZI, S. et al., 2006).

1.4 - Diagnósticos Sorológicos

A implantação dos testes laboratoriais ocorreu, primeiramente, como método diagnóstico para os indivíduos em risco para a infecção pelo HIV-1. Desde então os testes caminham lado a lado com o rápido conhecimento da fisiopatogenia da aids e do complexo ciclo de replicação do HIV-1 (MACHADO AA & COSTA, 1999).

Baseado no fato de que os indivíduos infectados desenvolvem anticorpos para o HIV, os métodos laboratoriais voltados para a detecção de anticorpos foram os escolhidos. Alguns parâmetros de importância precisam ser atendidos para que um teste sorológico possa ser utilizado em rotina: elevado grau de especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez, custo reduzido, fácil operacionalização e interpretação (BRASIL/Portaria nº59, 2009).

Reativos para diagnóstico são insumos ou conjuntos de insumos usados na detecção de antígenos ou anticorpos, visando o diagnóstico laboratorial de uma determinada doença. Paralelamente, podem-se combinar as características de desempenho de cada teste, visando à padronização de procedimentos seqüenciados e o estabelecimento de fluxogramas de teste, para alcançar máximas sensibilidade e especificidade possíveis.

Os testes de diagnóstico são usados na complementação de políticas de controle da qualidade dos reagentes, para triagem e confirmação de infecções, em ações de registros de kits, licenças para comercialização e medidas para uniformizar procedimentos no território nacional.

O diagnóstico da infecção pelo HIV no Brasil em indivíduos com idade acima de dois anos é baseado na detecção de anticorpos, de acordo com a Portaria N.º 59 /GM/MS, 28 de janeiro de 2003, substituída recentemente pela Portaria N.º 151 SVS/MS, de 14 de outubro de 2009.

Alternativamente, para identificação pelo HIV em crianças nascidas de mães soropositivas, utilizam-se testes para quantificação de carga viral do HIV-1 em função da possibilidade da transferência passiva de anticorpos da mãe para o bebê o que pode ocasionar resultados falso-positivos nos testes de detecção de anticorpos.

A combinação dos testes é uma escolha que deve ser feita de acordo com a demanda de cada laboratório e levar em consideração o custo/benefício resultante da utilização de cada método. Por exemplo: laboratórios com grande rotina têm a opção de utilizar os ensaios imunoenzimáticos (EIE), automatizados ou não, enquanto que, pequenas rotinas, os testes rápidos e os testes simples podem ser mais indicados. Independente da técnica, método e custo, todos devem ser realizados de acordo com a norma definida pelo Ministério da Saúde usando produtos registrados na ANVISA / MS e por ela controlados.

Com o objetivo de maximizar o grau de confiabilidade na emissão dos laudos, bem como minimizar a ocorrência de resultados falso-negativos ou falso-positivos, o Ministério da Saúde estabeleceu a obrigatoriedade de um conjunto de procedimentos seqüenciados para os testes que visam detectar anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de 2 (dois) anos.

A amostra deve ser submetida a um teste que não poderá ser de avaliação rápida e ser capaz de detectar anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. As amostras não reagentes terão seu resultado definido como amostra negativa para HIV.

As amostras reagentes ou inconclusivas na etapa de triagem deverão ser submetidas ao segundo ensaio de princípio metodológico ou com antígenos diferentes do primeiro, em paralelo ao teste de imunofluorescência indireta para HIV-1 ou ao imunoblot para HIV. Alternativamente, as amostras reagentes poderão ser submetidas diretamente ao teste de Western Blot (WB)

As amostras não reagentes no segundo ensaio e negativas nos testes de imunofluorescência indireta ou no imunoblot terão seu resultado definido como amostra negativa para HIV ou para HIV-1, dependendo do ensaio realizado.

As amostras reagentes no segundo ensaio e positivas no teste de imunofluorescência e de imunoblot terão seu resultado definido como amostra positiva para HIV-1 ou para HIV, em função do ensaio usado.

As amostras inconclusivas em um ou mais desses dois testes deverão ser submetidas ao WB.

Na Figura 4 é apresentado o Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV no Brasil segundo a Portaria N.º 59 /GM/MS , de janeiro de 2003.

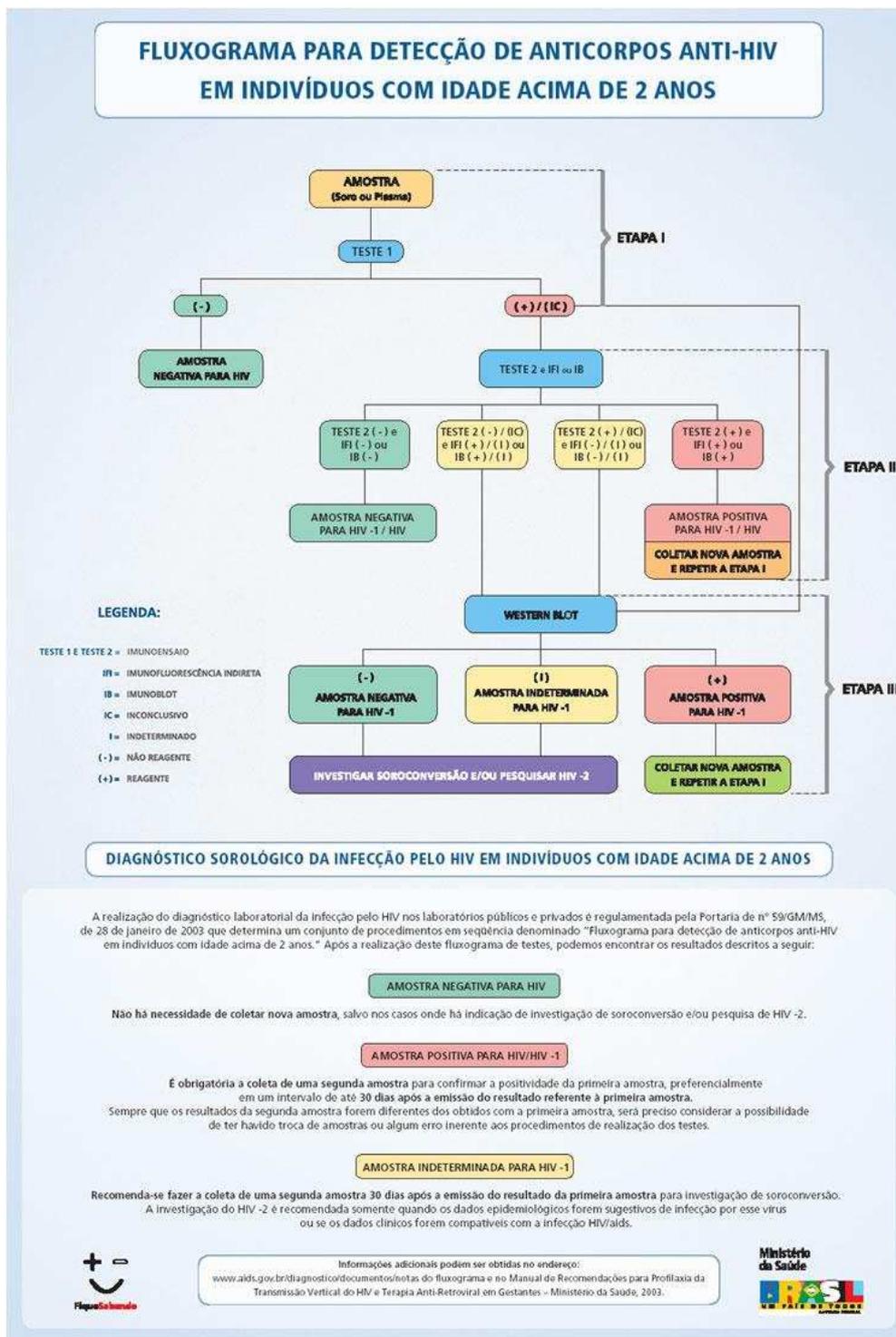


Figura 4: Fluxograma para detecção de anticorpos anti - HIV no Brasil

Fonte: www.aids.gov.br

De acordo com esse fluxograma os produtos de diagnóstico podem ser usados nas etapas de triagem ou de confirmação sorológica da infecção, segundo suas características e desempenho.

1.4.1- Testes de Triagem

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV deve ser executado em duas etapas: a primeira, de triagem, para permitir a identificação das amostras negativas; a segunda, confirmatória, que possibilita o diagnóstico conclusivo das amostras, reativas ou indeterminadas (www.aids.gov.br).

Os testes sorológicos de triagem, de alta sensibilidade, baseiam-se na presença de anticorpos dirigidos para antígenos do HIV. A ausência de reatividade não significa necessariamente que uma amostra é negativa uma vez que, existe um período denominado de janela imunológica durante o qual, os anticorpos podem ser produzidos em quantidade não suficiente para ser detectada pelos testes sorológicos usuais. Os Kits utilizados nessa etapa podem ser baseados em diferentes metodologias, como as descritas a seguir:

O ensaio imunoenzimático (EIE) é o ensaio mais freqüentemente usado na detecção de antígenos e/ou anticorpos anti-HIV, sendo este o teste de escolha na triagem de doadores por sua facilidade de automação, custo relativamente baixo e elevada sensibilidade e especificidade. Na fase sólida são usados antígenos, que podem ser detectados por um antígeno ou anticorpo complementar conjugado a 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, geralmente de 450 ou 492 nm, indicado pelo fabricante do conjunto de diagnóstico. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à concentração de antígenos/anticorpos presentes na amostra (CONSTANTINE, 2005).

O ensaio de quimioluminescência possui o mesmo princípio metodológico do EIE, entretanto a reação conduz a emissão de luz a partir de complexos fluorescentes, acridina, rutênio, etc., que podem ser indicadas química ou eletricamente. A reação ocorre em etapas distintas, onde o soro ou plasma é incubado frente a antígenos marcados com substância luminescente (conjugado). Na segunda etapa, o anticorpo ou o antígeno presente na amostra se liga a micropartícula marcada por estreptavidina e exposta a campo elétrico, no caso da eletroquimioluminescência ou substrato luminescente, no caso da quimioluminescência e a luz emitida é amplificada por um fotomultiplicador. A

concentração de anticorpos ou antígenos é diretamente proporcional à quantidade de luminescência emitida.

Esses ensaios possuem sensibilidade comparável aos testes EIE, entretanto necessitam de equipamento específico para sua realização (MORIMURA et al, 2006).

O uso dos testes rápidos (TR) por meio da metodologia de cromatografia de fluxo lateral vem ocorrendo cada vez mais no mundo, em especial, no continente africano. Atribui-se essa ampla utilização à simplicidade e rapidez de execução do teste possibilitando ao usuário o imediato conhecimento de sua reatividade sorológica para o HIV.

Com metodologia simples e a facilidade de usar sangue coletado por punção digital ou venosa, os TR podem ser usados em locais remotos, onde a infra-estrutura para implantação de um laboratório não é possível, proporcionando o aumento do acesso a populações específicas que, de outra forma, teriam dificuldade ou mesmo, impossibilidade de realizar testes para o diagnóstico da infecção pelo HIV. O uso de punção digital permite a redução de custos com a eliminação de suprimentos para a coleta, a dispensa de flebotomistas, bem como, do descarte de unidades de sangue. Estes testes usam, geralmente, antígenos virais ligados a um suporte sólido, como membranas de celulose ou nylon, látex, micropartículas ou cartelas plásticas. São de simples execução e possuem sensibilidade comparável aos EIE (FERREIRA et al, 2005).

Os testes rápidos por adotarem um sistema de leitura visual que dispensa o uso de equipamento laboratorial têm grande aplicabilidade em estudos epidemiológicos e em laboratórios de pequeno porte. A interpretação dos resultados é subjetiva e sua execução poder ser realizada por profissionais sem formação prática prévia e/ou treinamento laboratorial específico. Além disso, o uso dos TR não é recomendado para laboratórios de grande rotina, por ser processado manualmente. Entretanto, permite o conhecimento imediato dos resultados e a pronta assistência aos indivíduos soropositivos (KISSIN et al., 2008; FERREIRA et al., 2005).

1.4.2 - Testes confirmatórios

As amostras reagentes na etapa de triagem, entretanto, necessitam ter a sua reatividade ao HIV caracterizada na etapa de confirmação do diagnóstico sorológico, na qual testes com maior especificidade são usados. De acordo com o fluxograma de testes do PNDST/AIDS/MS os testes confirmatórios incluem a reação de imunofluorescência indireta, os imunoblots e o ensaio de WB (BRASIL/PNDST/AIDS/MS, 2009).

O teste IFI HIV-1 utiliza antígenos padronizados fixados a lâminas de vidro. Apesar de subjetivo, esse método permite a visualização em um mesmo campo microscópico, dos padrões de positividade e negatividade uma vez que, as células KE-37 usadas na confecção das lâminas são semi-permissíveis para o HIV, conduzindo à presença de células infectadas e não infectadas, em proporções de 25-35% do total de células, por campo microscópico. A ocorrência de resultados indeterminados implica na repetição do ensaio e na necessidade de realização de um teste de *WB* para confirmação do diagnóstico. O ensaio requer reagentes de alta qualidade, deve ser realizado e interpretado por pessoal qualificado e necessita de um severo controle de qualidade. Resultados indeterminados podem ser observados e atribuídos a inúmeras condições, tais como, soroconversão aguda, aids em estágio avançado, doença auto-imune, hemodiálise, insuficiência renal, presença de fator reumatóide, múltiplas gestações, fibrose cística, doença hepática, lupus eritematoso e vacinação pelo HIV (ACHER & WILBER, 1990; GALLO, D. et al., 1990; SANDSTROM, 1986).

A amostra é diluída, colocada sobre o antígeno fixado na lâmina contendo células e incubada para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Após lavagens, a preparação é incubada com conjugado fluorescente e, se houver anticorpos na amostra, o conjugado reage com os anticorpos específicos. A substância mais usada é o isotiocianato de fluoresceína (FITC), um fluorocromo ligado a antiimunoglobulina humana. O teste requer um microscópio de fluorescência para leitura da reação. As células coradas são examinadas em um microscópio que expõe a luz ultravioleta capaz de excitar o corante fluorescente, o qual emite luz em um comprimento de onda

característico, visualizada por meio de filtros adequados. A interpretação ocorre em função do percentual de células que apresentem fluorescência baseada na presença de padrão característico de reatividade.

A metodologia de Western-Blot considerada o padrão ouro para confirmação do resultado reativo observado na etapa de triagem possui alta especificidade e sensibilidade, porém seu custo é elevado. O antígeno viral é fracionado através da técnica de eletroforese em um gel de policrilamida com duodecil sulfato de 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 EIE, entretanto a detecção da reação é realizada por cromatografia, nas próprias tiras de nitrocelulose.

A técnica de WB permite evidenciar anticorpos contra nove (9) proteínas do HIV: gp 160, gp 120, gp41, p66, p31, p55, p24, p17 além da gp 36, que caracteriza o HIV - 2 e o critério de interpretação é estabelecido pelo fabricante do kit (TSANG & PERALTA, 1983; A. R. Simons, 1983; CDC, 1989). Este ensaio apresenta alta especificidade e sensibilidade, mas também é subjetivo em sua interpretação. Entretanto, como permite discriminar a reatividade das amostras frente às proteínas do HIV-1, a ocorrência de um resultado positivo é reconhecida como sinônimo de infecção pelo HIV/aids.

Com os avanços tecnológicos recentes e o advento dos ensaios imunoenzimáticos de quarta geração, combinando detecção de antígeno e de anticorpo, resultados discordantes dos obtidos com o ensaio de WB podem ser encontrados, particularmente para amostras de indivíduos em estágios de infecção mais precoces. Entretanto, por sua capacidade discriminativa em relação às proteínas virais, o WB continua sendo o ensaio de referência padrão na sorologia da infecção pelo HIV/aids.

O conjunto de Imunoblot rápido (IR) para HIV-1, de Bio-Manguinhos, representa uma inovadora plataforma tecnológica de imunoensaio cromatográfico, de duplo percurso (DPP), para uso na etapa de confirmação do diagnóstico da infecção pelo HIV/aids. Além de poder ser aplicado a uma grande variedade de doenças, esse método amplia, em muito, o potencial de utilização atualmente existente para os TR convencionais de imunocromatografia de fluxo lateral, pois fornece resultados mais rápidos e precisos, além de permitir a

realização de ensaios multiplex com até cinco linhas de teste por cassete de reação. Vale destacar ainda, a ampliação dos níveis de sensibilidade (10 a 50 vezes maior que o ensaio de fluxo lateral), a adaptação a diferentes tipos de fluidos corporais (sangue, soro, plasma, saliva, urina, fezes, escarro, etc.) e o uso de volumes mínimos de amostra que essa metodologia permite (BRASIL/Manual de instrução Imunoblot Rápido DPP® HIV 1/ 2, 2009).

No IR, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos, representativos de regiões antigênicas do HIV-1 são imobilizados sobre uma membrana de nitrocelulose. Além das frações virais, as tiras apresentam regiões de bandas controle (não virais) usadas para estabelecer, por comparação, um limiar de reatividade para cada banda viral presente.

A possibilidade de contarmos com um ensaio confirmatório rápido assume uma importância especial, com a disponibilidade de estratégias terapêuticas bem sucedidas, que precisam ser iniciadas no período de 2 horas após exposição ao vírus como ocorre nos casos de exposição ocupacional ou, imediatamente antes do parto, para interrupção da transmissão vertical.

Apesar do amplo conhecimento sobre os mais diferentes aspectos da infecção pelo HIV-1, a mesma ainda encontra-se relacionada mais intensamente ao subtipo B, o mais prevalente nos Estados Unidos e Europa e, a partir do qual, foram elaborados os reagentes usados em diagnóstico, ensaios moleculares, desenvolvimento de vacinas e de anti-retrovirais. Implicações na diversidade dos subtipos virais em relação à sensibilidade de *kits* comerciais tanto para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 quanto para monitoração da infecção e em outros estudos relacionados foram observadas.

Vários aspectos relacionados a essa diversidade do HIV foram enfatizados com a observação de que nem todos os conjuntos comercialmente disponíveis eram capazes de detectar infecções causadas por variantes mais divergentes do HIV-1 como as pertencentes ao grupo O (LOUSSER-AJAKA et al., 1994; SIMON et al., 1994). Por conta desse achado, antígenos desses vírus foram incluídos nos testes de diagnóstico para garantir uma maior sensibilidade e especificidade desses testes (GURTLER, 1996). A sensibilidade dos testes de triagem precisa ser continuamente avaliada com um amplo painel de amostras com diferentes subtipos e de diferentes estágios da infecção.

Resultados falso-negativos e falso-positivos foram observados em kits comerciais de diagnóstico rápido da infecção pelo HIV, particularmente, em estudos com amostras de diferentes subtipos, não-B ou de diferentes grupos (CONSTANTINE et al., 1997; PHILLIPS et al., 2000). Um estudo realizado com seis testes rápidos, um ensaio imunoenzimático e um teste confirmatório e a comparação com um ensaio imunoenzimático de terceira geração usado como padrão-ouro, além de um teste de Western Blot revelou uma sensibilidade que variou de 94,6% a 100%, em função do teste usado, com amostras dos subtipos A – H, do grupo O, do HIV-2 e de HIV-1 +2. Os testes rápidos por ocasião da soroconversão tornaram-se positivos dois a oito dias após os ensaios enzimáticos de terceira geração realçando uma limitação dos mesmos. De acordo com os autores, os testes rápidos menos sensíveis para triagem de sangue devem ser substituídos por outros, com maior sensibilidade ou por EIE com maior sensibilidade e menor custo (MAKUWA et al., 2002).

1.5 - Justificativa

A IFI HIV-1 de Bio-Manguinhos é utilizada como o primeiro teste para a confirmação da reatividade ao HIV-1 no fluxograma de testes do PNDST /AIDS/ MS desde 1987. Desde então foram distribuídas mais de dois milhões de reações e atualmente são fornecidos cerca de 250.000 testes por ano para atendimento gratuito a 141 laboratórios da Rede Pública, com uma estimativa de 100 milhões de dólares economizados somente com este produto. Devido à produção nacional e a facilidade de execução esse método representa um importante instrumento de diagnóstico de custo reduzido.

Todavia, com o advento de novas metodologias dotadas de maior sensibilidade e especificidade, bem como, maior facilidade de execução tornou-se necessário realizar Estudo comparativo da Imunofluorescência Indireta frente a outros testes de diagnóstico que usam plataformas recém estabelecidas para avaliar o seu desempenho e a sua aplicabilidade no diagnóstico da infecção pelo HIV / aids.

Com este trabalho procuraremos melhorar o atendimento e o fornecimento de kits com elevado padrão de qualidade e que permitam aos laboratórios da

Rede Pública a realização de um diagnóstico sorológico confiável, além de atender as normas da ANVISA / MS.

2 – Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da metodologia de imunofluorescência indireta para HIV-1 (IFI/HIV-1) frente aos métodos de diagnóstico da infecção pelo HIV/aids. Os testes confirmatórios a serem usados na presente avaliação compreendem além da reação de imunofluorescência indireta (IFI) para HIV-1, Bio-Manguinhos, o Imunoblot Rápido, teste ainda em processo de registro junto a ANVISA / MS.

2.2 – Objetivos Específicos

1- Realizar uma avaliação comparativa de diferentes testes de diagnóstico, tais como, o Ensaio imunoenzimático Vironostika HIV Uni-Form II plus O, Biomérieux, o Teste rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos e o Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 – Bio-Manguinhos, frente ao Teste de Imunofluorescência Indireta para HIV-1 - Bio-Manguinhos, de acordo com o fluxograma disposto na Portaria n° 59/GM/MS, de 28 de janeiro de 2003, rec entemente substituída pela Portaria N° 151 SVS/MS, de 14 de Outubro de 2009.

2 – Testar amostras por meio de EIE (Vironostika) e pelo Teste rápido HIV-1/2 de Bio-Manguinhos, como parte da etapa de triagem para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV/AIDS.

3 – Realizar uma etapa de confirmação sorológica com as mesmas amostras que tenham sido testadas pelos testes IFI e IR de Bio-Manguinhos, que serão submetidas a um ensaio de WB

3 . Materiais e Métodos

3.1 - Amostras de sangue e locais de realização dos testes

As amostras de sangue (alíquotas de 1 ml de plasma) usadas no presente Estudo foram coletadas de 74 (setenta e quatro) indivíduos infectados pelo HIV que realizam exames de monitoramento da carga viral e contagem de linfócitos T CD4+/CD8+ no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, IPEC, Fiocruz e de 82 (oitenta e dois) doadores de sangue do Banco de sangue do Hospital Clementino Fraga Filho, da UFRJ. Os voluntários foram relacionados para participar do Estudo mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, no âmbito do Projeto de Avaliação dos Conjuntos de Diagnóstico Desenvolvidos por Bio – Manguinhos submetido ao CEP do IPEC / Fiocruz, em 28 de Abril de 2008 e aprovado em 08 de Junho de 2008, conforme o parecer consubstanciado 032 /2008 desse Comitê.

Os testes para detecção de anticorpos anti-HIV foram realizados no Laboratório de Virologia Molecular Animal, Lavimoan, do Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ e no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, LATED, Bio – Manguinhos, Fiocruz. Em caso de discordância entre os resultados dos conjuntos comerciais e os testes de Bio-Manguinhos poderá ocorrer contato com o voluntário para a coleta de uma nova amostra.

3.2 - Ensaio Imunoenzimático - Procedimento resumido

O produto Vironostika HIV Uni-Form II Plus O BioMérieux usado no Estudo é baseado no princípio sanduíche de passo único, para determinação qualitativa de anticorpos contra o HIV-1 e HIV-2 e de antígenos HIV-1 no soro ou plasma humano.

Nesse ensaio, a reação é realizada em placas de microelisa contendo 12 tiras com 8 cavidades cada, revestidas com antígenos do HIV-1 (gp160, p24 e peptídeo ANT70 correspondente ao subtipo O) e do HIV-2 (env) e cada uma, com uma esfera de conjugado marcada com peroxidase, da mesma mistura de antígenos.

Na primeira etapa, adiciona-se às cavidades um diluente de amostra para dissolver a esfera de conjugado. Após a adição de cada amostra de plasma ou

do controle apropriado contendo anticorpo, a placa é incubada a 37 °C por 60 minutos.

Caso anticorpos para o HIV-1 ou HIV-2 ou HIV -1 do grupo O estejam presentes na amostra formam-se complexos antígeno/anticorpo/enzima. Procede-se então à lavagem e incubação com o substrato tetrametilbenzidina (TMB), que determina o aparecimento de cor amarela quando a reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico. Se a amostra não possui anticorpos contra o HIV, não há o desenvolvimento de cor após a adição do TMB.

3.3 - Teste Rápido - HIV-1/2 – Bio-Manguinhos - Procedimento resumido

Esse produto usa um coquetel de antígenos para detectar anticorpos contra o HIV-1 e HIV - 2 no soro, plasma e sangue total humanos. Em sua composição, esse kit usa uma proteína conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos de HIV-1 e HIV - 2 ligados a uma membrana de nitrocelulose. Após a identificação do suporte do teste com o número da amostra e o número do lote do kit do qual o teste foi retirado, verifica-se a integridade de todos os componentes e a inexistência de linhas na janela do suporte de teste.

Para a realização do método, cada amostra de sangue é aplicada ao poço de reação, seguindo-se a adição de um tampão de corrida que permite o fluxo lateral dos componentes liberados, propiciando a ligação dos anticorpos aos antígenos. Quando presentes, os anticorpos se unem às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal e o complexo migra através da membrana, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do teste, produzindo uma linha roxo/rosa. A amostra continua migrando através da membrana produzindo uma segunda linha roxo/rosa na área de controle. Esta linha, que aparece tanto nas amostras negativas quanto nas positivas serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste. A reação desenvolve-se por 10 minutos à temperatura ambiente e os resultados lidos após 10 minutos da adição do tampão. Caso não ocorra migração após 3 minutos, descarta - se o suporte.

3.3.1 - Leitura e Interpretação do teste – Apresentados nas Figuras 5,6 e 7.



Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área Controle (C) e nenhuma linha na área Teste (T). Um resultado não reagente em 10 minutos indica a ausência de anticorpos para HIV-1/2 na amostra.

Figura 5 - Resultados não reagentes – TR



A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área Controle (C) e outra área Teste (T) indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área Teste (T) varia de claro a muito escura conforme a concentração de anticorpos específicos. A linha na área Teste (T) pode ter aparência diferente da linha na área Controle (C). Isto não invalida o teste.

Nota: mesmo uma linha muito clara na área de Teste (T) deve ser considerada um resultado reagente. Um resultado reagente deve ser confirmado conforme as recomendações do MS (Ministério da Saúde).

Figura 6 - Resultados reagentes - TR



Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de Controle (C), não importando se a LINHA TESTE (T) aparece ou não na área devida. Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de Controle (C), o teste deve ser considerado inconclusivo ou inválido. Um resultado inválido ou inconclusivo de teste não pode ser interpretado. Descartar o material e repetir o procedimento com um suporte de teste e nova amostra.

Figura 7 - Resultados Inconclusivos ou Inválidos - TR

3.4 - Testes de Imunofluorescência indireta (IFI) para HIV-1 de Bio-Manguinhos

Este teste consiste na reação de soro ou plasma humano com células k37-3, infectadas pelo HIV-1, fixadas em lâminas de microscopia para fluorescência. Apenas 25 a 35% das células apresentam antígenos virais que podem ser detectados em sua superfície. A reação entre o antígeno fixado e o

anticorpo presente nas amostras é revelada, após a adição de conjugado anti-IgG humana - isotiocianato de fluoresceína (FITC), com o auxílio de um microscópio para fluorescência.

O protocolo de trabalho permite avaliar até 10 amostras de plasma por lâmina além dos controles positivo e negativo, presentes em todas as lâminas, para comparações no momento da leitura. As lâminas necessárias para testar as amostras são retiradas da refrigeração e deixadas à temperatura ambiente ou em estufa a 37 °C, por alguns minutos, até secar. Os controles positivo e negativo e os demais reagentes também devem estar à temperatura ambiente no momento do uso.

As amostras e os soros controles, positivo e negativo devem ser diluídos a 1:8 em tampão fosfato (PBS) 0,01M pH 7,2. Em seguida, são adicionados 10 µL das diluições das amostras e soros controle a cada poço das lâminas, seguindo o modelo apresentado na Figura 8.

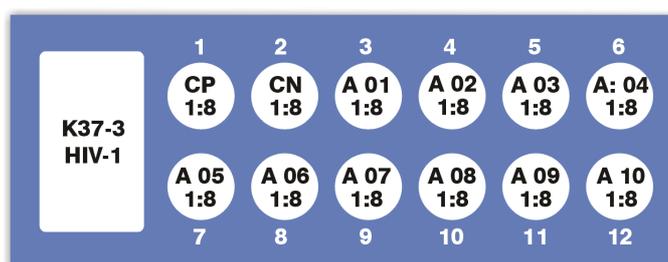


Figura 8 – Disposição das amostras nas lâminas de imunofluorescência

As lâminas são então incubadas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37 °C. Na etapa seguinte, as lâminas são lavadas 3 (três) vezes com PBS 0,01M pH 7,2 em cuba de lavagem apropriada, sendo cada lavagem feita por 5 minutos e, em seguida, as lâminas são rapidamente lavadas uma vez em água destilada. Segue-se a colocação das lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37 °C para secar.

Deve-se então preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS - Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Em seguida, o conjugado anti-Ig humana – fluoresceína é diluído na concentração adequada estabelecida com a titulação prévia em PBS-AE. Adiciona-se 15 µL da diluição do conjugado em todos os

poços das lâminas e incubam-se as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37 °C.

As lâminas, são lavadas 3 (três) vezes com PBS 0,01M pH 7,2 em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos para cada lavagem e, em seguida, uma vez em água destilada. Segue-se a colocação das lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37 °C para secar. Então 3 a 4 gotas de glicerina tamponada são adicionadas sobre cada lâmina, cobrindo-se com lamínula, evitando a formação de bolhas e mantendo-se ao abrigo da luz e a seco, até o momento da leitura.

3.4.1 - Leitura e interpretação da reação:

Usar microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X. Focalizar a lâmina na posição do soro controle positivo e observar a fluorescência presente em 25-35 % das células. Focalizar a lâmina na posição do soro controle negativo e observar a ausência de fluorescência nas células, bem como a coloração de fundo (*background*).

Proceder à leitura das amostras e considerar para a interpretação das amostras os padrões abaixo (Figuras 9,10 e 11):



Figura 9 – Padrão de leitura de amostra não reagente - IFI

Não reagente: Ausência de fluorescência em todas as células.

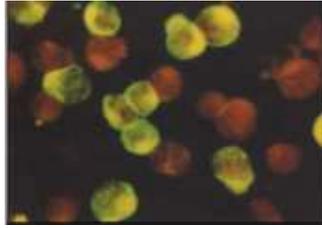


Figura 10 – Padrão de leitura de amostra reagente - IFI

Reagente: Ao redor de 25-35% das células apresentam fluorescência na membrana e em parte da célula. Algumas amostras podem apresentar reatividade pouco intensa, porém, sempre que observada a fluorescência no percentual indicado, a amostra será reagente.



Figura 11 - Padrão de leitura de amostra indeterminada - IFI

Indeterminado: Qualquer padrão diferente dos descritos anteriormente. Na maioria das vezes, observa-se reação fluorescente em todas as células. Neste caso, repita a reação e persistindo o resultado, submeta à amostra a outra metodologia confirmatória.

3.4.2 – Titulação do conjugado

A titulação do conjugado deve ser feita a cada novo lote de lâminas e quando o controle positivo apresentar redução da reatividade. Além disso, podem ocorrer variações na capacidade de resolução dos microscópios de fluorescência.

Na titulação do conjugado usa-se soro-controle positivo com título conhecido e soro-controle negativo ambos fornecidos com o kit. Realiza-se uma diluição seriada do soro-controle positivo a partir de 1/8 até o título indicado pelo fabricante. O soro controle negativo é utilizado a 1/8. Para a realização destas diluições usa-se PBS 0,01M pH 7,2. Em seguida procede-se à reação de

Imunofluorescência indireta como descrito no item 3.4 desta monografia até o momento da adição do conjugado.

Deve-se então preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS - Azul de Evans a 0,004% . Em seguida, o conjugado anti-Ig humana – fluoresceína deve ser diluído na concentração adequada estabelecida com a titulação prévia em PBS-AE a partir da diluição de 1/50, em série de fator 2 até o título indicado pelo fabricante. Cada diluição deverá ser adicionada pontualmente aos poços nas lâminas com as respectivas diluições dos soros - controle positivo e negativo.

Os passos seguintes são os mesmos descritos no item 3.4 e a leitura e interpretação da reação deverá obedecer aos padrões relacionados no item 3.4.1. Após a definição do título do conjugado procede-se ao diagnóstico das amostras sob avaliação.

3.5 - Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos – Procedimento resumido

O Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos utiliza uma combinação de antígenos de HIV-1 e HIV-2 ligados a uma membrana (fase sólida), anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal.

Remover o número necessário de dispositivos de testes das embalagens e colocar sobre uma superfície plana. Caso as amostras a serem testadas estejam refrigeradas, removê-las do refrigerador e permitir que atinjam a temperatura ambiente. Em seguida, rotular os dispositivos do teste com o número de identificação da amostra.

A amostra (5 µL de soro/plasma/sangue total) é então aplicada ao poço # 1 (Amostra + Tampão), seguida pela adição do tampão de corrida (50 µL – 02 gotas). O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos.

Esperar 5 minutos, tempo em que todas as linhas devem ter desaparecido e adicionar 4 gotas (135 µL) de tampão de corrida ao poço #2. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço # 2 (Tampão). O conjugado se liga aos anticorpos

específicos para HIV-1 ou HIV-2 produzindo uma ou mais linhas (roxa/rosa) na área do Teste (T). Na ausência de anticorpos para HIV-1 ou HIV-2 as linhas (roxa/rosa) não aparecem na área do Teste (T). Em todos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de Controle (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

3.5.1 - Leitura e Interpretação do teste

As leituras devem ser realizadas, 15 a 20 minutos após adição do tampão ao poço #2. O teste não deve ser lido com menos de 15 minutos. Para o teste ser válido é obrigatório a presença da linha controle de reação e os resultados devem obedecer aos padrões abaixo:

Negativo: presença de apenas uma linha referente ao controle da reação;

Positivo para HIV-1: presença da linha controle da reação e de duas ou mais linhas dentre gp160, gp120, gp41 e p24, correspondentes às proteínas virais impregnadas na membrana de reação;

Positivo para HIV-2: presença da linha referente ao controle da reação e da linha gp36 correspondente às proteínas virais impregnadas na membrana de reação e em alguns casos pode ser observada a presença da linha p24 e gp36.

Indeterminado: ocorrência de qualquer outro padrão de reação.

Observação: Na Figura 12, observar padrão de uma amostra positiva com presença de todas as linhas.



Figura 12 - Padrão de leitura de amostra positiva

3.6 - Reação de Western Blot - Procedimento resumido

O conjunto Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot kit é um teste qualitativo para detecção e identificação de anticorpos para o HIV-1 em soro ou plasma humano. Esse conjunto é fabricado a partir de HIV-1 cultivado em linfócitos T. O vírus parcialmente purificado sofre ruptura por detergente. Proteínas específicas do HIV-1 são fracionadas de acordo com seu peso molecular, por eletroforese em gel de poliácridamida, na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS). As proteínas de HIV-1 separadas são eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose bloqueada para diminuir a ligação de imunoglobulinas inespecíficas.

As tiras de nitrocelulose são incubadas individualmente com amostras ou controles. Durante a incubação, se os anticorpos para HIV-1 estiverem presentes na amostra, se ligarão aos antígenos virais ligados às tiras. As tiras são novamente lavadas para remover materiais que não se ligaram. A visualização das imunoglobulinas humanas especificamente ligadas às proteínas de HIV-1 pode ser observada após uma série de reações com anti-IgG humana de cabra conjugada com biotina, avidina conjugada com peroxidase eqüina (HRP) e substrato 4-cloro-1-naftol.

Se na amostra houver anticorpos contra qualquer um dos principais antígenos de HIV-1, em concentração suficiente, serão vistas na tira de nitrocelulose bandas correspondentes a posição de uma ou mais das seguintes proteínas (p) ou glicoproteínas (gp): p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120, gp160 (os números referem-se ao peso molecular aproximado em kilodaltons). Os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes do uso (aproximadamente 30 minutos).

Adicionar 2.0 mL de tampão de lavagem diluído em cada cavidade a ser usada. Usando uma pinça, remover a tira de nitrocelulose do frasco e colocá-la com o lado numerado para cima em cada cavidade contendo tampão de lavagem diluído. Colocar a bandeja no agitador ou em plataforma rotatória por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, remover o tampão por aspiração. Adicionar 2 mL do tampão de trabalho do *blotting* em cada cavidade.

Adicionar 20 µL de amostra não diluída ou controle em cada cavidade contendo sua tira específica em tampão de trabalho do blotting usando uma ponteira diferente para cada amostra. Tampar a bandeja e incubar no agitador ou em plataforma rotatória durante a noite (14-20 horas) à temperatura ambiente (20-28 °C).

Cuidadosamente destampar a bandeja para evitar respingos ou mistura das amostras. Remover a condensação ou gotículas na tampa da bandeja de incubação lavando com o tampão de lavagem diluído ou enxugando com toalhas absorventes. Aspirar a mistura das cavidades em um recipiente contendo desinfetante. Lavar a ponta do aspirador com tampão de lavagem diluído ou água deionizada entre as amostras para evitar contaminação.

Em cada tira, adicionar 2.0 mL de tampão de lavagem diluído e agitar várias vezes. Remover o tampão por aspiração. Adicionar 2.0 mL de tampão de lavagem diluído em cada tira por no mínimo 5 minutos. Repetir a operação aspirando o tampão de lavagem antes e entre cada uma das lavagens de 5 minutos. Realizar todos os passos de lavagem a temperatura ambiente no agitador ou em plataforma rotatória.

Adicionar 2.0 ml de solução 1 de trabalho de conjugado em cada cavidade. Incubar por 60 minutos à temperatura ambiente no agitador ou plataforma rotatória. Aspirar o conjugado das cavidades. Lavar cada tira três vezes por 5 minutos. Adicionar 2.0 mL de solução de trabalho 2 do conjugado em cada cavidade. Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente no agitador ou em plataforma rotatória. Aspirar os conjugados das cavidades. Lavar as tiras três vezes por 5 minutos.

Adicionar 2.0 mL de solução de trabalho do substrato em cada cavidade. Incubar a temperatura ambiente em agitador ou plataforma rotatória, por 10 a 15 minutos (ou até que o controle positivo fraco mostre as bandas p24 e gp160). Aspirar o substrato e parar a reação enxaguando as tiras duas ou três vezes com no mínimo 2 mL de água grau reagente.

3.6.1 - Leitura e Interpretação da Reação de WB:

Negativo: Nenhuma banda presente

Indeterminado: Qualquer banda presente, porém, sem padrão para critérios positivos

Positivo: Presença de quaisquer 2 ou mais das seguintes bandas: p24, gp41 e gp 120/160.

Cada banda tem uma reatividade + ou maior. Comumente, a banda gp41 ou gp160 é difusa. Outras bandas virais podem ou não estar presentes.

3.7 – Determinações de sensibilidade e especificidade dos testes

Para avaliar e comparar o desempenho da reação de imunofluorescência indireta para HIV-1 serão determinados os percentuais de sensibilidade e especificidade dos testes. (Quadro 5)

A sensibilidade permite mensurar a capacidade de um teste em identificar, com correção as amostras que efetivamente possuem certo atributo, no caso, a infecção por HIV/aids, o que caracteriza um resultado verdadeiro positivo (VP). A sensibilidade é calculada pela relação: $\text{Sensibilidade} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN} \times 100$

A especificidade permite identificar, com correção, uma amostra que não possui esse atributo, o que caracteriza um resultado verdadeiro negativo (VN). A especificidade é calculada pela relação: $\text{Especificidade} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FP} \times 100$

Variações no desempenho e interpretação do teste conduzem a resultados falso positivos (FP) e falso negativos (FN).

Quadro 5 – Possibilidades de resultado de um Teste

Resultado do Teste	Atributo: Doença / Infecção	
	Presente	Ausente
Positivo NP = VP + FP	Verdadeiro positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
Negativo NN = FN + VN	Falso Negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)

NP – Número total de amostras positivas

NN – Número total de amostras negativas

4. - Resultados

4.1 - Caracterizações da reatividade das amostras

As 156 amostras analisadas no Estudo oriundas de doadores de sangue (n=82) do Banco de sangue do Hospital Clementino Fraga Filho, da UFRJ e de indivíduos infectados pelo HIV (n=74) do Instituto de Pesquisas Clinicas Evandro Chagas, IPEC, Fiocruz foram caracterizadas quanto à infecção pelo HIV/aids.

Na etapa de triagem foram usados dois conjuntos de diagnóstico: Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos e EIE Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux. A confirmação da reatividade observada na etapa de triagem foi realizada com o Teste de Imunofluorescência Indireta IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos e com o Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos.

Nos casos em que houve discordância entre os resultados das etapas de triagem e de confirmação foi usado o conjunto Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot, teste padrão – ouro internacional para a confirmação da reatividade.

Das 82 amostras de provenientes de doadores de Banco de sangue do Hospital Clementino Fraga Filho, da UFRJ, a totalidade (100%) não apresentou reatividade para o HIV em ambos os testes (Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos e EIE Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux) usados na etapa de triagem. Resultados concordantes com relação à reatividade ao HIV-1 também foram observados em 74 das 74 amostras (100%) de pacientes do IPEC, Fiocruz analisadas nesses dois ensaios usados no Estudo (Quadro 6).

Na etapa de confirmação dos resultados observados com os testes de triagem foi possível verificar que 74 entre as 74 amostras (100%) de pacientes do IPEC analisadas apresentaram concordância nos dois testes (IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos e Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos) usados na avaliação.

Ainda com relação a essa etapa de confirmação foi observado que 72 das 82 amostras (87,8%) de doadores do Banco de sangue do Hospital Clementino

Fraga Filho, da UFRJ, não apresentaram positividade no Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos enquanto 80 dessas 82 amostras (97,6%) não revelaram positividade quando analisadas por IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos (Quadro 6).

Quadro 6 – Reatividade das amostras ao HIV

LAB	N	EIE		TR		IR		IFI		Total	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Concordantes	Discordantes
HU	82	82	0	82	0	72	10	80	2	70	12
IPEC	74	0	74	0	74	0	74	0	74	74	0
Total	156	82	74	82	74	72	84	80	76	144	12

N – Número de Amostras

LAB – Laboratório de origem das amostras

HU – Banco de sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ;

IPEC – Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, IPEC, Fiocruz;

EIE – Ensaio imunoenzimático Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux

TR – Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos

IR – Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

IFI – Teste de Imunofluorescência Indireta IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos

As amostras de doadores do Banco de sangue do Hospital Clementino Fraga Filho, da UFRJ que apresentaram resultados discordantes (n=12) nos testes de confirmação da reatividade ao HIV foram avaliadas pelo Ensaio Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot e os resultados encontram-se apresentados no Quadro 7.

A leitura visual das amostras testadas no Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos (Quadro 7) revelou para todas as amostras que apresentaram resultado reativo, bandas de intensidade muito fracas que não foram detectadas quando se usou um equipamento automatizado com medição baseada em refletância (leitor DPP).

Quadro 7 – Reatividade das amostras – Reação de Western Blot

IDENT	EIE	TR	HU				Resultado Final
			IR*	IFI	WB		
412	-	-	-	+	Negativo	Negativo	
428	-	-	+ (gp41 / gp160)	-	Indeterminado (p66f)	Indeterminado	
434	-	-	+ (gp120/gp41/p24)	-	Indeterminado (p24)	Indeterminado	
435	-	-	+ (gp160/gp120/gp41)	-	Indeterminado (p24f)	Indeterminado	
439	-	-	+ (gp160/gp120)	-	Negativo	Negativo	
441	-	-	+ (gp160/gp120/gp41/gp36)	-	Negativo	Negativo	
443	-	-	+ (gp120/gp41)	-	Negativo	Negativo	
449	-	-	+ (gp41/p24)	-	Indeterminado (p24, p51)	Indeterminado	
455	-	-	-	+	Negativo	Negativo	
457	-	-	Indeterminado (p24)	-	Negativo	Negativo	
466	-	-	+ (gp41p24)	-	Negativo	Negativo	
467	-	-	+ (gp 160/gp 120/ gp41)	-	Negativo	Negativo	

IDENT – Identificação da Amostra

EIE – Ensaio Imunoenzimático Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux

TR – Teste Rápido HIV-1/2 -Bio-Manguinhos

IR – Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

IFI - Teste de Imunofluorescência Indireta IFIHIV-1-Bio-Manguinhos

* - Bandas de intensidade muito fraca

4.2 – Determinações de Sensibilidade e Especificidade dos testes

Após a realização dos ensaios de triagem e confirmação da reatividade das 156 amostras do Estudo foi possível determinar os valores de sensibilidade e especificidade dos diferentes ensaios usados e estes são mostrados no Quadro 8. Valores iguais a 100% de sensibilidade e especificidade foram encontrados para o Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos e o EIE Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux. Quanto ao Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos observou-se um valor de sensibilidade igual a 100% e de especificidade igual a 87.8%.

O Teste de Imunofluorescência Indireta IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade igual a 100% e especificidade de 97.6%. Os percentuais de concordância entre os diferentes ensaios usados foram de 85,4% para o Banco de Sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ e de 100% para o Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, IPEC, Fiocruz.

Quadro 8 - Valores de Sensibilidade e Especificidade

LAB	EIE	TR	IR	IFI	Total
	Especificidade	Especificidade	Especificidade	Especificidade	Concordância
HU	100%	100%	87.8%	97.6%	85.4%
Intervalo	-	-	80.7-95%	94.2-100%	77.7-93%
	Sensibilidade	Sensibilidade	Sensibilidade	Sensibilidade	Concordância
IPEC	100%	100%	100%	100%	100%
Intervalo	-	-	-	-	-

LAB – Laboratório de origem das amostras

HU – Banco de sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ;

IPEC – Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, IPEC, Fiocruz;

EIE – Ensaio imunoenzimático Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux

TR – Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos

IR – Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

IFI – Teste de Imunofluorescência Indireta IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos

5 - Discussão

Nas últimas décadas, os testes laboratoriais têm constituído um instrumento precioso para o diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HIV/aids, com especial atenção à identificação da infecção recente e ao manejo dos indivíduos infectados. O uso de testes para a detecção de anticorpos anti-HIV em procedimentos seqüenciados com pelo menos um teste de triagem e um ou mais testes confirmatórios tem sido de grande utilidade (CONSTANTINE & ZINK, 2005).

A metodologia imunoenzimática, atualmente na quarta geração de testes que permitem a detecção de anticorpo e antígeno, simultaneamente, tem importante aplicabilidade na detecção da infecção recente e mesmo, na soroconversão, com custo benefício considerável. A maioria dos EIE possui excelente sensibilidade e boa especificidade, especialmente por usar vários formatos ou princípios metodológicos distintos, além de constituintes antigênicos diversos e por seu refinamento tecnológico. São testes de fácil execução e automação que podem ser usados em grandes rotinas para triagem de sangue e possuem custo / eficácia elevado (SAVILLE et al., 2001)

Os ensaios de triagem embora possuam alta efetividade, nem sempre são bem sucedidos na identificação correta de todos os indivíduos infectados e não infectados. Este fato pode ser decorrente de sensibilidade epidemiológica e analítica inadequadas, baixa sensibilidade na detecção do HIV-2 ou de variantes do HIV ou ainda, ser decorrência de erros técnicos (CONSTANTINE & ZINK, 2005). Em nossa avaliação, os ensaios de triagem (EIE Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux e o Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos) tiveram um ótimo desempenho sem fornecer nenhum resultado falso positivo, com especificidade igual a 100%.

A incorporação de testes rápidos a essa cadeia de métodos diagnósticos, particularmente em locais onde o sistema elétrico é deficiente ou instável e os recursos técnicos (equipamentos, infra-estrutura laboratorial, rede de frio, transporte, pessoal treinado etc.) são precários ou insuficientes, vem sendo estimulada e gradativamente efetivada. O uso de testes rápidos possibilita a obtenção de amostra por punção digital ou uso de fluído oral, além de punção venosa. O procedimento de teste é simples, rápido e de baixo custo e o seu

armazenamento pode ser feito em uma faixa de temperatura de 2 a 30 °C (CONSTANTINE & ZINK, 2005; KETEMA ET AL., 2001).

Os ensaios confirmatórios desenhados para apresentar maior especificidade do que os testes de triagem podem gerar resultados falso negativos com amostras de indivíduos em estágios iniciais da infecção uma vez que, sua sensibilidade é geralmente inferior a dos testes de triagem (CONSTANTINE & ZINK, 2005). Em nosso Estudo observamos uma concordância de resultados entre os ensaios de triagem (EIE Vironostika HIV Uni-Form II Plus O, Bio-Mérieux e o Teste Rápido HIV-1/2-Bio-Manguinhos) e os ensaios confirmatórios (IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos e o Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos) com valores de sensibilidade igual a 100% para todos os testes. Nenhum dos testes usados no Estudo forneceu resultados falso negativos.

A reação de Western Blot considerada padrão ouro para a validação dos resultados do diagnóstico para a infecção pelo HIV/aids é o ensaio confirmatório mais amplamente aceito. Apesar de subjetivo, de alto custo, tempo de execução elevado, de exigir pessoal treinado, equipamentos e infraestrutura laboratorial, ele é capaz de discriminar os principais antígenos / proteínas do HIV. Entretanto, é preciso estar atento para a possibilidade de proteínas da célula hospedeira na qual o HIV foi cultivado, estarem presentes na membrana de nitrocelulose e, caso a amostra em teste apresente anticorpos contra essas proteínas, a interpretação dos resultados pode ser equivocada (CONSTANTINE & ZINK, 2005).

O teste de imunofluorescência indireta pode em alguns casos fornecer resultados definitivos em amostra que apresentaram resultados indeterminados quando testadas por Western Blot. A reação de IFI – HIV é demorada, com várias etapas de incubação, interpretação subjetiva, requer microscópio de fluorescência de custo e manutenção elevados, pessoal treinado para realizar e interpretar os testes e a possibilidade de fornecer resultados indeterminados em decorrência de reações cruzadas inespecíficas. A sensibilidade e especificidade desse método equivalem aquelas do Western Blot (CONSTANTINE & ZINK, 2005).

O Imunoblot rápido (IR) para HIV-1, de Bio-Manguinhos, conjunto de diagnóstico ainda não registrado junto à ANVISA /MS é uma plataforma tecnológica de ensaio cromatográfico, de duplo percurso (DPP), desenhada para ser usada na etapa de confirmação do diagnóstico da infecção pelo HIV/aids, em substituição ao teste de IFI. Esse ensaio é capaz de fornecer resultados mais rápidos em torno de 15 minutos, dotados de alta precisão, com sensibilidade 10 a 50 vezes maior que o ensaio de fluxo lateral sendo adaptável a diferentes tipos de fluidos corporais (sangue, soro, plasma, saliva / fluido oral, etc.) e permitindo o uso de volumes mínimos de amostra.

Entretanto quando analisamos o desempenho da IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos e do Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos observou-se valores de especificidade de 97.6 % e 87,8%, respectivamente, com 02 e 10 resultados falso positivos. A ocorrência de resultados falso positivos no ensaio de IFI pode estar associada a uma reação com glicoproteínas do HIV (SAYRE ET AL., 1996).

As amostras de doadores do banco de sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ que apresentaram resultados discordantes nos ensaios confirmatórios foram avaliadas pelo Ensaio Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot. A não reatividade ao HIV foi confirmada em 08 / 12 amostras (66,6%) enquanto 04 / 12 amostras (33,3%) apresentaram padrão indeterminado com a presença de apenas uma banda específica do HIV (p66, p51 ou p24). Essas últimas amostras foram negativas na reação de IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos.

Com relação ao Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos, 10 / 12 amostras (83,3%) apresentaram bandas de intensidade muito fracas por ocasião da leitura visual. Esse achado não foi observado quando o equipamento automatizado (leitor DPP) foi usado. Acreditamos ser importante reavaliar os critérios de interpretação visual e a intensidade / característica das bandas observadas no Imunoblot rápido no sentido de adequar e uniformizar os padrões de reatividade e definir melhor o ponto de corte do teste. Tais amostras quando analisadas pelo WB Cambridge confirmaram o resultado indeterminado com ocorrência de apenas uma banda enquanto as demais se revelaram negativas.

A análise dos resultados sugere que não há associação entre o Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos e o Ensaio Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot, no que se refere às bandas observadas e entre o Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos e a IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos quando um desses testes é positivo. Por outro lado, verificamos que quando dois testes confirmatórios são usados a concordância de resultados é superior a 66% e pode ser maior se os resultados indeterminados não forem levados em consideração.

A presente avaliação ficou comprometida pela impossibilidade de realizarmos todos os ensaios inicialmente previstos por ser a mesma, parte de um Estudo Clínico ainda em andamento.

Nesse sentido não foi possível atender integralmente às etapas previstas no Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV no Brasil segundo a Portaria N.º 59 /GM/MS, de Janeiro de 2003. Ao realizarmos a avaliação com um EIE e um TR na etapa de triagem foi adotada uma das alternativas sugeridas na Portaria N.º 151 SVS/MS, de 14 de outubro de 2009 que admite o uso de TR nessa etapa.

Cabe ressaltar que na etapa de confirmação indica-se o uso de apenas um método confirmatório, que pode ser seguido pelo uso da reação de Western Blot em situações não conclusivas, mas não de duas metodologias em paralelo, como realizado para fins de comparação em nosso Estudo.

Observamos resultados similares entre a IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos e os ensaios de triagem usados e com relação ao Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos um desempenho aparentemente superior, mas que precisa ser mais bem analisado com os ajustes a serem feitos nesse ensaio, ainda não disponível comercialmente, principalmente com relação aos critérios de interpretação do teste.

A conclusão do Estudo clínico envolvendo todos os testes relacionados nesta monografia, além de outros kits sob avaliação, permitirá realizar considerações mais precisas sobre o desempenho e a eficiência dessas metodologias, em especial, da IFI-HIV-1-Bio-Manguinhos.

6. – Conclusão

Em decorrência dos resultados observados após a Avaliação do desempenho da metodologia de imunofluorescência IFI HIV-1 Bio - Manguinhos frente a outros métodos de diagnóstico da infecção pelo HIV /aids concluímos que:

- O desempenho da reação de IFI HIV-1 Bio - Manguinhos foi comparável aos dos ensaios de triagem - Ensaio imunoenzimático Vironostika HIV Uni-Form II plus O, Biomérieux e o Teste rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos - usados no Estudo;
- A reação de IFI HIV-1 Bio – Manguinhos apresentou valor de sensibilidade igual a 100% o que atende aos critérios estabelecidos pela ANVISA / MS;
- A reação de IFI HIV-1 Bio – Manguinhos apresentou maior concordância com o Ensaio Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot do que com o Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos e esse fato pode estar relacionado à necessidade de ajustes na interpretação desse método;
- O uso do Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos contribuirá para o aperfeiçoamento do processo de testes e a redução do tempo de realização desde a coleta da amostra até o diagnóstico final, do algoritmo de testes para detecção de anticorpos anti-HIV;
- O valor encontrado para a especificidade na reação de IFI HIV-1 Bio – Manguinhos foi de 97,6% e desta forma, torna-se necessário avaliar um maior número de amostras, além de realizar uma comparação mais abrangente com outros métodos confirmatórios de diagnóstico para que considerações mais precisas sobre o desempenho e eficiência possam ser feitas.

7 - Referências

ASCHER, M. s. and Wilber, J. C. immunofluorescence for serodiagnosis of Retrovirus Infection. **Arch. Pathol. lab. Med.** 114: 246-248, 1990.

BARRÉ- SINOUSI, F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**; 220(4599):868-71,1983.

BARRÉ- SINOUSI, F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet*. Jul 6; 348(9019):31-5. **Review**, 1996.

BRASIL. Manual de instrução Imunoblot Rápido DPP® HIV 1/ 2 - Bio-Manguinhos – Ensaio Qualitativo para Detecção de Anticorpos Específicos para a Confirmação da Infecção pelo HIV-1/2 em Amostras de Sangue Total, Soro ou Plasma Humano - 2009.

BRASIL. Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis do HIV – Testes de Triagem. Brasília: Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 1997, 67p. [on line]. Disponível em www.aids.gov.br. Acesso em Ago. 2009

BRASIL. Ministério da Saúde. Diagnóstico sorológico do HIV – Testes confirmatórios – Brasília: Programa Nacional de doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. 67p Il. (Série TELELAB), 1997.

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/sangue/legis/resolucoes. Acesso em Janeiro em 2008.

BRASIL. Portaria SVS/MS N°151, de 14 de outubro de 2009. Dispõe as etapas seqüenciadas e o Fluxograma Mínimo para o diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses, de uso obrigatório pelas instituições de saúde públicas e privadas.

BRINDEIRO R.M, Diaz R.S., Sabino EC., Morgado M.G., Pires I.L., Brigido L et al. and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (HIV BResNet): **a survey of chronically infected individuals.** *AIDS*. 17(7): 1063-1069, 2003.

SAYRE K.R., R. Y. Dodd, G. Tegmeier, L. Layug, SS Alexander and MP Busch. False-Positive HIV-1 WB tests in non-infected blood donors. *Transfusion*; 36:45-52, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL, Interpretation and use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. **MMWR** 38 (No. S-7): 1-7, 1989.

CHAN D.C., Fass D., Berger JM, Kim P.S., Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. **Cell**. 89(2):263-73,1997.

CLAPHAM PR, Weiss R.A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**.; 388 (6639): 230-1, 1997.

CLAVEL F., Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey M.A., Santos-Ferreira MO et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**; 233(4761): 343-6, 1986.

CONSTANTINE N.T., Zekeng L., Sangare A.K., Gultler L., Saville R., Anhary H & Wild C. Diagnostic challenges for rapid human immunodeficiency virus assays. Performance using HIV-1 group M and HIV-2 samples. *J.Hum.Virol.* 1997; 1(1):45-51.

CONSTANTINE N.T., Zink HIV testing technologies after two decades of evolution. **Indian J Med Res.**, 121(4): 519-38,2005.

CORNELISSEN M., Kampinga G., Zorgdragen F., Goudsmit J., UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by *env* show high frequency of recombinant *gag* genes. **J Virol.**; 70:8209-8212,1996.

COUTO-FERNANDEZ J.C., Silva-de-Jesus C., Veloso VG, Rachid M., Gracie R.S., Chequer-Fernandez S.L. et al. 2005 Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: acessem subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 100(1):73-8, 2005.

FERREIRA Jr. O.C., Ferreira C., Riedel M., Widolin M.R.V., Crippen P., Barbosa Jr. A., Brady W., for The HIV Rapid Test Study Group. Evaluation of Rapid Tests for anti-HIV Detection in Brazil. 19 (suppl 4):S70–S75, 2005.

GALLO, D., Hofman, M.N., E.T., George, J.G., C.V. Comparison of direct and Membran Fluorescence Assays for the Diferenciation of antibodies tu Human Immunofluorescency Virus Types 1 and 2. **J. Clin. Microbiol.** 30: 2275-2278, 1990.

GALVÃO-CASTRO, B., Ivo-dos-Santos J., Couto-Fernandez J.C., Bonguertz V., Chequer-Bou-Habib D., Sion F.S., Barth O.M., Pessoa M.H.; Pereira M.S. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency vírus (HIV) in Brasil. **Mem Inst Oswald Cruz**, v. 82, n. 4. 453-456, 1987.

GAO F., Yue L., White A.T., Pappas PG, Barchue J., Hanson A.P. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. **Nature.** 358(6386):495-9, 1992.

GOTTLIEB M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan PT, Wolf R.A., Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N Engl J Med.** 305(24):1425-3, 1981.

GULTLER L., Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet.* 1996; 348(9021): 176-179.

GUIMARAES M.L., dos Santos Moreira A., Loureiro R., Galvao-Castro B., Morgado M.G.; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 18(17):1261-9, 2002.

HIRSCH V.M., Olmsted R.A., Murphey-Corb M., Purcell R.H., Johnson P.R.. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature.** 339(6223):389-92, 1989.

HOFFMAN, C. & Kamps, B.S., Pathogenesis of Infections. HIV Medicine : A Medical Texbook 1 :17-40, 2003.

KETEMA F., Zeh C, Edelman DC, Saville R, Constantine NT. Assessment of the performance of a rapid, lateral flow assay for the detection of antibodies to HIV. **J Acquir Defic Syndr.** 72: 63-70, 2001.

KISSIN, DIMITRI. M. [et al]. Rapid HIV and prevention of perinatal transmission in high risk maternity hospital in St. Petersburg, Russia. **American Journal of obstetrics & Gynecology**. <www.ajog.org> Acesso em Fev. 2008.

LOUSSERT-AJAKA I., Ly T.D, Chaix M.L, Ingrand D., Saragosti S, Courouce A.M., HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. **Lancet**. 343(8910):1393-4, 1994.

MACHADO AA & Costa JC. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). *Medicina*, Ribeirão Preto, 32:138-146, abr./jun. 1999.

MAKUWA M. , Souquiere S., Niangui M.T., Rouquet P., Apetrei C., Roques P., Simon F. Reliability of rapid diagnostic tests for HIV variant infection. **J Virol Methods**. 103(2):183-90, 2002.

MANUAL DE DST – Infecção pelo HIV. Disponível em http://www.aids.gov.br/assistencia/mandst99/man_infeccao.htm. Acesso em Março de 2008.

MORGADO M.G., Sabino E.C., Shpaer E.G., Bongertz V., Brigido L., Guimaraes M.D. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retrov**. 1994; 10: 569-576, 1994.

MORGADO M.G., Guimaraes M.L., Galvão-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(2): 143-50, 2002.

MORIMURA. Maria Celina [et al]. frequência de tietagem rápida para o HIV durante a admissão para o parto em puerperas no instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. **Rer. Brás. Saúde Matern. Infanti.**, Recife, 6 (supl 1): S69-S76, 2006.

OBID - Observatório Brasileiro de Informações Sobre Drogas.<http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/conteudo/index>. Acesso em Janeiro de 2010.

PHILLIPS, S, GRANADE, TC, Pau, CP, Candal, D, Hu, DJ & Parekh, BS. Diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection with different subtypes using rapid tests. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 7(4):698-699,2000.

PINTO, PINHEIRO, VIEIRA & ALVES, VIEIRA F.C., ALVES M.D.S. Compreensão da Pandemia da Aids nos últimos 25 anos. **Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmitida**, 19(1): 45-50 – ISSN: 0103 – 4065, 2007.

POPOVIC M., Sarngadharan M.G., Read E., Gallo R.C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science.** ; 224(4648):497-500, 1984.

RIBEIRO, A.F., et al., In: Veronesi. Tratado de Infectologia. 3. ed. Vol. 1 Parte 2. Rev. e atual, 2005.

SANDSTROM, M. G., Maclaren, M. E., Essex, E., Gallo, R. C. E Hirsh, M. S. Detection of Human anti-HTLV-III antibodies by Indirect Immunofluorescence Using Fixed Cells. *Transfusion*, 25/41:308-12, 1986.

SAVILLE R, Constantine NT, Cleghorn FR, Jack N, Bartholomew C, Edwards J, et al. Fourth generation immunoassay for the simultaneous detection of HIV antigen and antibody utilizing an automated platform. **J Clin Microbiol**; 39: 2518-24, 2001.

SIMON F., Ly T.D., Baillou-Beaufils A., Fauveau V., De Saint-Martin J., LouSSERT-Ajaka I., et al. Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. **AIDS.** 8(11): 1628-9, 1994.

SOARES M.A., Oliveira T, Brindeiro R.M, dias R.S., Sabino E.C., Brigido L., et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS.* 2003; 17:11-21

TSANG, V. C. W., J. M. Peralta., A. R. Simons. Enzymelinked Immunoelctrotransfer Blot Techinques (EITB) for Studyng the Specificities of Antigens and Antibodies Separated by Gel Electrophoresis. **Methods in Enzymology** 92:377-391, 1983.

UNAIDS - Joint United Nations Programme on HIV/Aids. <http://www.unaids.gov> . Acesso em Dez 2009.

ZHU T., Korber B.T., Nahmias A.J. Hooper E., Sharp PM, Ho D.D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*. 1998; 391(6667):531-2, 1998.