

Princípio do teste VIKIA HBsAg

Os testes rápidos utilizados para triagem da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) baseiam-se na técnica de imunocromatografia de fluxo lateral, que permite a detecção do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) no soro, plasma ou sangue total.

Os testes rápidos para detecção de HBsAg que são enviados aos estados e municípios pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV), são adquiridos através de processo licitatório. Em 2013, o kit VIKIA HBsAg foi o produto licitado (Figura 1) e, na medida em que outros kits forem adquiridos, novas aulas serão incluídas nos cursos da Série Telelab.



Figura 1 – Kit Vikia

O “VIKIA HBsAg” é um teste qualitativo de imunocromatografia de fluxo lateral para a pesquisa do HBsAg circulante. É baseado na associação de anticorpos monoclonais e policlonais contra o HBsAg, permitindo a detecção dos principais subtipos circulantes do vírus B.

O teste é composto por um suporte que contém uma membrana de nitrocelulose, uma área (S) para colocação da amostra e tampão e outra (janela de leitura) para leitura do resultado. Entre as duas áreas, na membrana de nitrocelulose, estão impregnados dois conjugados constituídos por uma mistura de dois anticorpos monoclonais anti-HBs ligados a microesferas de poliestireno de cor vermelha e um complexo BSA-biotinilado¹ ligado a microesferas de poliestireno de cor azul.

1 - BSA-biotinilado – é um conjugado composto de albumina de soro bovino (BSA) ligado a biotina.

A amostra é dispensada no poço designado por “S” (do inglês *sample*, ou amostra, em português) e migra por capilaridade ao longo da membrana de nitrocelulose. Se o HBsAg estiver presente na amostra, vai formar um complexo antígeno-anticorpo com os anticorpos específicos contra o antígeno de superfície do vírus B (anti-HBs) presentes nas microesferas vermelhas.

Os complexos antígenos-anticorpos migram ao longo da membrana e ligam-se aos anticorpos anti-HBs, fixados na janela de leitura, na área de Teste (T), formando uma linha vermelha, visível na membrana. O princípio metodológico do teste é mostrado de maneira resumida na Figura 2.

Ao mesmo tempo, o complexo BSA-biotinilado, ligado às microesferas azuis impregnadas na membrana, migra com a amostra e liga-se ao anticorpo anti-biotina, imobilizado na área de Controle (C), formando uma linha azul visível.

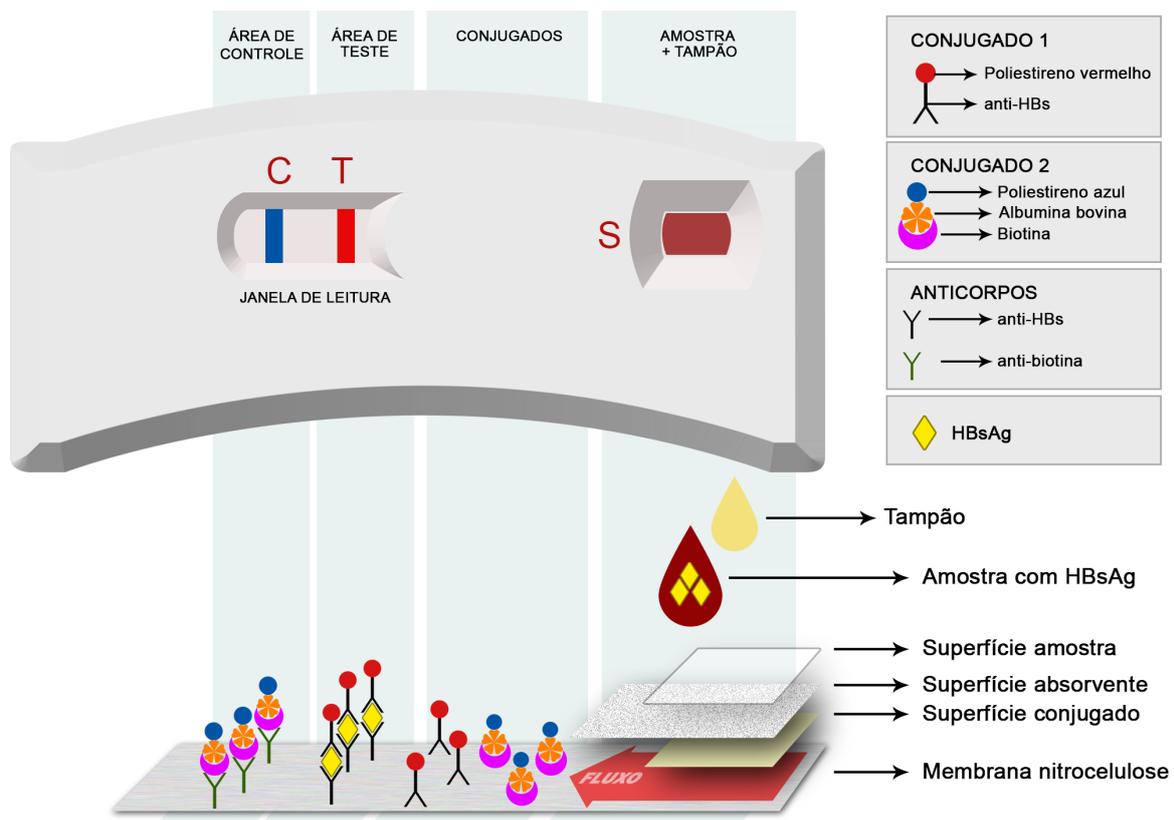


Figura 2 – Princípio metodológico do teste VIKIA HBsAg

Composição do kit VIKIA HBsAg e materiais complementares

Composição do kit VIKIA HBsAg

O conjunto diagnóstico, apresentado na Figura 3, contém os elementos relacionados na sequência de 1 a 5.



Figura 3 - Elementos no kit HBsAg

- 1 Lanceta para punção digital
- 2 Vinte e cinco envelopes lacrados, cada um contendo:



- um dispositivo (ou placa) de teste pronto para uso
- uma micropipeta para coleta do sangue*
- um sachê com sílica

- 3 Solução tampão: frasco conta-gotas contendo 3 mL da solução.
- 4 Instruções de uso do kit.
- 5 Tubos capilares.

O Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (DDAHV) recomenda aos profissionais que realizam a coleta por punção digital que utilizem o capilar fornecido juntamente aos kits distribuídos pelo Ministério da Saúde em vez das micropipetas de plástico contidas no envelope lacrado.



*A micropipeta contida no envelope (item 2) não é utilizada para coleta de amostras com **punção digital**. Ela é indicada para utilização de plasma, soro ou sangue total obtidos por **punção venosa**.

Embalagem

Na embalagem do *kit*, o fabricante utiliza alguns símbolos que necessitam de interpretação. Observe, no quadro a seguir, o que cada um significa.

	Referência de catálogo
	Fabricante
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Limites de temperatura
	Prazo de validade
	Código de lote
	Consultar as instruções de utilização
	Conteúdo suficiente para “n” testes
	Não reutilizar

Quadro 1 - Símbolos presentes na embalagem do *kit* HBsAg



Quando realizar o teste, registre o número do lote do kit no seu protocolo de trabalho. Os dispositivos de teste, diluente e lancetas apresentam números de lote individuais, mas o número do lote para registro é o que está gravado na caixa.

JAMAIS UTILIZE TESTES FORA DO PRAZO DE VALIDADE

Materiais necessários não fornecidos

Além dos elementos fornecidos no kit, são necessários os seguintes materiais para a execução do teste rápido:

- Equipamentos de proteção individual (EPIs);
- Equipamento para marcar tempo (cronômetro ou relógio);
- Álcool 70%;
- Algodão ou gaze;
- Água sanitária ou solução de hipoclorito de sódio entre 2,0 a 2,5%;
- Recipiente para descarte de material biológico e perfurocortante.
- Caneta tipo marcador para escrever no dispositivo de teste
- Papel absorvente para forrar a área onde serão feitos os testes rápidos

Cuidados e precauções para utilização

O manuseio e execução dos testes rápidos necessitam de alguns cuidados.

O teste é exclusivo para diagnóstico *in vitro*, e deve ser realizado por pessoas que tenham participado de capacitação técnica, presencial ou por meio de ensino a distância.

Utilize os reagentes de cada kit até a data de validade definida pelo fabricante, estampada na parte externa da embalagem. Quando acabar o dispositivo de teste ou qualquer reagente do kit, jogue todo o restante fora em recipiente apropriado.

O dispositivo de teste é descartável, e ele deve ser conservado no envelope lacrado até o momento da utilização.

Para a manipulação do *kit*, deverão ser adotadas todas as precauções que se aplicam aos produtos potencialmente infecciosos, o que inclui não ingerir nem inalar tais produtos, bem como descartar os seus componentes apenas em local apropriado.

!

Todas as amostras devem ser consideradas potencialmente infectantes, e devem ser manipuladas e descartadas de acordo com as precauções de utilização e descarte recomendadas no Brasil pela RDC/ANVISA nº 306 de 07/12/2004 e suas atualizações, ou em conformidade com a regulamentação em vigor no país de utilização.

Condições de armazenamento e estabilidade

Os componentes do kit permanecerão estáveis até a data de validade indicada nas respectivas embalagens, se forem conservados nas condições exigidas, listadas a seguir:

- Para uso exclusivo *in vitro*;
- Utilizar até a data de validade;
- Manter o dispositivo no envelope lacrado até a utilização;
- Proteger da umidade e da luz solar
- Conservar o *kit* em temperatura entre 4 e 30°C.



Os *kits* podem ser armazenados em geladeira (4 a 8°C), mas sempre na parte de baixo, para evitar que congelem, ou em temperatura ambiente (armários ou estantes), **desde que dentro da faixa recomendada pelo fabricante.**

Caso não seja possível controlar a temperatura do local de armazenamento, os *kits* devem ser acondicionados em caixas térmicas e retirados apenas na hora do uso.



Figura 4 – Exemplos de caixas térmicas disponíveis no mercado

Coleta e preparação da amostra

Para realizar o teste rápido é necessário que a coleta da amostra seja feita respeitando as recomendações do fabricante. Essas recomendações para uso correto do produto estão descritas no folheto informativo que é fornecido no *kit*. A coleta de amostra por punção digital é realizada com o auxílio de uma lanceta retrátil. A aspiração do sangue que brota na perfuração do dedo deve ser feita por meio do tubo capilar. Desta forma, embora o *kit* Vikia inclua uma micropipeta descartável (indicada para utilização de plasma, soro ou sangue total por punção venosa), o DDAHV recomenda a utilização do capilar fornecido em conjunto no *kit*.

A seguir, você acompanhará uma instrução passo a passo para a realização do teste para detecção do HBsAg. Porém, antes de iniciar o teste, lembre-se de deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente e, só então, retire o dispositivo do envelope lacrado e coloque-o numa superfície plana, limpa, livre de vibrações e forrada com material absorvente.

1



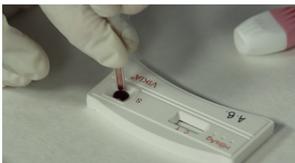
Selecione o dedo para punção, higienize a área com algodão embebido em álcool 70% e faça a punção do dedo com o auxílio de uma lanceta retrátil.

2



Recolha a amostra utilizando o tubo capilar. Mantenha o tubo capilar na posição horizontal e recolha o sangue até atingir a marca preta do tubo capilar, sem que haja a formação de bolhas de ar.

3



Em seguida, coloque o tubo capilar na posição vertical, tampe o orifício da frente com o dedo e, com a outra mão, aperte a extremidade do capilar para dispensar todo o volume de sangue na área do dispositivo de teste indicada com um "S". Não permita a formação de bolhas de ar no poço. Caso isso ocorra, repita o teste.

4



Imediatamente após a adição da amostra, adicione uma gota da solução tampão na mesma área (S) em que foi adicionada a amostra. Não permita a formação de bolhas de ar no poço. Caso isso ocorra, repita o teste.

5

Acione o cronômetro e marque 30 minutos, ler o resultado em 30 minutos; não interpretar o resultado do teste depois de 60 minutos.

!

Evite a formação de bolhas durante a aspiração do sangue e também ao adicionar a solução tampão. Isso pode levar a erros no volume adicionado e a não validação do teste.

Interpretação dos resultados

Após realizar os procedimentos descritos no passo a passo, é hora de fazer a interpretação dos resultados. Espere o cronômetro marcar 30 minutos para a leitura do teste. Não interpretar o resultado depois de 60 minutos.

Resultado não reagente

Quando o resultado for não reagente, aparecerá uma linha azul na área de controle (C) e **não** aparecerá nenhuma linha na área de teste (T) (Figura 5).



Figura 5 - Interpretação de resultado não reagente no *kit* Vikia

Resultado reagente

Quando o resultado for reagente (Figura 6), aparecerão duas linhas distintas, uma de cor azul na área de Controle (C) e uma de cor vermelha na área de Teste (T).



Figura 6 - Interpretação de resultado de teste reagente no *kit* Vikia

A linha vermelha poderá apresentar variações na intensidade da cor, porém, mesmo quando a coloração que surgir tiver uma intensidade muito fraca, a amostra será considerada reagente.

Teste inválido

O teste inclui um sistema de controle interno de migração representado por uma linha azul que aparece na área de controle (**C**).

Conforme é indicado no folheto que contém as instruções de uso definidas pelo fabricante, essa linha confirma que o teste foi corretamente executado e que o resultado obtido é válido.

Caso não apareça a linha azul na área **C** no tempo determinado pelo fabricante para leitura do resultado, ou seja, após 30 minutos da adição do tampão, o teste não será considerado válido, mesmo que a linha vermelha apareça na área **T** (Figura 7).



Figura 7a – Dispositivo apresentando um resultado de teste inválido no *kit* Vikia – ausência de linha na zona C e na zona T.



Figura 7b – Dispositivo apresentando um resultado de teste inválido no *kit* Vikia – ausência de linha na zona C e presença de linha na zona T.

Entre as causas prováveis para a invalidação do teste estão o armazenamento inadequado dos *kits*, volume insuficiente da amostra, volume incorreto do tampão e a execução incorreta do teste.

Se o teste for inválido, leia novamente as instruções do fabricante e repita o teste com a utilização de um novo dispositivo.

!

Se o problema persistir, não utilize mais nenhum teste desse lote.

Guarde o *kit* com problema, informe ao DDAHV o ocorrido e entre em contato com a empresa fornecedora do *kit*. Essa iniciativa é muito importante para o acompanhamento da qualidade dos testes e para que a empresa reponha o quantitativo de testes inválidos ao DDAHV.

Limitações do teste

O fabricante do teste Vikia orienta os usuários a respeito de limitações que o produto apresenta e que devem ser levadas em consideração na utilização dos *kits*. Para concluir esta aula, confira a seguir algumas dessas orientações.

- Um resultado não reagente no teste rápido não permite excluir uma infecção pelo vírus da hepatite B.
- O teste foi validado com soro, plasma e sangue total. Portanto, não deve ser utilizado com outros líquidos biológicos.
- **Pool de soro**² não deve ser utilizado.
- O resultado do teste deve ser sempre interpretado em conjunto com outras informações clínicas disponíveis.

2 - Pool de soro – ou pool de amostras, significa misturar partes iguais de diversas amostras. Por exemplo: Fazer 1 mL de um pool de 5 amostras de soro significa misturar 0,2 mL de cada uma delas.

Referências

1. Milich D.R., Immune response to the hepatitis B virus infection, animal models, vaccination, *Viral Hepatitis* 1997, 3, 63-103.
2. Hollinger F. B., Hepatitis B virus, in *Fields Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, 2739-2807.
3. Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S., A “New” Antigen in Leukemia Sera, *JAMA*, 1965, 191, 541-546.
4. Prince A. M., An antigen detected in blood during the incubation period of serum hepatitis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, 60, 814-821.
5. BioMérieux. Manual de uso do kit Vikia HBsAg. Disponível em: <http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_76>. Acesso em: 02 de set. de 2014.