Aula 5

Teste rápido Alere para o diagnóstico da hepatite C

Princípio do teste Alere HCV

Os testes rápidos utilizados para triagem da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) baseiam-se na tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral, que permite a detecção do anticorpo anti-HCV no soro ou sangue total.

Os testes rápidos para detecção de HCV que são enviados aos estados e municípios pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV), são adquiridos através de processo licitatório. Em 2015, o kit Alere HCV 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 – K*it* Alere HCV

Este é um teste qualitativo, baseado na utilização de antigenos de captura (core, NS3, NS4 e NS5), imobilizados na região do teste para identificação seletiva de anticorpos anti-HCV, em amostras de soro ou sangue total.

A amostra e a solução diluente são dispensadas no poço S (de *Sample*) e migram por capilaridade, ao longo da membrana.

Se houver anticorpos anti-HCV na amostra, eles ligam-se ao conjugado impregnado na membrana. Esse conjugado é composto por antígenos do HCV e de um conjugado de proteina A com **ouro coloidal**[1], que funcionará como o revelador do teste.

Em seguida, os anticorpos ligados ao conjugado fluem pela membrana do dispositivo de teste e são capturados pelos antígenos, imobilizados na área de Teste (T), presente na janela de resultados do dispositivo, produzindo uma linha colorida, na área de Teste (T).

Os conjugados que não se ligaram na área de Teste (T), continuam a fluir e se ligam aos reagentes imobilizados, na área de Controle (C), também presente na janela de resultados do dispositivo de teste. Uma linha colorida, será produzida na área do Controle (C), demonstrando que os reagentes do teste estão funcionamento.

1 - Ouro coloidal é o ouro em partículas muito pequenas (nanopartículas). Uma característica importante é que nesse formato de nanopartículas ocorre mudança da cor do ouro que deixa de ser amarelo e se torna vermelho em solução aquosa. É devido a esta característica que o ouro coloidal se tornou tão útil na revelação do resultado de um teste rápido.

Ver referência no final da aula: Sharma, V., Park, K. & Srinivasarao, M.

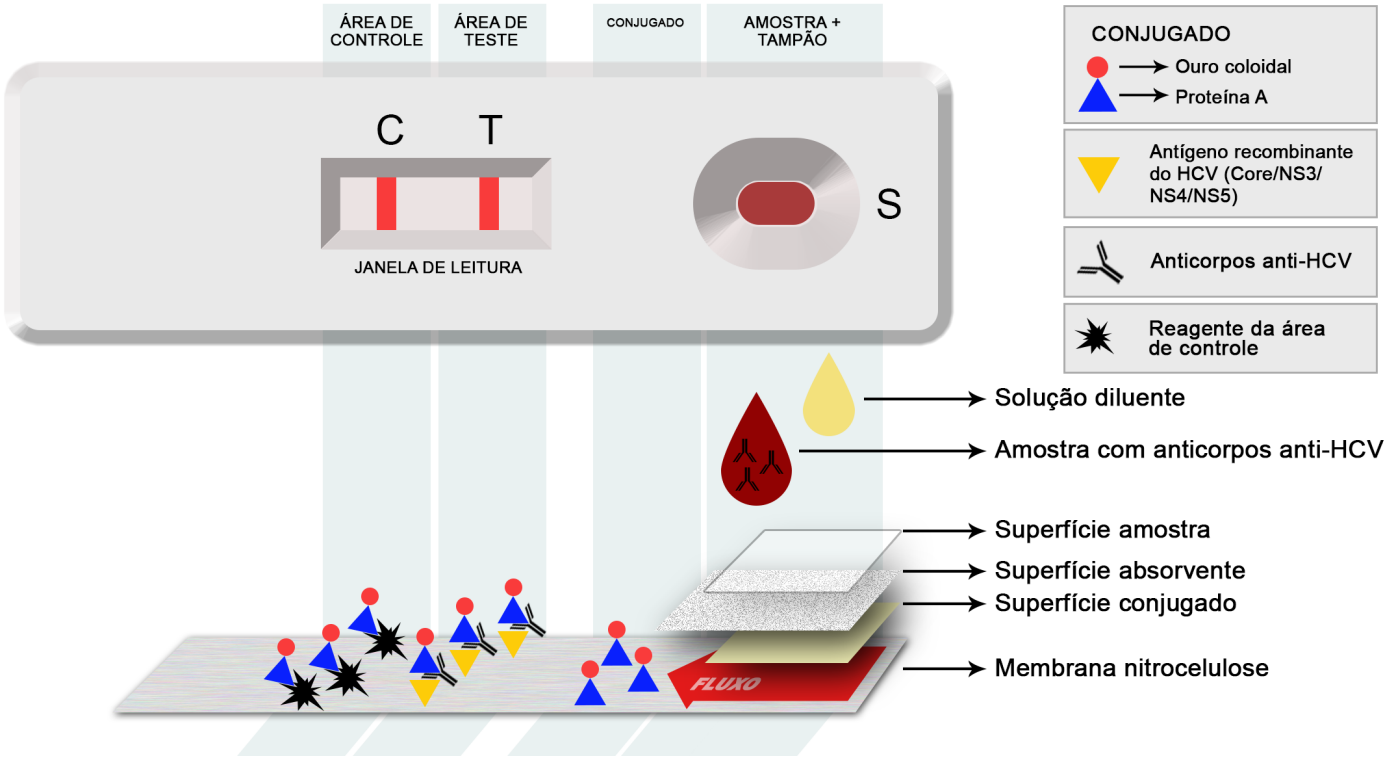


Figura 2 – Princípio metodológico do teste Alere HCV.

Composição do *kit* Alere HCV e materiais complementares

Composição do *kit* de testes Alere HCV

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



Figura 3 - Elementos no *kit* Alere HCV

1. 25 lancetas para punção digital.

2. 25 envelopes lacrados, cada um contendo:



   - um dispositivo (ou placa) de teste pronto para uso;
   - um sachê com sílica.

3. Embalagem contendo 25 pipetas capilares para coleta.

4. Frasco de solução diluente com 5 ml.

5. Instruções de uso do kit Alere HCV.

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 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. O kit deve estar com o sachê contendo gel de sílica intacto;
- Descartar o teste se houver qualquer alteração de cor do dessecante (sílica) de amarelo para verde. Essa alteração indica excesso de umidade;
- Conservar o *kit* em temperatura entre 1 e 30ºC.

!

Os *kits* podem ser armazenados em temperatura ambiente (armarios 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 seguir, você acompanhará a instrução passo a passo para a realização do teste rápido.

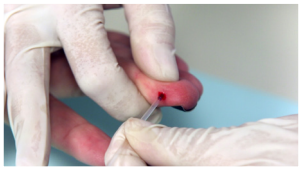
Antes de iniciar o teste, lembre-se de deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente e, só então, retire o dispositivo do envelope lacrado e coloque-o numa superfície plana, limpa, livre de vibrações e forrada com material absorvente.

1



Selecione o dedo para punção, higienize a área com algodão ou gaze embebida em álcool 70%, faça a punção no dedo com o auxílio de uma lanceta retrátil.

2



Para a coleta,aperte a pipeta capilar e posicione-a proximo à gota de sangue.Solte-a lentamente para que a amostra flua para seu interior ate atingir a marca preta (10uL).Não permita a formação de bolhas.

3



Em seguida, coloque a pipeta capilar na posição vertical e dispense uma gota (10uL) da amostra no poço do dispositivo de teste. Não permita a formação de bolhas de ar no poço. Caso isso ocorra, repita o teste com a realização de uma nova coleta.

4



Adicione cuidadosamente quatro gotas de solução diluente ao poço em que foi colocada anteriormente a amostra. Não permita a formação de bolhas.

5

Acione o cronômetro e faça a leitura do teste, entre 5 e até 20 minutos.

!

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

Interpretação dos resultados

Após realizar os procedimentos descritos no passo a passo, é hora de fazer a interpretação dos resultados. Fique atento ao cronômetro e leia o teste entre 5 e 20 minutos.

Não interprete o teste após 20 minutos da adição do diluente.

Não realizar a leitura após vinte minutos da adição da solução diluente. Após esse tempo pode ocorrer a ligação inespecífica de proteínas presentes na amostra ao ouro coloidal e a formação de uma linha na área de teste gerando resultados FALSO POSITIVOS. Por isso, um dispositivo onde a aplicação da solução diluente ocorreu há mais de vinte minutos deve ter seu resultado ignorado. O dispositivo deve ser descartado e o teste deve ser repetido com um novo dispositivo.

Resultado não reagente

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



Figura 5 - Resultado não reagente

Resultado reagente

Quando o resultado for reagente, aparecerão duas linhas coloridas, uma, na área Controle (C) e uma, na área de Teste (T). A linha colorida na área de teste (T) poderá apresentar variações na intensidade da cor, porém, mesmo quando a coloração que surgir tiver uma intensidade muito fraca, a amostra será considerada reagente (Figura 6).

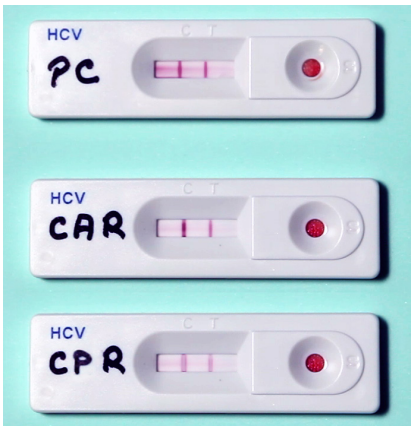


Figura 6 - Resultado reagente

Teste inválido

O teste inclui um sistema de controle interno de migração, representado por uma linha colorida, 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.
Se a linha de controle (C) não aparecer dentro do tempo máximo determinado pelo fabricante, o teste não será considerado válido, mesmo que a linha colorida apareça na área de teste (T).

Algumas das causas prováveis para a invalidação (Figura 7) do teste podem ser o armazenamento inadequado dos *kit*s, volume insuficiente de amostra, volume incorreto de diluente e a execução incorreta do teste.

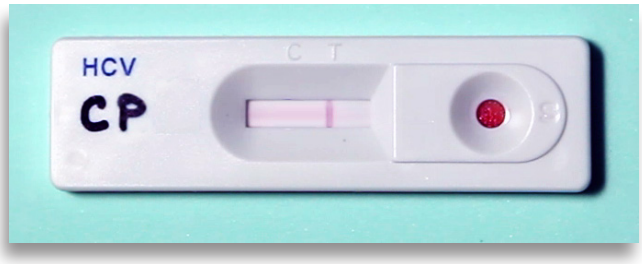


Figura 7 – Dispositivo apresentando um resultado de teste inválido – ausência de linha na área C e presença de linha na área T.

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

Se o problema persistir, use outro kit de outro lote para continuar seu trabalho.

Guarde o *kit* com problema, informe ao DDAHV o ocorrido e abra um chamado no Serviço de Atendimento do Consumidor da empresa fornecedora do *kit,* pelo telefone **0800 11 3363**, ou pelo e-mail **sac.brasil@alere.com**. 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

Na bula do produto, o fabricante do teste Alere HCV orienta os usuários a respeito de limitações que o produto apresenta e que devem ser levadas em consideração na utilização dos *kits*. Confira, a seguir, algumas dessas orientações.

- O teste foi validado com soro e sangue total. Portanto, não deve ser utilizado com outros líquidos biológicos;
- Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de infecção por HCV;
- O resultado do teste deve ser sempre interpretado em conjunto com as informações clínicas do indivíduo testado.

Referências

1. Bendinelli, M. et al.: Hepatitis C vírus: biology, patogenesis, epidemiology, clinical description and diagnosis, In: Specter, S. Editor. Viral hepatitis diagnosis, therapy and prevention. Humana Press: 65-127, 1999.

2. Choo, Q. –L.; Kuo, G. et al.: Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 244:359-62, 1989.

3. Fagn, E. A. and Harrison, T.J.: Hepatitis C virus (HCV). Viral Hepatitis, bios Scientific Publishers Limited: 131-66, 2000.

4. Part II. Detection and quantitation of HCV in serum. In: Lau, J.Y.N. editor. Hepatitis C protocols, Humana Press: 27-111, 1998.

5. Price, C. P. and Newman, D.J. editors. Principles and practice of immunoassay, 2nd ed. Macmillan Reference: 581-603, 1997.

6. Urdea, M.S. et al.: Hepatitis C: diagnosis and monitoring. Clinical Chemistry, 43 (8B): 1507-1511, 1997.

7. Alere. Manual de uso do kit Alere HCV.

ATÉ A PRÓXIMA!

Caro aluno, parabéns por ter se dedicado a este curso.

Desejamos que os conteúdos estudados possam contribuir de alguma forma para o seu sucesso profissional e pessoal. Agora, não deixe de se informar a respeito dos demais cursos disponibilizados pelo **TELELAB** no endereço eletrônico **www.telelab.aids.gov.br**.