

Aula 11

Etapa complementar para o diagnóstico da infecção pelo HIV – princípios metodológicos

As amostras com resultados reagentes, na etapa de triagem, devem ser submetidas à etapa complementar.

Nessa etapa, devem ser utilizados testes mais específicos que os de triagem. A finalidade desses testes é confirmar se os resultados reagentes, nos testes de triagem, são de fato decorrentes da infecção pelo HIV. Os testes complementares não são indicados para utilização na etapa de triagem.

Além disso, é importante que você saiba que ao utilizar um teste de 4.^a geração na etapa I do fluxograma e um teste capaz de detectar apenas anticorpos na etapa II (complementar), se o indivíduo estiver no início da infecção, é possível que os resultados entre os dois testes sejam discordantes.

Isso ocorre porque, em indivíduos recém-infectados, talvez ainda não existam anticorpos em circulação e apenas antígenos possam ser detectados. Nesses casos, o teste confirmatório a ser escolhido é o exame de quantificação da carga viral.

Imunoblot rápido

O Imunoblot rápido é um teste com a metodologia DPP (plataforma de duplo percurso). Utiliza como fase sólida uma membrana de nitrocelulose, na qual estão ligados antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos dos vírus HIV-1, incluindo o grupo O e HIV-2, que serão revelados em linhas diferentes.

Veja, a seguir, uma ilustração do dispositivo de teste Imunoblot rápido. Este teste apresenta três áreas:

- **área 1** – onde se aplicam a amostra e o tampão;
- **área 2** – onde se aplica o tampão para permitir a migração do conjugado;
- **área 3** – local de leitura do teste e onde estão fixados os seguintes antígenos:
 - Linha de Teste 1: gp 36 (HIV-2)
 - Linha de Teste 2: gp 160 (HIV-1)
 - Linha de Teste 3: gp 120 (HIV-1)
 - Linha de Teste 4: gp 41 (HIV-1)
 - Linha de Teste 5: p24 (HIV-1)
 - Linha de Controle C: Reagente da área de controle

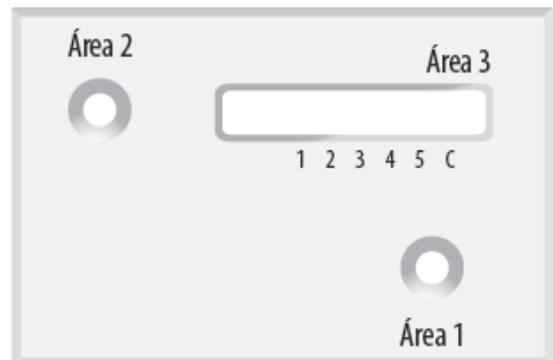


Figura 1 – Dispositivo do teste Imunoblot rápido.

Descrição:

- I. A amostra e o tampão são aplicados na área 1 do teste e migram em direção à área 3.
- II. Em seguida, adiciona-se o tampão na área 2, que permitirá a migração do conjugado – composto por proteína A e partículas de ouro coloidal – em direção à área 3.
- III. Se houver anticorpos na amostra, eles vão se ligar aos antígenos fixados na área 3. Em seguida, o conjugado vai se ligar aos anticorpos. Essas ligações serão visualizadas na membrana de nitrocelulose, na forma de linhas rosa ou púrpura, que indicam a presença de anticorpos na amostra (Figura 2).

Leitura e interpretação do teste Imunoblot rápido

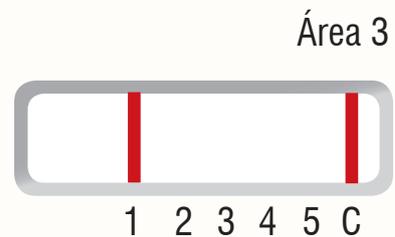


Para validar o resultado, em todos os testes, deve aparecer cor rosa/roxa na linha de controle.

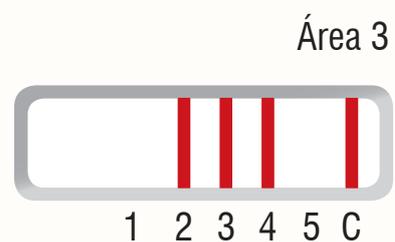
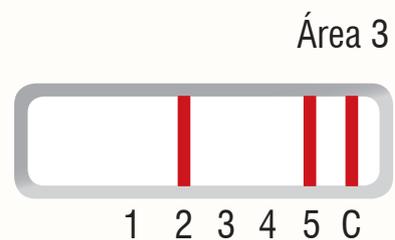
Resultado não reagente: Presença de cor rosa/roxa apenas na linha de controle (C).



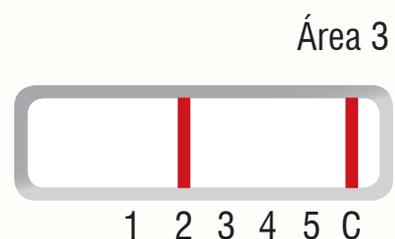
Resultado reagente para HIV-2: Presença de cor rosa/roxa na linha de controle (C) e na linha de teste 1. Eventualmente pode aparecer linha em 1 (gp36), 5 (p24) e em C (controle).



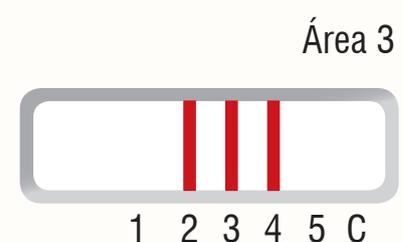
Resultado reagente para HIV-1: Presença de cor rosa/roxa na linha de controle (C) e em duas ou mais linhas (2, 3, 4 ou 5).



Resultado indeterminado para HIV-1: Presença de cor rosa/roxa na linha de controle (C) e em somente uma linha (2, 3, 4 ou 5).



Teste inválido: quando **NÃO** apresentar a linha na área de controle.



Western Blot (WB)

O WB é uma reação que utiliza, como fase sólida, uma membrana de nitrocelulose que possui, fixados, antígenos do HIV distribuídos de acordo com seu peso molecular.

Descrição:

As proteínas e glicoproteínas virais, que atuam como antígenos, são separadas por eletroforese – em gel de poliacrilamida, segundo seus pesos moleculares – e transferidas para a membrana de nitrocelulose.

A reação entre o antígeno adsorvido à membrana de nitrocelulose e os anticorpos da amostra é revelada por um processo enzimático.

Adiciona-se o conjugado 1, composto por uma anti-imunoglobulina humana conjugada com biotina. Adiciona-se o conjugado 2, que é composto de **avidina**¹ ou estreptavidina ligada a uma enzima.

Em seguida, adiciona-se o substrato (4-cloro-1-naftol). A degradação do substrato origina um produto insolúvel e corado que permite, a olho nu, a visualização da reação sobre a fita.

Alguns conjuntos diagnósticos de WB para HIV-1 podem utilizar outros sistemas de revelação, sem o emprego de avidina (ou da estreptavidina) e biotina.

Notas:

1 - avidina – proteína (obtida da clara do ovo) que se liga fortemente à molécula de biotina.

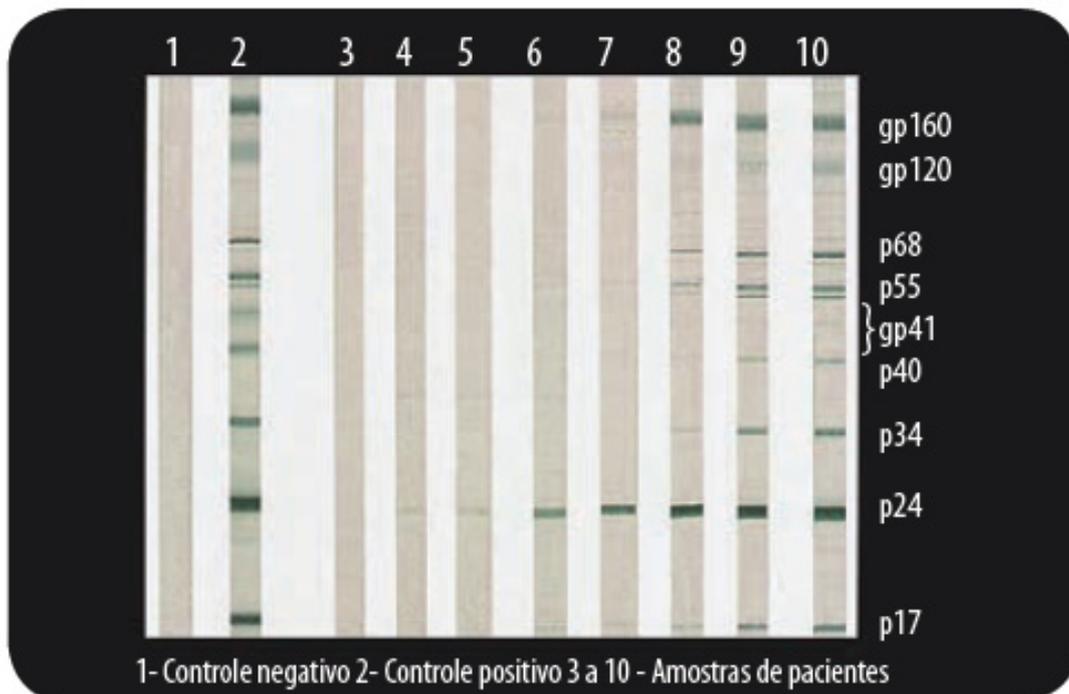
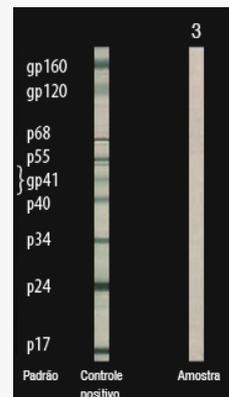


Figura 2 – Representação de testes Western Blot.

Interpretação do WB

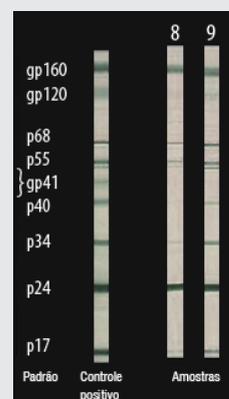
A interpretação do teste de Western Blot deverá seguir os critérios expostos adiante.

Amostra não reagente: ausência de reatividade (ausência de bandas), independentemente da proteína viral utilizada no ensaio.

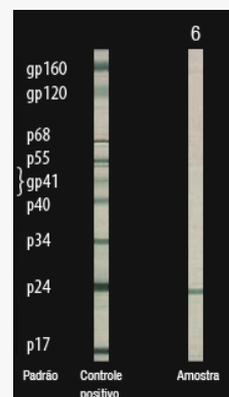


Amostra reagente: reatividade (presença de bandas), em pelo menos duas das seguintes proteínas: p24, gp41 e/ou gp120/gp160.

Obs.: para a interpretação do Western Blot, a presença de gp120 e(ou) gp160 é considerada como única banda. Assim, a presença de gp120 e/ou gp160 associada à presença de p24 ou gp41 caracteriza a amostra como reagente.



Amostra indeterminada: qualquer padrão de reatividade (presença de bandas) diferente do item anterior.



Procedimentos e cuidados na realização dos testes para detecção da infecção pelo HIV

2 - POP – Trata-se de protocolos que descrevem detalhadamente cada uma das atividades realizadas no serviço, desde a coleta até a emissão do resultado final do teste, com o objetivo de padronizar as ações dos profissionais envolvidos.

Os procedimentos variam segundo o fabricante do conjunto diagnóstico (kit) utilizado. Entretanto, algumas regras gerais devem ser observadas:

- Leia todas as instruções de uso do kit antes de iniciar a reação.
- Mantenha os **Procedimentos Operacionais Padrão (POP)**² atualizados, fazendo as alterações, sempre que o fabricante fizer modificações nas instruções de uso.
- Confira se todos os componentes, materiais e reagentes do kit estão disponíveis.
- Providencie os outros materiais necessários à realização dos testes.
- Deixe as amostras e os reagentes atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação.
- Utilize, exatamente, os volumes indicados. Não faça qualquer alteração com o intuito de economizar tempo ou reagentes.
- Faça um protocolo de trabalho (veja um modelo com o teste ELISA em anexo).
- Siga, rigorosamente, os ciclos de lavagem indicados pelo fabricante e tenha o cuidado de evitar a contaminação cruzada de amostras.
- Inclua, além dos controles fornecidos pelo fabricante, controles positivos e negativos produzidos em seu laboratório (Controle de Qualidade Interno – CQI).
- Se o procedimento do conjunto diagnóstico indicar a necessidade de leitura da absorbância em espectrofotômetro, utilize o(s) filtro(s) recomendado(s) nas instruções de uso.

Na sequência, estão descritos alguns cuidados importantes com os conjuntos diagnósticos:

- 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.
- Antes de iniciar o teste, verifique se os reagentes encontram-se límpidos, sem turvação, precipitados ou com coloração alterada.
- Não misture controles, conjugados, pérolas de diferentes lotes ou fabricantes.
- Armazene os conjuntos para diagnóstico de acordo com as recomendações do fabricante.
- Substratos devem ser estocados ao abrigo da luz, pois poderá ocorrer a fotodecomposição desses reagentes. Devem ser guardados longe do contato com substâncias oxidantes ou metais, para evitar sua decomposição, o que torna o produto impróprio para o uso.
- Faça a limpeza e a manutenção periódica dos equipamentos de lavagem, evitando, assim, o acúmulo de sais e de outros compostos químicos.
- Certifique-se de que o filtro de leitura da absorbância esteja íntegro, livre de fungos, de sujidades e devidamente ajustado.



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

Amostras para diagnóstico da infecção pelo HIV

As amostras podem ser de soro, plasma, sangue total ou sangue seco em papel-filtro. Elas devem ser coletadas em conformidade com o que é preconizado pelo fabricante do teste a ser utilizado.



É proibido utilizar mistura de amostras (pool) para a realização de qualquer teste laboratorial que tenha a finalidade de diagnosticar a infecção pelo HIV.

Identificação dos usuários que farão o teste para detecção da infecção pelo HIV

É obrigatória a solicitação de um documento oficial com foto do indivíduo que será submetido à coleta. Esse documento deve ser conferido tanto no momento do registro no Serviço de Saúde quanto no momento da coleta da amostra.

Essa exigência não se aplica aos serviços que realizam o diagnóstico anônimo da infecção pelo HIV. Neste caso, deve-se comunicar ao indivíduo, no momento do aconselhamento pré-teste, que não será entregue a cópia do laudo por escrito.

Erros que podem ocorrer na fase analítica

É possível que ocorram erros na etapa analítica. A seguir estão listados os principais.

- Troca de amostras.
- Erros de pipetagem: pipetas não aferidas, molhadas, volume incorreto.
- Vidrarias e recipientes mal lavados.
- Reagentes e padrões: contaminados, mal conservados, com validade vencida, erros no preparo dos reagentes, diluições erradas.
- Presença de interferentes na amostra: medicamentos, lipemia, hemólise, icterícia.
- Equipamentos não calibrados
- Erros no protocolo de automação.
- Cubetas arranhadas, com bolhas de ar ou contaminadas com outros reagentes.
- Comprimento de onda incorreto na leitura dos resultados.
- Erros na fonte de energia (luz)
- Sujeira no sistema óptico do equipamento
- Ajuste incorreto do zero
- Instabilidade na leitura fotométrica.
- Temperatura ambiente e (ou) da reação inadequadas.
- Tempo de reação errado.
- Erros na interpretação dos resultados.