

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Claudia Bastos Barroso

VALIDAÇÃO DE REAGENTES NACIONAIS PARA A PRODUÇÃO DO
TAMPÃO DE CORRIDA PARA O TESTE RÁPIDO HIV- 1 / 2

Orientador: Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida

Rio de Janeiro

2012

Claudia Bastos Barroso

**VALIDAÇÃO DE REAGENTES NACIONAIS PARA A PRODUÇÃO DO
TAMPÃO DE CORRIDA PARA O TESTE RÁPIDO HIV - 1 / 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Antonio Eugênio Castro Cardoso de Almeida

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Barroso, Claudia Bastos

Validação de reagentes nacionais para a produção do tampão de corrida para o teste rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos. / Claudia Bastos Barroso. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

xv, 78 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientador: Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida

1. HIV-1 / 2. 2. Diagnóstico Sorológico. 3. Teste Rápido. 4. Imunocromatografia. 5. Vigilância Sanitária.

Claudia Bastos Barroso

**VALIDAÇÃO DE REAGENTES NACIONAIS PARA A PRODUÇÃO DO
TAMPÃO DE CORRIDA PARA O TESTE RÁPIDO HIV- 1 / 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 26/04/12

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra. Helena Pereira da Silva Zamith
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ - RJ

Prof. Dr. José Antônio Pinto de Sá Ferreira
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

Prof. Dra. Cláudia Lamarca Vitral
Universidade Federal Fluminense / UFF-RJ

Prof. Dr. Antonio Eugênio Castro Cardoso de Almeida - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ - RJ

Rio de Janeiro
2012

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador Dr. Antonio Eugênio Castro Cardoso de Almeida, incansável nas orientações, ensinamentos, perseverança e dedicação na realização desta dissertação.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora desta dissertação: Helena Pereira da Silva Zamith, José Antônio Sá Ferreira e Claudia Lamarca Vitral.

Aos meus chefes Antônio Barbosa, Raouf Sykora e Marco Antônio Lemos, pela autorização para a realização do curso e das atividades envolvidas para a finalização deste estudo.

À Direção de Bio-Manguinhos por permitir o desenvolvimento profissional de seus funcionários e o acesso aos departamentos para a obtenção dos dados utilizados no presente Estudo.

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

À amiga Brígida Félix de Andrade pelo companheirismo, respeito, incentivo e carinho durante a elaboração da dissertação de mestrado.

Ao Antonio Gomes Pinto Ferreira (Tuninho), gerente do Programa de Desenvolvimento de Reativos para Diagnóstico, pelo estímulo e interesse no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria de Lourdes, chefe da ASCLIN, e sua equipe, por todo o apoio na realização desta dissertação.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação do INCQS pela oportunidade do desenvolvimento deste Estudo.

Aos amigos Adenauer Teixeira, Rafael de Oliveira Resende, Edinéa Pastro Mendes, José Antonio Ferreira, Paulo Pedro Ferreira Ribeiro, Rafael Alexandrino dos Santos Macedo e José Wanderley Pissurno pelo apoio, incentivo e ensinamentos, que contribuíram muito para a conclusão deste trabalho.

À Danielle Custódio e equipe do SECVI (Claudio, Alan, Anne, Regina Célia, e Lilian) pelo apoio prestado em todos os momentos em que estive ausente, necessários para a realização do curso e desenvolvimento dos experimentos.

À Ana Paula Bezerra, Jorge Batista e a equipe do SESOD/SERED pelo preparo das soluções utilizadas para a realização das atividades da dissertação.

Ao Edimilson Domingos da Silva, gerente do LATED/Bio-Manguinhos, pela valiosa colaboração e pela disponibilização do laboratório para a realização deste estudo.

Aos amigos do DERED pelo apoio, incentivo e amizade em todos os momentos que necessitei, por muitas vezes, de palavra amiga.

Obrigada!

RESUMO

A aids é um problema mundial de Saúde Pública. Com a necessidade de ampliar o acesso ao diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo HIV, foi incentivado pelo Ministério da Saúde o desenvolvimento de testes de elevada sensibilidade e especificidade, além de baixo custo para uso em rotina, visando a detecção de anticorpos para o HIV no sangue humano. Esses testes sorológicos são instrumentos para auxiliar no diagnóstico clínico, na proteção do suprimento de sangue e no monitoramento da infecção pelo HIV. Bio-Manguinhos, Unidade Técnica da Fiocruz, voltada para o desenvolvimento e produção de imunobiológicos, biofármacos e reativos para diagnóstico, tem estimulado o estabelecimento de plataformas tecnológicas que permitam o desenvolvimento e a incorporação de novos produtos e processos para a Saúde Pública. Na presente avaliação, amostras de plasma de indivíduos soropositivos e negativos para a infecção pelo HIV e de doadores de sangue, além de um painel comercial de título misto para anticorpos contra o HIV, foram utilizadas na validação de reagentes e insumos disponíveis no mercado nacional em comparação aos importados, em uso, atualmente, na produção do tampão de corrida do Teste Rápido para Diagnóstico de HIV-1/2, de Bio-Manguinhos. O desempenho do tampão de corrida que compõe esse kit, formulado com insumos importados, frente ao tampão preparado com produtos encontrados no mercado nacional foi o mesmo, com relação à intensidade da linha teste e ao tempo da visualização da linha controle, a partir da adição da amostra e do referido tampão de corrida. No presente estudo foi verificado que não houve diferença estatística entre os reagentes analisados em um nível de significância de $\alpha=0,05$. Além disso, todos os ensaios apresentaram percentuais de sensibilidade e especificidade de 100%, sugerindo que os reagentes nacionais podem ser utilizados em substituição aos importados, sem prejuízo no desempenho da reação imunológica inerente ao processo. Neste estudo não foram verificadas diferenças significativas no custo dos sete reagentes nacionais (Cloreto de sódio; Soro de Galinha; Sulfato de estreptomicina; Tween 20; EDTA Dissódico; Fosfato de Sódio Dibásico e EDTA Tetrassódico) avaliados frente aos importados. Sendo assim, de forma preliminar, podemos dizer que os reagentes nacionais apresentam o mesmo desempenho em relação aos importados, minimizando desta forma, os entraves burocráticos, permitindo maior agilidade no ato da compra e contribuindo para reduzir o período de espera da chegada do produto para o prosseguimento do processo produtivo do kit Teste Rápido por Bio-Manguinhos.

Palavras-chave: 1.Diagnóstico Sorológico. 2.Teste Rápido 3. Imunocromatografia. 5. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Aids is a global problem of Public Health. With the need to expand access to the laboratory diagnosis of HIV infection it was encouraged by the Ministry of Health the development of tests of high sensitivity, specificity and low cost for routine, in order to detect antibodies to HIV in human blood. These serological tests are important tools in clinical diagnosis, have in protecting the blood supply and in monitoring of HIV/aids. Bio-Manguinhos, a Technical Unit of Fiocruz on development and manufacturing of immunobiological, biopharmaceutical and reagents for diagnosis, have encouraged the establishment of technological platforms for the development and incorporation of new products and processes for Public Health. In the present study clinical samples from seropositive and nonreactive individuals for the HIV/aids infection and blood donors samples together with a mixed titer commercial panel were used in the validation of reagents and supplies obtained in internal market compared to those imported products currently used in the production of the running buffer of Rapid Test for Diagnosis of HIV – 1 / 2 Bio-Manguinhos. The performance of the running buffer of the kit, formulated with imported reagents in comparison with products found in the internal market was the same with respect to the intensity of the test line and to the time line view of control, from the moment of sample and the running buffer addition. In the study it was found that within a range of 95% there was no statistical difference between the reagents tested in $\alpha=0,05$ significance level. Moreover, all the tests presented sensitivity and specificity percentages of 100% suggesting that the reagents obtained in the internal market may be used to replace imported ones without impairing performance of the immune response inherent to the process. In this study no significant differences in the cost of the seven reagents tested were observed (national or imported ones). Thus, in a preliminary way one can say that national reagents have the same performance in relation to those imported, thus minimizing the bureaucratic obstacles, allowing greater flexibility in the purchase and contributing to reduce the period for the arrival of the product the communication of the productive process Test Kit Rapid Bio-Manguinhos.

Key-words: 1. Serological Diagnosis. 2. Quick Test. 3. Imunocromatografia. 4. Sanitary surveillance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Genoma do HIV	20
Figura 2	Ciclo Infeccioso do HIV.....	25
Figura 3	Distribuição percentual dos casos de aids por região de residência...	26
Figura 4	Distribuição percentual de casos de aids por região do Brasil.....	27
Figura 5	Estrutura esquemática do HIV.....	28
Figura 6	Amostra reativa para HIV na metodologia de Western Blot.....	34
Figura 7	Sequência de uma reação de Imunofluorescência indireta – IFI para HIV-1.....	35
Figura 8	Padrão de leitura de amostra não reagente na reação de IFI/HIV-1...	35
Figura 9	Padrão de leitura de amostra reagente na reação de IFI/HIV-1	36
Figura 10	Padrão de leitura de amostra indeterminada na reação de IFI / HIV-1...	36
Figura 11	Teste Imunoblot Rápido DPP – HIV-1 / 2 contendo amostra reativa para HIV-1 / 2	37
Figura 12	Representação esquemática de um teste rápido segundo metodologia de cromatografia de fluxo lateral para HIV-1 / 2	44
Figura 13	Componentes do kit Teste Rápido Stat-Pack® HIV-1 / 2 Bio-Manguinhos.....	45
Figura 14	Aplicação do tampão de corrida no suporte de teste	45
Figura 15	Resultados não regentes na reação de Teste Rápido Stat-Pack® HIV-1/ 2.....	46
Figura 16	Resultados reagentes na reação de Teste Rápido Stat-Pack® HIV-1/ 2.....	47
Figura 17	Resultados inconclusivos ou inválidos na reação de teste rápido Stat-Pack® HIV - 1 / 2.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV no Brasil	29
Quadro 2	Fluxograma para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais	30
Quadro 3	Testes sorológicos utilizados na caracterização da reatividade das amostras de soro clinicamente caracterizadas no LAVIMOAM / UFRJ frente ao HIV.	42
Quadro 4	Testes sorológicos utilizados na caracterização da reatividade das amostras do painel de título misto caracterizadas frente ao HIV.....	42
Quadro 5	Possibilidades de resultado de um Teste para avaliação da sensibilidade e especificidade	49
Quadro 6	Planilha de custo dos reagentes nacionais e importados para a produção do tampão de corrida, em volume de 8.000 mL	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos reagentes analisados no presente Estudo de acordo com a etapa de sua realização.....	43
Tabela 2	Resultados dos ensaios de Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras de painel comercial de título misto por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.....	51
Tabela 3	Resultados dos ensaios de Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras clínicas por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.....	51
Tabela 4	Resultados dos ensaios de Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras de painel comercial de título misto por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional	52
Tabela 5	Resultados dos ensaios de Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras clínicas por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.....	52
Tabela 6	Resultados dos ensaios de Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras de painel comercial de título misto por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional	53
Tabela 7	Resultados dos ensaios de Testes Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras clínicas por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CA	Proteínas do capsídeo
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle de Doenças)
cDNA	DNA complementar
CRFs	Formas recombinantes circulantes
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D-DST/AIDS	Departamento de DST, AIDS
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EIE	Ensaio Imunoenzimático
Env	Envelope
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Gag	Gene Antígeno de Grupo Específico
GAP	<i>Global AIDS Program</i> (Programa Global de AIDS)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IFI	Imunofluorescência Indireta
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IN	Integrase
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
LAB	Laboratório de Origem das Amostras
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LAV	<i>Lymphadenonopathy Associated Virus</i> (Vírus Associado à Linfadenopatia)
MS	Ministério da Saúde
P	<i>p</i> -valor
LTR	(<i>Long Terminal Repeats</i>)

PIC	Complexo Nucleico de pré-integração
PR	Enzima viral protease
p11	Proteína protease
p17	Proteína matriz
p24	Proteína do capsídeo viral
p31	Proteína integrase
p66	Proteína transcriptase reversa
Kb	Quilobases – unidade de medidas moleculares
KD	Kilodalton – unidade de medida utilizada para expressar a massa de partículas atômicas
MA	Matriz
NC	Nucleocapsídeo
Pol	Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
SECVI	Seção de Células e Vírus
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SESOD	Seção de soluções e Diluentes
SINAN	Sistema de informações de agravos de notificação
SIM	Sistema de informações sobre mortalidade
SICLOM	Sistema de controle logístico de medicamentos
SISCEL	Sistema de controle de exames laboratoriais da rede nacional de contagens de CD4 / CD8 e carga viral
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
SPIA	<i>Sol Particle Immunoassay</i> (Imunoensaio de Partícula Sólida)
TR	Teste Rápido
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNAIDS	Programa das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
WB	Western Blot

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 TRANSFERÊNCIA DA TECNOLOGIA DO TESTE RÁPIDO HIV 1 /2.....	16
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS RELACIONADOS AO HIV	17
1.3 O AGENTE ETIOLÓGICO	19
1.4 GENOMAS DO HIV	20
1.5 CICLOS DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL.....	23
1.6 EPIDEMIOLOGIA.....	25
1.7 FORMAS DE TRANSMISSÃO.....	27
1.8 DIAGNÓSTICOS SOROLÓGICOS.....	27
1.8.1 TESTES DE TRIAGEM	31
1.8.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	31
1.8.3 ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA	32
1.8.4 TESTE RÁPIDO HIV-1/2 BIO-MANGUINHOS	32
1.9 TESTES COMPLEMENTARES	33
1.9.1 REAÇÃO DE WESTERN BLOT.....	33
1.10 TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA HIV-1 DE BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ – RJ	34
1.11 ENSAIOS DE IMUNOBLOT RÁPIDO DPP® HIV-1/2 - BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ	37
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	40
4.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	40
4.3 AMOSTRAGEM	41
4.3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS	41
4.3.2 PAINEL COMERCIAL DE TÍTULO MISTO	42
4.4 FORMULAÇÃO DOS TAMPÕES DE CORRIDA	43

4.5	TESTE RÁPIDO PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE AO HIV	43
4.5.1	LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO TESTE	46
4.6	DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	48
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	59
8	PERSPECTIVAS DESTE ESTUDO	60
	REFERÊNCIAS	61
ANEXO A	– PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IPEC/ FIOCRUZ	71
ANEXO B	– PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS INSUMOS NACIONAIS NO KIT PARA TESTE RÁPIDO HIV-1 / 2	73
ANEXO C	– PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS INSUMOS NACIONAIS NO KIT PARA TESTE RÁPIDO HIV-1 / 2	74
ANEXO D	– MANUAL DE INSTRUÇÃO DO TESTE RÁPIDO - HIV-1/2 - BIO- MANGUINHOS	75

1 INTRODUÇÃO

A proposta deste trabalho, abrindo uma linha de investigação no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, pertencente à Fundação Oswaldo Cruz, está vinculada a produção de conjuntos de reativos para diagnóstico. Esta linha iniciada em Bio-Manguinhos na década de 80 de acordo com a demanda estabelecida pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde (FERREIRA, 2005; BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012 a) .

Bio-Manguinhos, ao longo dos anos, vem contribuindo para a melhoria dos serviços ofertados à população, possibilitando um monitoramento epidemiológico mais eficaz bem como o controle de qualidade do sangue e hemoderivados (FERREIRA, 2005, BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012 a).

Neste segmento, o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde definiu a ampliação do acesso ao diagnóstico do Virus da Imunodeficiência Humana (HIV), por meio da utilização de testes rápidos, como componentes para inibir o avanço da epidemia no País.

Em 2005 foi estabelecido uma parceria com o *Centers Disease Controle and Preventions*, por meio de seu *Global Aids Program – CDC / GAP*. Sendo assim, foi elaborado um protocolo de pesquisa de avaliação dos testes rápidos, implementação do teste baseada em evidências científicas. Da vontade política de incorporar uma dimensão científica para orientar decisões que envolvem a saúde da população, surgiu uma proposta de pesquisa dos testes rápidos em dois grandes estudos, para determinação do algoritmo de testes em ambiente não laboratorial (BRASIL, 2007, CDC 1989).

O Ministério da Saúde considerando a necessidade de se criar alternativas para a ampliação do acesso ao diagnóstico da infecção pelo HIV substituiu a portaria nº 59/GM/MS, de 28 de janeiro de 2003 pela portaria N°151 SVS/MS, de 14 de outubro de 2009. Esta última estabelece o diagnóstico e a pesquisa de anticorpos para o HIV em indivíduos acima de 18 meses, o uso do teste rápido em situações especiais além da utilização de testes moleculares para detectar RNA e/ou DNA, que embora não sejam preconizados para o diagnóstico laboratorial do HIV podem auxiliar a definição dos casos indeterminados, principalmente em gestantes. A referida Portaria determina que as amostras possam ser utilizadas na sorologia para

o HIV: soro, plasma, sangue total ou sangue seco em papel de filtro e proíbe a mistura de amostras (*pool*) para a utilização em qualquer teste laboratorial, com objetivo de diagnosticar a infecção pelo HIV (BRASIL, 2009).

1.1 TRANSFERÊNCIA DA TECNOLOGIA DO TESTE RÁPIDO HIV 1/2:

Bio-Manguinhos, em 2004, assinou com a empresa Chembio Diagnostic Systems, Inc. o contrato de transferência de tecnologia para produção do teste rápido HIV-1/2. O domínio desta tecnologia e a inclusão deste produto em seu portfólio permitiram ao Instituto atender às necessidades do país e reduzir sua dependência tecnológica. O objetivo foi ampliar o acesso ao teste através do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, começando pelo programa de prevenção da transmissão vertical do HIV. Uma vez incorporada esta tecnologia também poderá ser aplicada ao diagnóstico rápido de outras doenças importantes para a saúde pública, cujo acesso é limitado tanto pelo alto preço dos conjuntos de diagnóstico quanto pelo desinteresse da iniciativa privada em produzi-los (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012a).

A metodologia implementada para a produção do teste rápido foi a técnica de imunocromatografia de fluxo lateral. A referida técnica originalmente denominada *solid particule immunoassay* (imunoensaio de partícula sólida) (SPIA), consiste em ensaios de fluxo lateral (LEUVERING *et al.*, 1980, AMERONGEN *et al.*, 1993; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2005). A utilização dessa técnica de imunocromatografia de fluxo lateral possibilita o diagnóstico em locais de difícil acesso ou comunidades desprovidas de infra-estrutura laboratorial. A aplicação desta metodologia para diagnóstico rápido de infecção pelo HIV em parturientes pode representar uma estratégia para diminuir os casos de transmissão vertical do HIV (de mãe para filho no momento do parto ou durante a amamentação) e para gestantes que não realizaram o teste anti-HIV durante o pré-natal no momento do parto (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012a). A geração atual de ensaio de fluxo lateral (LFIA) tem sensibilidade e facilidade de utilização para diagnóstico (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; AMERONGEN, 2009).

O uso dos testes rápidos por meio de cromatografia de fluxo lateral, na etapa de triagem do diagnóstico da infecção pelo HIV vem ocorrendo cada vez mais no mundo. Atribui-se essa ampla utilização à simplicidade e rapidez de execução do teste possibilitando ao usuário o imediato conhecimento da sua reatividade sorológica para HIV (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012a; BRASIL, 2007).

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS RELACIONADOS AO HIV

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) é o responsável por aproximadamente 34 milhões de casos da doença em todo o mundo (BARRÉ-SINOUSI *et al.*, 1983, POPOVIC *et al.*, 1984, CLAVEL *et al.*, 1986, PAUL; BEATRICE, 2010, UNAIDS, 2011).

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, PAUL; BEATRICE, 2010).

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-SINOUSI *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, linfócitos T auxiliares (TCD4⁺). Esse vírus é capaz de infectar vários outros tipos celulares do sistema imunológico, como os macrófagos e as células dendríticas. (BARRÉ-SINOUSI, 1996; CLAPHAM; WEISS, 1997; GALLO, 1983, CORNELISSEN, M. *et al.*, 1996).

Os primeiros testes para diagnóstico da infecção pelo HIV baseados na detecção de anticorpos pela técnica imunoenzimática para esse vírus tornaram-se disponíveis para uso em 1985. A implantação dos testes ocorreu inicialmente como

método diagnóstico para os indivíduos em risco para a infecção pelo HIV-1. (MACHADO; COSTA J.C., 1999; PAUL; BEATRICE, 2010).

Em 1985, os pesquisadores Hélio do Instituto Oswaldo Cruz e Marguerite Pereira forneceram a Bernardo Galvão células humanas infectadas pelo vírus da HIV. O material, que havia sido cedido a Dra. Peggy Pereira pelo pesquisador norte americano Robert Gallo, envolvido no isolamento do HIV-1 nos Estados Unidos. Com o material em mãos, o primeiro passo dos pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) foi realizar um trabalho para implantar as técnicas necessárias para a identificação sorológica da infecção causada pelo HIV, dando início ao processo de produção do primeiro kit diagnóstico brasileiro na década de 80, realizado por imunofluorescência (FERREIRA, 2005) – técnica que sinaliza, por iluminação ultravioleta, a presença de antígenos ligados a anticorpos específicos para o vírus. Segundo Galvão, o HIV já havia sido isolado na França e nos Estados Unidos quando as amostras de vírus foram cedidas por Robert Gallo. Tornou-se urgente, então, padronizar o primeiro kit de diagnóstico de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos contra o HIV-1, contribuiu, conseqüentemente, para o isolamento do HIV na América Latina e no Brasil (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2012; COUTO-FERNANDES, J.C. *et al.*, 2005).

No Brasil, o primeiro 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).

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).

Em 2010, pesquisadores do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) identificaram e confirmaram a presença de coinfeção por HIV-1 e HIV-2 em 15 amostras de diversos estados brasileiros. Este estudo divulgado durante o II Congresso de Infectologia do Estado do Rio de Janeiro recebeu o prêmio Adrelírio Rios, como um dos melhores trabalhos apresentados no evento (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2010, FIOCRUZ, 2010, BENDET *et al.*, 2010).

1.3 O AGENTE ETIOLÓGICO

O HIV está classificado na família Retroviridae, gênero Lentivirus. Todos os membros desta família replicam-se por intermédio 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 (PAUL; BEATRICE, 2010).

Dentre o gênero Lentivirus está classificado o vírus da imunodeficiência Símia (SIV), que além de causar doenças imunes semelhantes, infectam com frequência macacos verdes africanos, são muito próximos ao HIV-2 do que do HIV-1, sugerindo co-evolução (HIRSCH *et al.*, 1989; GAO *et al.*, 1992). Ademais, diversos estudos sorológicos realizados na África, utilizando amostras de soros 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 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). Especula-se a possibilidade de variantes virais possuírem diferentes índices de transmissibilidade e patogenicidade. No grupo M identificam-se nove subtipos (A (A1, A2), B, C, D, F (F1, F2), G, H, J e K) e no grupo O apenas um. Em relação ao HIV-2 descrevem-se cinco subtipos: A, B, C, D e E. (GULTLER *et al.*, 1996; SIMON *et al.*, 1994; PAUL; BEATRICE, 2010; TSCHERNING *et al.*, 1988; SOARES, *et al.*, 2003).

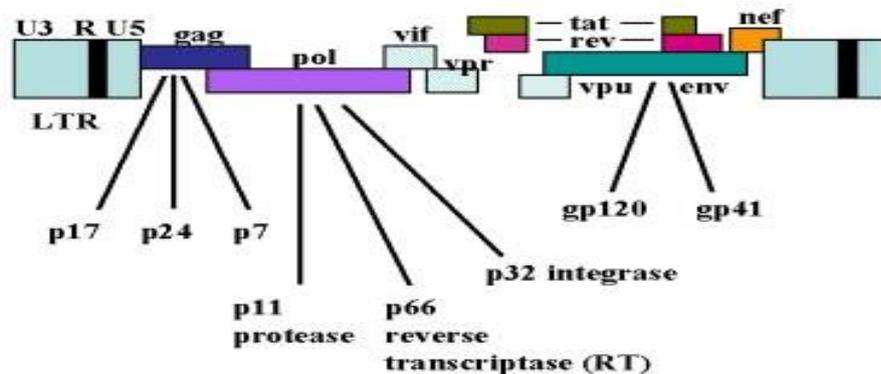
O curso da disseminação de formas recombinantes do vírus é geográfico e depende do índice de prevalência das diferentes subtipos do HIV na região, da probabilidade de múltiplas infecções em determinados grupos geográficos e da ocorrência da recombinação. O primeiro relato da presença de um CRF no mundo ocorreu no Brasil, onde já foram detectados subtipos B, F, C e, em menor proporção, D. A distribuição dos subtipos do HIV-1 assume diversos padrões de acordo com a região geográfica, mas, de um modo geral, as principais formas recombinantes circulantes no Brasil são: BC, BF, FD e o tríplice BCF (MONTEIRO-CUNHA *et al.*, 2011).

1.4 GENOMA DO HIV

O HIV similar aos demais retrovírus é diploide com duas moléculas de RNA (ácido ribonucleico) de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 9.700 nucleotídeos (9,7Kb) e mantidas por interações entre as duas terminações 5' ou com um DNA de fita dupla, integrado ao genoma da célula hospedeira (provirus) ou livre e circularizado (BARRÉ-SINOUSSE, 1996, NAKAI; GOTO, 1996, CONSTANTINE; ZINK, 2005, COSTA *et al.*, 2010).

O genoma do HIV contém genes sendo três deles encontrados em todos os retrovírus, são eles: *gag* (que codifica as proteínas estruturais), *pol* (que codifica as enzimas virais protease [PR]), transcriptase reversa [RT] e integrase [IN] e *env* (que codifica as glicoproteínas do envelope). Esses genes são considerados os genes estruturais. Os genes *gag*, *pol* e *env* são traduzidos em poliproteínas precursoras que são posteriormente clivadas por proteases celulares e por uma protease viral.

Figura 1 – Genoma do HIV.



Fonte: HIV Medicine (2008)

Os genes regulatórios, *tat* e *rev*, além de quatro genes acessórios: *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. Embora esses genes auxiliares mostrem pouca homologia sequencial, suas funções são conservadas. A diferença genômica entre o HIV – 1 e o HIV-2 está na presença do gene *vpx* no HIV-2. Nas extremidades 3' e 5' do provirus são encontrados longas sequências repetidas denominadas de LTRs (*long terminal*

repeats), que regulam a integração do vírus ao genoma hospedeiro, a expressão gênica e a replicação.

O gene *gag* é traduzido em uma poliproteína de 55KD, denominada p55 Gag. Essa é clivada pela protease viral em proteínas menores: p17 que forma a matriz; constitui o capsídeo; p7 que constitui o nucleocapsídeo; e p6 que promove a incorporação da proteína *Vpr* aos vírions. Essas quatro proteínas são encontradas nas partículas virais maduras do HIV-1.

O gene *pol* codifica uma poliproteína precursora das enzimas virais PR, RT e IN. A sequência do gene *pol* não possui um códon de iniciação. Assim, não pode ser traduzida independentemente. A poliproteína *pol* é traduzida fusionada a *gag*, formando um precursor denominado *gag – pol*. A protease viral cliva o polipeptídeo, *pol*, separando-o de *gag*, e, posteriormente, cliva *pol* para gerar PR, RT e a IN. Porém, é somente no meio extracelular, após a liberação do vírus da célula hospedeira, que a protease viral sofre auto ativação e inicia o processo de clivagem, tornando infecciosa a partícula viral. Todos os produtos do gene *pol* podem ser encontrados dentro das partículas virais do HIV-1.

O gene *env* codifica uma poliproteína precursora, que é sintetizada na forma de um trímero, com ligações não covalentes entre subunidades *gp 120* e *gp 41* (DORFMAN *et al.*, 1994, COSTA *et al.*, 2010, CONSTANTINE; ZINK, 2005).

O gene *tat* codifica um transativador transcricional que é essencial à replicação do HIV-1. Tat é uma proteína que se liga ao RNA, reconhece uma sequência em forma de loop, denominada elemento de resposta á transativação (transactivation response element – TAR), localizada na extremidade 5' de todos os RNAs mensageiros do HIV-1. Como resultado dessa ligação há o aumento na taxa de produção de transcritos virais primários em pelo menos 1000 vezes (DORFMAN *et al.*, 1994, COSTA *et al.*, 2010, CONSTANTINE; ZINK, 2005).

O transcrito completo do HIV possui sítios de processamento alternativo. O processamento alternativo dos RNAs mensageiros é necessário para expressão eficiente dos genes virais. As proteínas *tat*, *rev* e *nef* são processadas na fase inicial da infecção e acumulam-se devido à ativação transcricional produzida por *tat*. O acúmulo da proteína Rev é responsável pela entrada na fase tardia do ciclo de replicação do HIV-1, além de ser uma proteína que se liga ao RNA e reconhece um elemento estrutural específico localizado em *env*, denominado elemento de resposta a *rev* (Response element). A proteína *rev* facilita a síntese das proteínas virais

estruturais e garante a viabilidade do genoma completo de RNA do HIV-1. Ela também está envolvida no transporte dos transcritos de fase tardia dos genes *vpr*, *vpu* e *vif* para o citoplasma da célula hospedeira (DORFMAN *et al.*, 1994, COSTA *et al.*, 2010, CONSTANTINE; ZINK, 2005).

O gene *nef* (negative factor) codifica um pequeno polipeptídeo que está associado a estimulação da infecção viral, da resistência à ação do sistema imune, e consequentemente, da progressão mais rápida para a AIDS. Diversas funções são atribuídas a *nef*. Algumas delas estão associadas à modulação negativa da expressão de CD4 e do complexo maior de histocompatibilidade (MHC classe I) nos linfócitos T, às interações com as proteínas do citoesqueleto, e à inibição dos sinais apoptóticos nas células infectadas pelo HIV (DORFMAN *et al.*, 1994, COSTA *et al.*, 2010, CONSTANTINE; ZINK, 2005).

A proteína viral U ou *vpu* é essencial á maturação e liberação da progênie viral. Nas células infectadas pelo HIV, são formados complexos entre o receptor celular CD4 e a glicoproteína do envelope gp 120 no meio intracelular. Tal processo interfere na gp 120 pela clivagem da molécula de CD4 ligada a ela (DORFMAN *et al.*, 1994, COSTA *et al.*, 2010; CONSTANTINE; ZINK, 2005).

A proteína R ou *vpr* é incorporada à partícula viral pelo peptídeo p6 de Gag. Uma das funções atribuídas a *vpr* é facilitar a localização nuclear do complexo de pré-integração, ligando-se a proteínas dos poros nucleares. *Vpr* também pode bloquear a divisão celular, mantendo o ciclo celular na fase G2, ligar-se a LTR viral e potencializar a transcrição de genes pela interação com fatores transcricionais (DORFMAN *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2010; CONSTANTINE; ZINK, 2005).

A proteína viral *vif*, fator de infectividade viral (viral infective factor), tem papel importante na infecção e na replicação do vírus, sendo essencial para infecções in vivo. Essa proteína também pode bloquear o processamento prematuro da poliproteína gag pela protease viral ainda no citoplasma. Muitos isolados do HIV não são idênticos, mas parecem compreender um espectro de vírus relacionados. Populações heterogêneas de genoma viral são encontradas em um indivíduo infectado. Esta heterogeneidade reflete taxas elevadas de replicação e taxa de erro elevada da transcriptase reversa viral. As regiões de maior divergência entre isolados diferentes são localizadas no gene do envelope (DORFMAN *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2010; CONSTANTINE; ZINK, 2005).

As glicoproteínas do envelope (gp 120 e gp41) possuem papel crucial nos eventos iniciais da infecção pelo HIV, mediando a ligação do vírus à célula hospedeira e a fusão das membranas viral e celular. Estas proteínas também são os principais alvos para a resposta anti-HIV nos indivíduos infectados, devido a sua localização na superfície da partícula viral. A glicoproteína gp120 permite o reconhecimento da célula alvo e determina o tropismo celular pela ligação ao receptor celular CD4 a um dos vários co-receptores membros da família de receptores de quimiocinas, mais frequentemente CCR5 ou CXCR4. A glicoproteína gp 41 promove a fusão da membrana viral com a celular, processo que resulta na liberação do núcleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira (DORFMAN *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2010; CONSTANTINE; ZINK, 2005).

1.5 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

A característica mais marcante da infecção pelo HIV é a depleção seletiva de linfócitos CD4+, entretanto, este vírus infecta monócitos, macrófagos, células de Langerhans, entre outras.

A infecção pelo HIV começa com a etapa de adsorção, que compreende a ligação do vírion à superfície da célula alvo. Esta é mediada por uma interação de alta afinidade entre o domínio extracelular da glicoproteína viral gp 120 e receptores celulares específicos, sendo o CD4 o principal receptor para HIV-1 e HIV-2. Entretanto apenas, a interação gp 120 – CD4 não é suficiente para a entrada do HIV na célula. Um grupo de receptores de quimiocinas (pertencente à família de receptores acoplados à proteína G) CCR5 e CXCR4, tem sido identificados como os principais correceptores *in vivo* para o HIV-1. Assim, após a ligação da gp 120 ao receptor celular CD4, ocorrem alterações conformacionais que facilitam a ligação ao correceptor e subsequente entrada viral. Este evento é decorrente da fusão do envelope viral com a membrana celular, um processo facilitado pela glicoproteína gp 41 (CLAPHAM; WEISS, 1997, SMITH *et al.*, 1997; SIMMONS *et al.*, 1996, TSCHERNING *et al.*, 1988, COSTA *et al.*, 2010).

A fusão das membranas viral e celular resulta na criação de um poro que conecta o interior do vírion com o citoplasma da célula alvo facilitando a entrada do

capsídeo viral da célula do hospedeiro. Segue-se então a etapa de desnudamento, que envolve fatores celulares e as proteínas virais (matriz, p17) MA, nef e vif, consiste na liberação do conteúdo do capsídeo (RNA genômico e as proteínas (matriz, p17) MA, (transcriptase reversa, p66/p51) TR, (integrase, p32) e Vpr para o citoplasma (CLAPHAM; WEISS, 1997, SMITH *et al.*, 1997, SIMMONS *et al.*, 1996, TSCHERNING *et al.*, 1988, COSTA *et al.*, 2010).

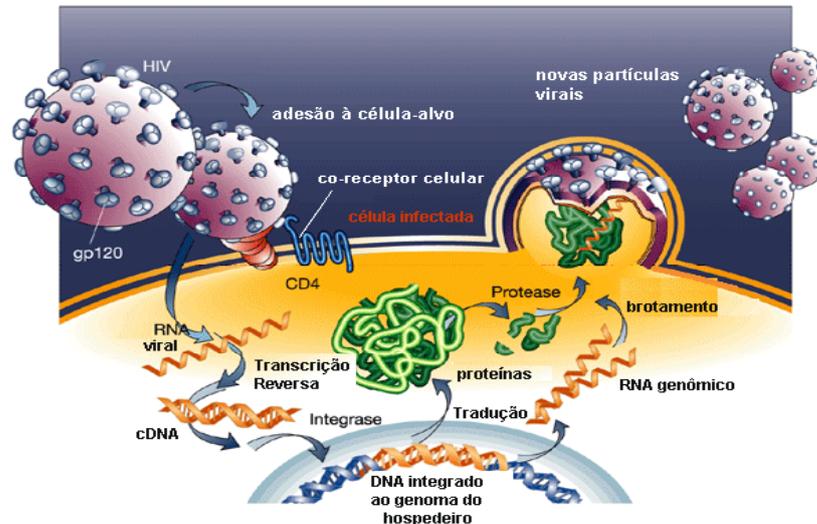
Uma vez no citoplasma, o genoma viral RNA é retrotranscrito para uma fita única de DNA pró-viral, pela transcriptase reversa (TR) viral. Após a transcrição reversa, o DNA pró-viral é associado com proteínas virais e celulares em um grande complexo nucleoproteico de pré-integração (PIC) que é transportado para o núcleo da celular através do poro nuclear. Além de importantes fatores celulares, três proteínas do HIV associados ao complexo nucleoproteico de pré-integrado (PIC) (matriz, p17) MA, Vpr e (integrase, p32) IN desenvolvem papel crucial neste transporte (Figura 4) (CHAN *et al.*, 1997, COSTA *et al.*, 2010).

A dupla fita de DNA linear do complexo nucleoproteico de pré-integrado (PIC) é inserida no cromossomo do hospedeiro pela integrase (IN) viral. Depois da integração, ocorrem as primeiras transcrições do DNA pró-viral pela RNA polimerase II celular, produzindo RNAs virais (genômico e mensageiro) que são transportados através da membrana do núcleo. No citoplasma, as fitas de RNAm viral são traduzidas produzindo as poliproteínas que darão origem às proteínas virais(Figura 4) (CHAN *et al.*, 1997, COSTA *et al.*, 2010).

As proteínas virais env migram e se inserem na membrana plasmática. As poliproteínas gag e gag-pol também se movem para a membrana celular e começa a montagem do virion direcionada pela proteína gag. Além disso, enzimas virais, RNA genômico e compostos celulares se associam no nucleocapsídeo imaturo. Mais tarde, este complexo brota através da membrana plasmática produzindo um vírion imaturo.

O brotamento dispara a ativação da PR que autocataliticamente cliva as poliproteínas gag e gag-pol, liberando as proteínas estruturais e as enzimas. As proteínas individuais sofrerão futuras interações, de maneira que as proteínas do capsídeo capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) formem o nucleocapsídeo cônico e a matriz, p17 (MA) fique associada ao envelope viral. O processamento das proteínas virais pela protease que leva à formação das partículas virais maduras e infecciosas (Figura 2) (CHAN *et al.*, 1997, COSTA *et al.*, 2010).

Figura 2. Ciclo Infeccioso do HIV.



Fonte: Santos-Costa; Silva; Azevedo-Pereira (2008).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

A UnaidS estima que no mundo aproximadamente 700 mil mortes relacionadas à aids tenham sido evitadas, número que pode ser atribuído ao acesso aos medicamentos antirretrovirais, a que 47% dos infectados no mundo tem acesso. Atualmente cerca de 34 milhões de pessoas no mundo vivem com aids, segundo o relatório da UnaidS (UNAIDS, 2011).

No Brasil, os primeiros casos de aids foram identificados no início da década de 1980, tem sido registrados predominantemente entre gays adultos, usuários de drogas injetáveis e hemofílicos (BRASIL, 2011). Passados 30 anos, o país tem como característica uma epidemia estável e concentrada em alguns subgrupos populacionais em situação de vulnerabilidade.

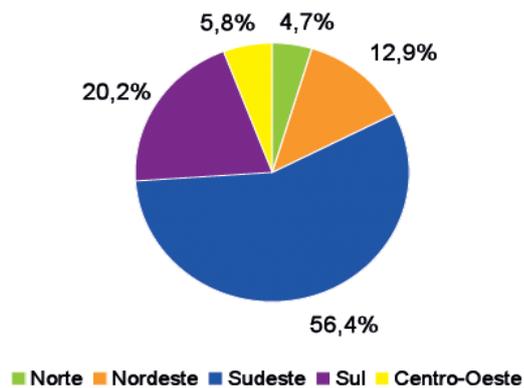
De acordo com o último Boletim Epidemiológico (ano base 2010), foram notificados no Sistema de informações de agravos de notificação (Sinan), declarados no Sistema de informações sobre mortalidade (SIM), registrados no Sistema de controle de exames laboratoriais da rede nacional de contagens de CD4 / CD8 e carga viral (Siscel) e no Sistema de controle logístico de medicamentos (Siclom), 608.230 casos de aids, acumulados de 1980 a junho de 2011, sendo 397.662 (65,4%) no sexo masculino e 210.538 (34,6%) no sexo feminino.

A razão de sexo vem diminuindo ao longo dos anos. Em 1985, para cada 26 casos entre homens havia um caso entre mulheres. Em 2010, essa relação é de 1,7 homens para cada caso em mulheres (BRASIL, 2011).

A taxa de prevalência da infecção pelo HIV, na população de 15 a 49 anos, estima-se estável em 0,6% desde 2004, sendo 0,4% entre as mulheres e 0,8% entre os homens (BRASIL, 2011).

De 1980 a junho de 2011, no Brasil, foram notificados no Sinam, declarados no SIM e registrados no Siscel/Siclom um total de 608.230 casos de aids, sendo 343.095 (56,4%) na Região Sudeste; 123.069 (20,2%) na Região Sul; (12,9%) na Região Nordeste; 35.116 (5,8%) na Região Centro-Oeste; e 28.248 (4,7%) na Região Norte (BRASIL, 2011), conforme demonstrado na Figura 3.

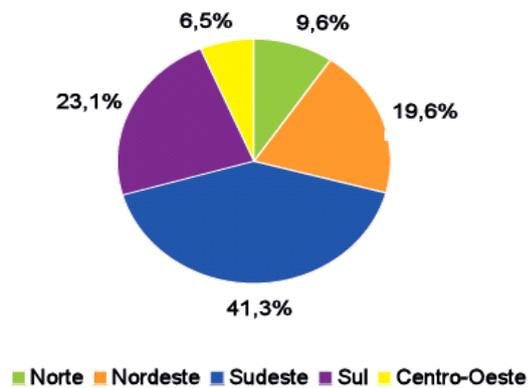
Figura 3: Distribuição percentual dos casos de aids por região de residência.



Fonte: Brasil, 1980 a 2011.

Em 2010, do total de 34.218 casos de aids notificados no Sinam, declarados no SIM/Siclom, 14.142 (41,3%) foram notificados na Região Sudeste; 7.888 (23,1%) na Região Sul; 6.702 (19,6%) na Região Nordeste; 3.274 (9,6%) na Região Norte; e 2.211 (6,5%) na Região Centro-Oeste (BRASIL, 2011) conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Distribuição percentual de casos de aids por região do Brasil.



Fonte: Brasil, 2011.

1.7 FORMAS DE TRANSMISSÃO

O HIV pode ser detectado em algumas secreções corporais como esperma, secreções vaginais, leite materno, e no sangue. As principais formas de transmissão da infecção pelo HIV-1 e HIV-2 são: sexual, parenteral (sanguínea) e vertical (durante a gestação, no momento do parto ou por aleitamento materno) (BRASIL, 2010b).

Dentro da transmissão parenteral é importante mencionar a possibilidade de ocorrer, em menor escala, a transmissão ocupacional entre profissionais de saúde ocasionada por acidentes de trabalho, com instrumentos perfuro-cortantes contaminados com sangue de pacientes infectados pelo HIV, bem como após transplante de órgãos (BERTOZZI *et al.*, 2010, BRASIL, 2011b).

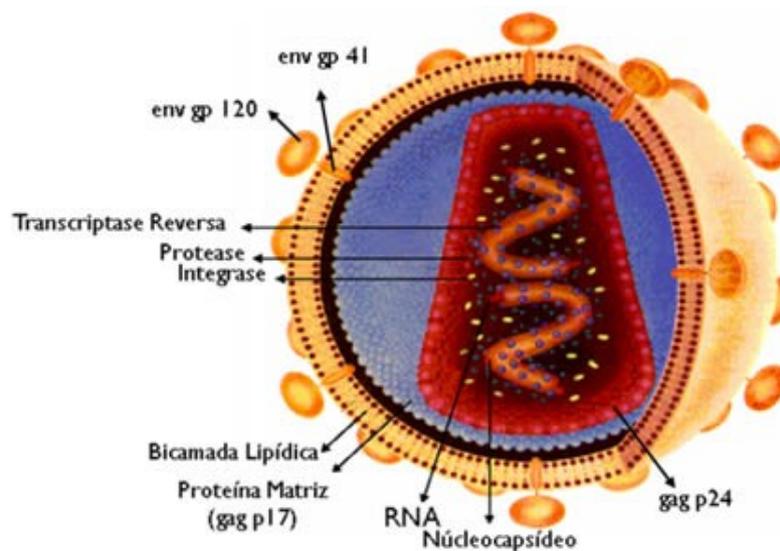
1.8 DIAGNÓSTICOS SOROLÓGICOS

O Ministério da Saúde, por intermédio da portaria n° 151, de 14 de outubro de 2009, determinou que as instituições públicas privadas ou filantrópicas devem utilizar um Fluxograma mínimo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV em

indivíduos com idade de 18 meses. A portaria apresenta os testes indicados pelo Ministério da Saúde no fluxograma e a sequência recomendada para sua utilização, a interpretação dos resultados e a liberação dos laudos. A estratégia de utilização de um fluxograma visa permitir a identificação de todas as amostras verdadeiramente reagentes através da testagem em duas etapas: de triagem e complementar, conforme disposto no Quadro 2 (BRASIL, 2009, BRASIL, 2010).

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) Figura 5.

Figura 5. Estrutura esquemática do HIV.



Fonte: Bismara (2006)

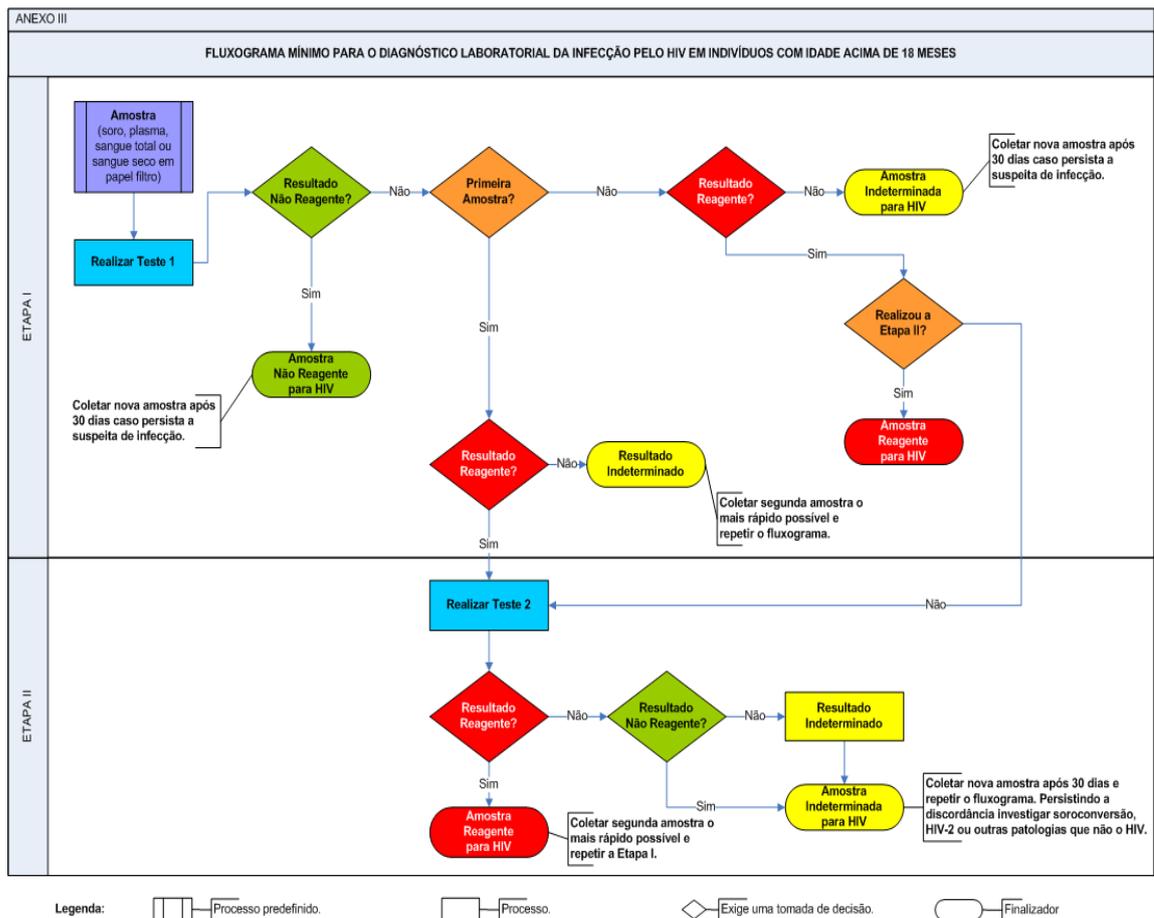
Etapa I – Triagem

É importante que o teste seja capaz de detectar anticorpos anti-HIV-1, incluindo o grupo O, e anticorpos anti-HIV-2, para evitar resultados falsos negativos. Ainda nesta etapa, poderão ser utilizados testes que combinem detecção simultânea desses anticorpos e antígenos. Um teste não reagente na triagem indica que a amostra não possui anticorpos ou que possui anticorpos em quantidades que não podem ser detectadas. Ou, ainda, no caso de utilização de um teste de 4ª geração,

no qual antígenos de HIV-1 não são detectáveis na amostra. O resultado da amostra deve ser interpretado como **amostra não reagente** para a infecção pelo HIV e o laudo deverá ser emitido imediatamente (Figura 2) (BRASIL, 2009, BRASIL, 2010).

Um resultado reagente na triagem significa que a amostra possui anticorpos contra HIV-1 e / ou HIV-2 e/ou antígenos de HIV -1 se tiver sido utilizado um teste de 4ª geração. Quando a amostra apresentar **resultado reagente** na primeira etapa, deve ser realizado um dos testes complementares na **segunda etapa – complementar** – com a mesma amostra. Um teste **indeterminado** na triagem indica que não foi possível caracterizar se a amostra contém ou não anticorpos contra o HIV ou antígenos do HIV-1 (caso tenha sido utilizado um teste de 4ª geração), conforme disposto no Quadro 1 (BRASIL, 2009, BRASIL, 2010).

Quadro 1. Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV no Brasil.



Fonte: BRASIL, 2009.

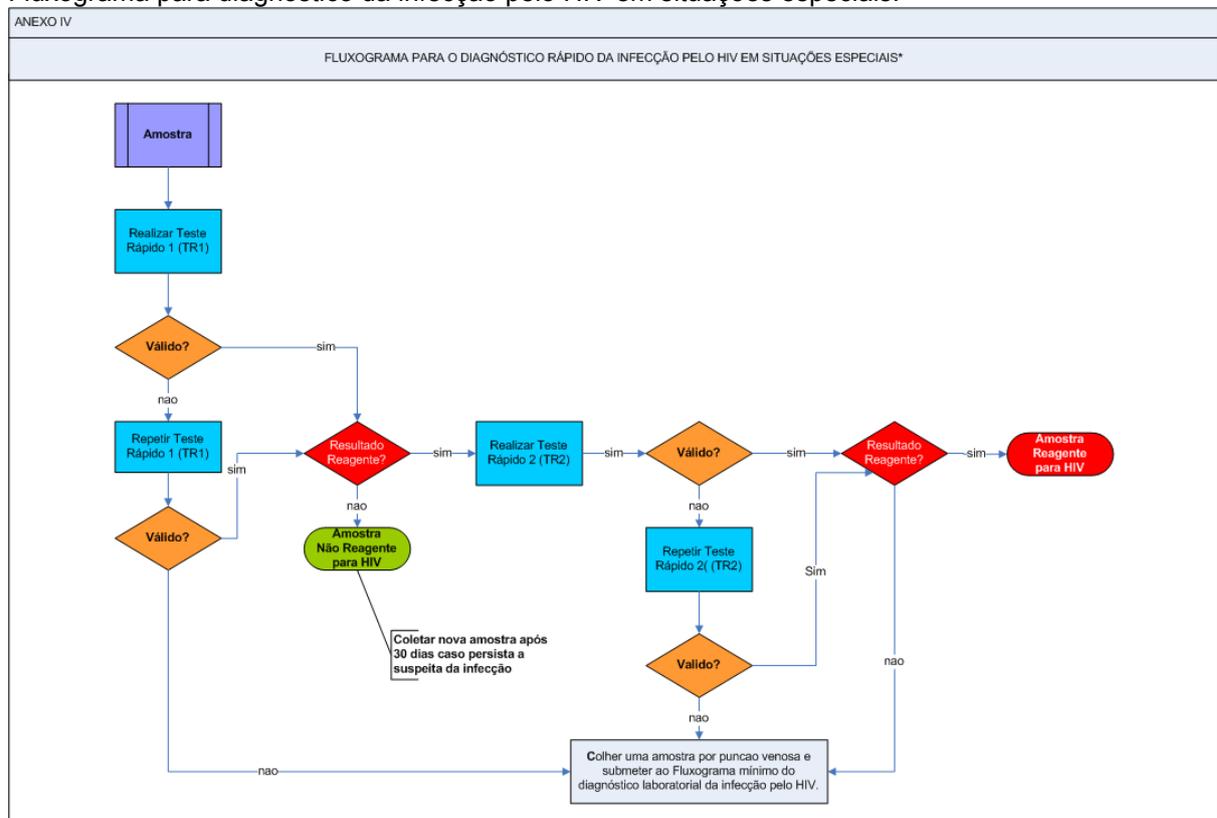
Etapa II – complementar – Teste 2 (T2)

Para a conclusão do diagnóstico laboratorial é necessário que os resultados dos testes das etapas I e II sejam analisados conjuntamente. As amostras que apresentarem resultados reagentes nas duas etapas são definidas como reagentes. Os usuários com resultados reagentes na etapa I – triagem- e na etapa II – complementar – devem ter uma **segunda amostra** coletada o mais rápido possível. Esta segunda amostra deverá ser submetida à etapa I do fluxograma. Vale ressaltar que quando resultado de uma amostra for indeterminado no teste da etapa II ou discordante entre os testes das etapas I e II, o resultado final será indeterminado, conforme é demonstrado no Quadro 2 (BRASIL, 2009).

No Quadro 2 é apresentado o Fluxograma para o Diagnóstico Rápido da infecção pelo HIV em situações especiais no Brasil seguindo a Portaria N° 151 SVS/MS, 14 de outubro de 2009 segundo sua característica e desempenho (BRASIL, 2009).

Quadro 2.

Fluxograma para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais.



Fonte: BRASIL, 2009.

1.8.1 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.

Os kits utilizados nessa etapa podem ser baseados em diferentes metodologias, conforme descrito a seguir:

1.8.2 Ensaio Imunoenzimático

O ensaio imunoenzimático (EIE) é o ensaio mais frequentemente usado na detecção de antígenos anti-HIV, sendo o teste de escolha na triagem de doadores por sua facilidade de automação, custo relativamente baixo e elevada sensibilidade e especificidade. Este ensaio utiliza antígenos virais (proteínas) produzidos em cultivo celular (testes de primeira geração) ou por meio de tecnologia molecular (recombinantes) e peptídeos sintéticos. Os antígenos virais são adsorvidos nas cavidades existentes das placas de plástico dos kits, onde o soro do paciente é adicionado a seguir. Se o soro do paciente possuir anticorpos contra o HIV, estes se ligarão aos antígenos virais (proteínas do HIV). Tal fenômeno pode ser verificado pela adição complementar de conjugado (anti-Ig total M ou G) a uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase), 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, dependendo do cromógeno utilizado pelo fabricante do conjunto de diagnóstico em testes distintos. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à concentração de antígenos/anticorpos presentes na amostra (Figura 5) (CONSTANTINE, 2005).

1.8.3 Ensaio de Quimioluminescência

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, entre outros etc., que podem ser indicados 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 à micropartícula marcada por estreptavidina e exposta a campo elétrico, no caso da eletroquimioluminescência ou substrato luminescente, no caso da quimioluminescência e a luz emitida por um fotomultiplicador. A concentração de anticorpos ou antígenos é diretamente proporcional a quantidade de luminescência emitida. A metodologia de quimioluminescência possui sensibilidade comparável aos testes de EIE, entretanto necessitam de equipamento específico para a sua utilização (MORIMURA et al, 2006).

1.8.4 Teste Rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos

O Teste Rápido HIV – 1 / 2 de triagem qualitativa para detecção de anticorpos para HIV - 1 / 2 de uso único utiliza um coquetel de antígenos para detectar anticorpos para HIV – 1 / 2 em soro, plasma e sangue total, humanos. O teste se baseia nas tecnologias de imunocromatografia e fluxo lateral. Resultados reativos são evidências de exposição ao HIV – 1 / 2 e podem ser usados como suporte clínico. O teste rápido HIV – 1 / 2 é indicado para uso profissional de saúde de acordo com as instruções fornecidas (BRASIL, 2009b).

1.9 TESTES COMPLEMENTARES

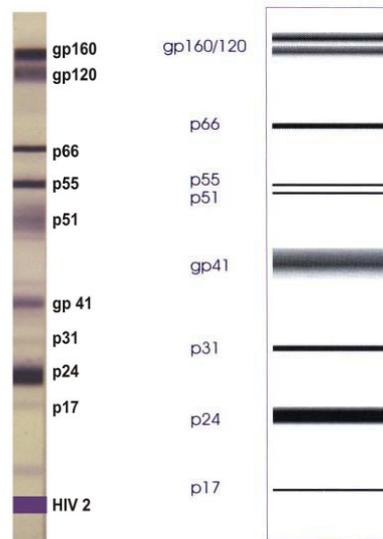
As amostras reagentes na etapa de triagem, entretanto, necessitam ter a sua reatividade ao HIV caracterizada na etapa de confirmação do diagnóstico sorológico, na qual testes com maior especificidade são usados. De acordo com o fluxograma de testes do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais os testes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

1.9.1 Reação de Western Blot

A metodologia de Western Blot é um teste qualitativo para detecção e identificação de anticorpos para o HIV-1 em soro ou plasma humano. Esse conjunto é produzido 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 poliacrilamida, 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.

A visualização das imunoglobulinas humanas especificamente ligadas às proteínas de HIV-1 pode ser observada após uma série de reações com anti-imunoglobulina G (anti-IgG) humana de cabra conjugada com biotina, avidina conjugada com “horsehadish peroxidase” 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 se referem à massa molecular relativa, em kilodaltons (Figura 6)(BRASIL, 2009, BRASIL, 1997a).

Figura 6. Amostra reativa para HIV na metodologia de Western Blot.

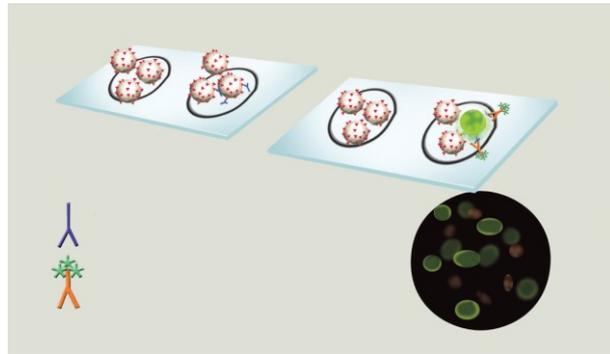


Fonte: BRASIL, 1997a.

1.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA HIV-1 DE BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ – RJ

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 (BRASIL, 2009c) Figura 7.

Figura 7. Sequência de uma reação de Imunofluorescência indireta – IFI – para HIV-1



Fonte: (BRASIL, 2009c)

- **Leitura e interpretação da reação:**

Proceder à leitura das amostras e considerar para a interpretação das amostras os padrões abaixo (Figuras 8,9 e 10):

Figura 8. Padrão de leitura de amostra não reagente na reação de IFI/HIV-1

Não reagente: Ausência de fluorescência em todas as células.

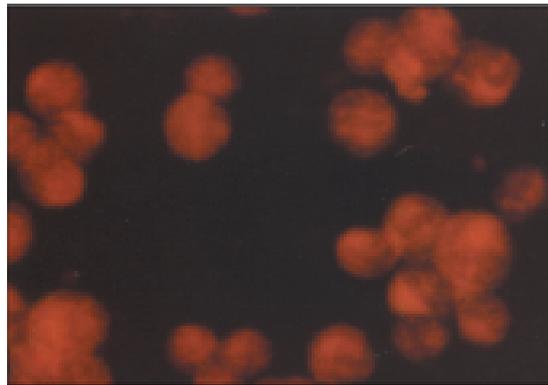


Figura 9. Padrão de leitura de amostra reagente na reação de IFI/HIV-1

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.

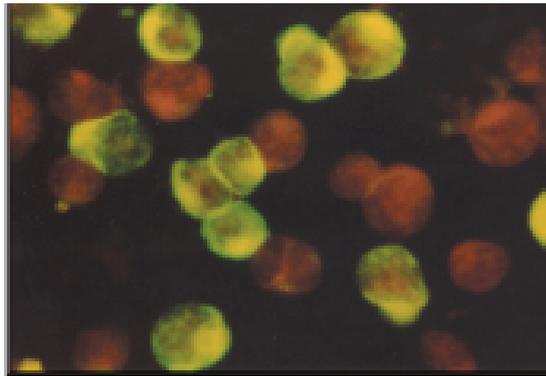
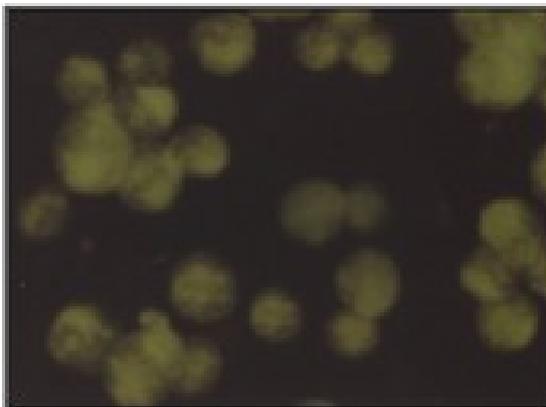


Figura 10. Padrão de leitura de amostra indeterminada na reação de IFI/HIV-1

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.



1.11 ENSAIO DE IMUNOBLOT RÁPIDO DPP® HIV-1/2 - BIO-MANGUINHOS /FIOCRUZ

O Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ é um 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. O teste se baseia na tecnologia de imunocromatografia e utiliza plataforma de duplo percurso de fluxo lateral. Seu uso é indicado como ensaio mais específico para a detecção de anticorpos para HIV 1 / 2 em amostras reativas em ensaios de triagem. Resultados reativos são evidências de exposição ao HIV – 1 ou HIV – 2 e podem ser usados como suporte ao diagnóstico clínico. O Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas (Figura 11) (BRASIL, 2009 d).

Figura 11. Teste Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 contendo amostra reativa para HIV-1/2.



Fonte: (BRASIL, 2009 d)

2 JUSTIFICATIVA

Bio-Manguinhos é a Unidade Técnico-Científica da Fiocruz que produz e desenvolve imunobiológicos, biofármacos e reativos para diagnóstico para atender à demanda da saúde pública brasileira. Atualmente o Instituto fornece cerca de 6,1 milhões de kits de reativos para diagnóstico por ano aos programas públicos da Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB), ao Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais e aos programas de Vigilância Epidemiológica, através do controle de endemias e agravos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2010a, BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2010b).

O Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde tem sido constantemente solicitado a incorporar novos medicamentos, métodos de prevenção e diagnóstico laboratorial. Em consequência, o governo, por intermédio do D-DST/AIDS e HEPATITES VIRAIS e de Bio-Manguinhos / Fiocruz buscaram tornar esta demanda uma realidade por meio da transferência de tecnologia para a produção do Teste Rápido para reduzir o custo e a dependência de importação do referido kit (FERREIRA, 2005).

A relevância deste Estudo centraliza-se na possibilidade de minimizar o custo do processo produtivo do tampão de corrida do Teste Rápido para HIV-1 /2 de Bio-Manguinhos, mantendo os níveis de sensibilidade e especificidade, concomitante ao aumento da produção, além de proporcionar um diagnóstico com elevado padrão de qualidade atendendo as normas da ANVISA/MS e as necessidades da toda a sociedade. Desta forma, a proposta é identificar no mercado nacional, insumos e reagentes que possam substituir os produtos importados utilizados no preparo do tampão de corrida do Teste Rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos – FIOCRUZ.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Validar os reagentes disponíveis no mercado nacional em comparação aos utilizados atualmente na produção do tampão de corrida do Teste Rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o desempenho do tampão de corrida formulado com reagentes encontrados no mercado nacional, frente ao kit Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos, de acordo com o fluxograma disposto na Portaria n° 151 SVS/MS, de 14 de outubro de 2009.
- Analisar a possibilidade de substituição dos reagentes importados por aqueles encontrados no mercado nacional.
- Avaliar o desempenho do Teste Rápido HIV-1 / 2 frente a amostras de painel comercial de título misto e amostras clínicas caracterizadas para HIV para a determinação da sensibilidade e especificidade.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa relativo a este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC/Fiocruz, sob a forma de adendo ao: “Projeto de Avaliação dos Conjuntos de Diagnóstico Desenvolvidos por Bio-Manguinhos”, em 15 de fevereiro de 2011 e registrado neste comitê, conforme registrado sob o CAAE 0017.0.009.000-08 neste Comitê (Anexo A), sendo aprovado, sem restrições. Em momento algum houve identificação dos pacientes e doadores de sangue incluídos neste estudo.

As amostras utilizadas na avaliação dos reagentes nacionais frente aos reagentes importados foram provenientes do estudo clínico realizado pela ASCLIN/Bio-Manguinhos, em conjunto com o LAVIMOAM/UFRJ e Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Durante o estudo clínico os conjuntos para diagnóstico foram submetidos a avaliação comparativa do desempenho frente a conjuntos similares comercialmente disponíveis, para determinar a sensibilidade e especificidade.

4.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Todos os procedimentos experimentais descritos neste estudo foram realizados em Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, no período compreendido entre fevereiro de 2011 a novembro de 2012. As normas de Boas Práticas de Fabricação e de Biossegurança foram utilizadas no estudo (BRASIL, 2010c; BRASIL, 2010d; BRASIL, 1998; BRASIL, 2004).

Os testes para a detecção de anticorpos contra HIV foram realizados no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED). As soluções foram formuladas na Seção de Soluções e Diluentes para Reativos do Departamento de Reativos para Diagnóstico (SESOD/DERED) (BRASIL, 2010e, BRASIL, 2010f, BRASIL, 2010g,

BRASIL, 2010h, BRASIL, 2010i, BRASIL, 2010j). A análise de custos dos reagentes e insumos utilizados foram realizadas na Seção de Contabilidade do Departamento de Administração (SECON/DEPAD) e na Seção de Gestão de Fornecedores (SEGEF) de Bio-Manguinhos.

4.3 AMOSTRAGEM

4.3.1 Amostras clínicas

Para a realização da validação dos reagentes encontrados no mercado nacional frente aos reagentes importados utilizados na formulação do tampão de corrida que compõe o Teste Rápido produzido por Bio-Manguinhos, foram utilizadas 25 amostras (n=25) de plasma coletadas de indivíduos infectados pelo HIV que realizam exames de monitoramento de carga viral e contagem de T CD4+/CD8+ no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, IPEC, Fiocruz e de doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ. As 25 amostras foram previamente caracterizadas no Laboratório de Virologia Molecular Animal (LAVIMOAN / UFRJ) – sob a supervisão do Dr. Orlando Ferreira. Do total de (25 amostras), 20 amostras foram previamente como reagentes e 05 como não reagentes, sendo caracterizadas pelas metodologias relacionadas no quadro 3, segundos as recomendações de uso estabelecidas pelos fabricantes.

Quadro 3.

Testes sorológicos utilizados na caracterização da reatividade das amostras de soro clinicamente caracterizadas no LAVIMOAN / UFRJ frente ao HIV.

NOME DO PRODUTO	FABRICANTE	METODOLOGIA
Determine HIV – 1 / 2	Abbot Laboratories	Imunocromatografia
HIV 1/2 Bio-Manguinhos	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Imunocromatografia
Vironostika HIV Uni-Form II plus	BioMérieux	ELISA – Sandwich
Murex HIV 1.2.0	Abbot/Murex	ELISA – Sandwich
Genelabs Western Blot Kit	Abbot Laboratories	WB – Indireto
Cambridge Biotec HIV–1 WB	Calypte Biom. Co.	ELISA – Sandwich

4.3.2 Painel comercial de título misto

A solução de tampão de corrida formulada com os reagentes disponíveis no mercado nacional foi avaliada frente ao Painel de Título Misto (Anti HIV-1 Mixed Titer Performance – Painel PRB 204 – BBI Diagnostics) com 25 amostra, sendo 05 indeterminadas (sendo destas, 03 reativas e 02 não reativas), 01 não reativa e 19 reativas para HIV, caracterizadas pelas metodologias relacionadas no quadro 4.

Quadro 4.

Testes sorológicos utilizados na caracterização da reatividade das amostras do painel de título misto caracterizadas frente ao HIV.

NOME DO TESTE	FABRICANTE	METODOLOGIA
HIV 1/2 EIA	Abbot	ELISA
Gen Sys HIV ½	Abbot	MEIA
Prism HIV o plus	Abbot	ELISA
HIV 1/2 ab captura	Ortho	ELISA
Vitros eci Hiv	Ortho	ELISA
Cobas core anti-HIV 1+2+0	Roche	ELISA
Determine tm HIV 1/2	Abbot	Imunocromatografia
Murex suds HIV-1	Murex	Imunocromatografia
Oraquick rapid HIV antibody test	Orasure	Imunocromatografia
G2 rapid HIV-1 antibody test	Medmira reveral	Imunocromatografia
Uni-gold recombigen ht	Trinity biotek	ELISA

4.4 FORMULAÇÃO DOS TAMPÕES DE CORRIDA

Foram objetos da validação, 07 reagentes (Cloreto de sódio, Fosfato Monobásico, Sulfato de Estreptomicina, EDTA dissódico, EDTA tetrassódico, Soro de Galinha e Tween 20) disponíveis no mercado nacional em comparação aos utilizados atualmente na produção do tampão de corrida do Teste Rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos.

A cada formulação do tampão de corrida foi realizada a substituição de um reagente importado por um reagente encontrado no mercado nacional, em três etapas diferentes, de acordo com a Tabela 1. Ao final de cada etapa, os reagentes correspondentes ao processo foram substituídos ao mesmo tempo para a formulação do tampão de corrida e ao final da última etapa, todos os sete reagentes foram substituídos ao mesmo tempo. Os demais componentes do kit não foram alterados.

Tabela 1.
Distribuição dos reagentes analisados no presente estudo de acordo com a etapa de sua utilização.

Etapa	Reagente analisado
1	Soro de galinha
	Sulfato de estreptomicina
	Cloreto de sódio
2	Tween 20
	EDTA dissódico
	Fosfato de sódio monobásico
3	EDTA tetrassódico

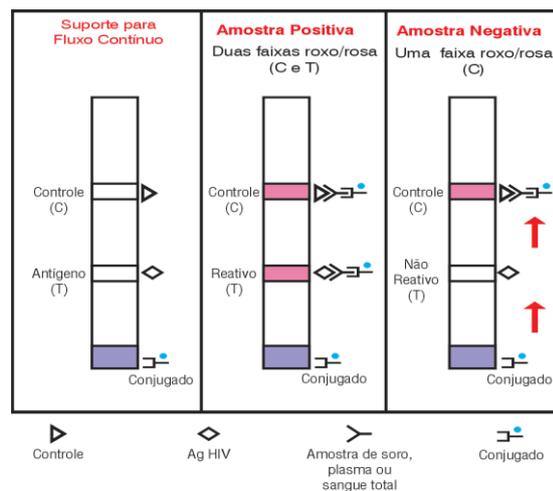
4.5 TESTE RÁPIDO PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE AO HIV

O teste pode ser realizado com amostras de soro, plasma, ou sangue total humano, obtido por punção digital.

O Teste Rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos foi realizado conforme instruções contidas no manual de instrução do fabricante.

A amostra é aplicada ao poço S, seguida pela adição de um tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral dos componentes liberados, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Os anticorpos presentes (caso existam) se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal. No caso de uma amostra ser positiva o complexo “imuno-conjugado” migra na membrana de nitrocelulose, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do teste (T) e produzindo uma linha roxo/rosa. Na ausência de anticorpos para HIV-1/2, a linha roxo/rosa não aparece na área do teste. Em todos os casos, a amostra continua a migrar na membrana produzindo uma linha roxo/rosa na área de controle (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes, conforme o esquema a seguir (Figura 12):

Figura 12. Representação esquemática de um teste rápido segundo a metodologia de cromatografia de fluxo lateral para HIV.



Fonte: BRASIL, 2009b.

Após a certificação de que os componentes do kit estavam à temperatura ambiente (Figura 13), foi retirado o quantitativo necessário para a execução do teste, verificando, concomitantemente, sua integridade. As amostras foram então identificadas no cassete sob a forma de número para preservar a identidade do paciente.

Figura 13. Componentes do kit Teste Rápido Stat-Pack® HIV-1/2 Bio-Manguinhos



Fonte: BRASIL, 2009b.

Foram aplicados ao suporte de teste 5 μ L na amostra, por meio de micropipetas automáticas devidamente calibradas pelo Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV) de Bio-Manguinhos. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas do tampão de corrida (Figura 14), aguardando por 10min à temperatura ambiente, para migração da amostra ao encontro das linhas teste e controle, por cromatografia. A migração ocorreu com sucesso em todas as amostras analisadas.

Figura 14. Aplicação do tampão de corrida no suporte de teste.



Fonte: BRASIL, 2009b.

Finalmente, procedeu-se a leitura do teste, descartando, em seguida, todos os componentes de maneira apropriada.

4.5.1 Leitura e Interpretação do teste

A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas conforme preconizado e descrito no manual de instruções do kit. Para se determinar um resultado não reagente, utilizou-se a indicação por meio do aparecimento de uma linha roxa/rosa na área Controle (C) e nenhuma linha na área Teste (T). Um resultado não-reagente, após 10min da aplicação do tampão de corrida indicou a ausência de anticorpos para HIV-1/2 na amostra (Figura 15).

Figura 15. Resultados não reagentes na reação de Teste Rápido HIV 1/2. Stat-Pack®



Fonte: BRASIL, 2009b.

A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área Controle (C) e outra área Teste (T) indicou um resultado reagente (Figura 16). A intensidade da linha na área Teste (T) pode variar 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), porém, isto não invalida o teste. Conforme recomendação da bula, mesmo uma linha muito clara na área de Teste (T) deve ser considerada um resultado reagente. Um resultado reagente deve ser confirmado, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde.

Figura 16. Resultado reagente na reação de Teste Rápido Stat-Pack® HIV 1/2.



Fonte: BRASIL, 2009b.

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 (Figura 17). 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 17. Resultados inconclusivos ou inválidos na reação de Teste Rápido Stat-Pack® HIV 1/2.



Fonte: BRASIL, 2009b.

Ao término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de Controle (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

4.6 DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Para avaliação quantitativa do teste realizado por meio do tampão de corrida composto por insumos nacionais frente aos importados, foram utilizados os cálculos para determinação da sensibilidade e especificidade.

A sensibilidade permite mensurar a capacidade de um teste em identificar, com correção as amostras que efetivamente a presença de anticorpos para o HIV, o que caracteriza um resultado verdadeiro positivo (VP). A sensibilidade foi calculada pela relação:

$$\text{Sensibilidade} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN} \times 100$$

A especificidade permite mensurar a capacidade de um teste em identificar, com correção, uma amostra que não possui anticorpos para o HIV, 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 podem conduzir a resultados falso positivos (FP) e falso negativos (FN) (Quadro 5).

Quadro 5.

Possibilidades de resultado de um Teste para avaliação da sensibilidade e especificidade (ATALLAH, 1989).

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

NP = Número total de amostras positivas, NN = Número total de amostras negativas, VP = Verdadeiro positivo, FP = Falso positivo, FN = Falso negativo, VN = Verdadeiro negativo

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes realizados por meio da utilização dos insumos nacionais e importados foram avaliados quanto à significância, em 95% de intervalo de confiança, pelo Teste McNemar, por meio do software Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Estados Unidos) (MCNEMAR, 1947). A análise quantitativa foi realizada por meio do cálculo de sensibilidade e especificidade, utilizando WinEpiscope versão 2.0 (Clive Consortium, Reino Unido).

5 RESULTADOS

Na presente avaliação foram analisadas 25 amostras de painel comercial de título misto PRB204, 05 indeterminadas (sendo destas, 03 reativas e 02 não reativas), 01 não reativa e 19 reativas para HIV; 25 amostras de doadores de sangue do Hospital Clementino Fraga Filho, da UFRJ e 25 amostras de indivíduos infectados pelo HIV do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, IPEC-Fiocruz/RJ (20 amostras reativas e 05 amostras não reativas).

Nas diversas etapas deste estudo, os reagentes importados foram substituídos pelos de origem nacional, separadamente ou em forma mista, onde todos foram substituídos ao mesmo tempo. Para as amostras de painel de título misto, todos os testes (100%) foram reprodutivos ($p = 1,000$), 19 amostras foram reagentes ao HIV-1/2 e 6 amostras foram não reagentes a HIV-1/2 (Tabelas 2, 4 e 6), mesmo com a substituição dos reagentes importados pelos nacionais. Não houve reatividade para as amostras indeterminadas.

De maneira análoga, em todas as etapas do estudo, para as amostras clínicas provenientes do IPEC/Fiocruz, 20 amostras foram reagentes para HIV-1/2 ao passo que 5 amostras foram não reagentes (Tabelas 3, 5 e 7). Não observamos amostras caracterizadas como indeterminadas no Teste Rápido HIV – 1 / 2.

Tabela 2.

Resultados dos ensaios do Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras de painel comercial de título misto por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.

Reagente avaliado	Resultado do teste	Importado (n)	Nacional (n)
Soro de galinha	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
Sulfato de estreptomicina	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
Cloreto de sódio	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
Soro de galinha; Sulfato de estreptomicina; Cloreto de sódio	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6

p = 1,000 ; sensibilidade = 100% especificidade = 100%

Tabela 3.

Resultados dos ensaios do Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras clínicas por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.

Reagente avaliado	Resultado do teste	Importado (n)	Nacional (n)
Soro de galinha	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5
Sulfato de estreptomicina	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5
Cloreto de sódio	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5
Soro de galinha; Sulfato de estreptomicina; Cloreto de sódio	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5

p = 1,000 ; sensibilidade = 100% especificidade = 100%

Tabela 4.

Resultados dos ensaios do Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras de painel comercial de título misto por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.

Reagente avaliado	Resultado do teste	Importado (n)	Nacional (n)
Tween 20	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
EDTA Dissódico	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
Fosfato de sódio monobásico	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
Tween 20; EDTA Dissódico; Fosfato de sódio monobásico	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6

p = 1,000 ; sensibilidade = 100% especificidade = 100%

Tabela 5.

Resultados dos ensaios do Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras clínicas por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.

Reagente avaliado	Resultado do teste	Importado (n)	Nacional (n)
Tween 20	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5
EDTA Dissódico	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5
Fosfato de sódio monobásico	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5

p = 1,000 ; sensibilidade = 100% especificidade = 100%

Tabela 6.

Resultados dos ensaios do Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras de painel comercial de título misto por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.

$p = 1,000$; sensibilidade = 100% especificidade = 100%

Insumo/reagente avaliado	Resultado do teste	Importado (n)	Nacional (n)
EDTA Tetrassódico	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6
Cloreto de sódio; Soro de Galinha; Sulfato de estreptomicina; Tween 20; EDTA Dissódico; Fosfato de Sódio Dibásico e EDTA Tetrassódico.	Reagente	19	19
	Não-Reagente	6	6

Tabela 7.

Resultados dos ensaios do Teste Rápido HIV-1/2 realizados com 25 amostras clínicas por meio da substituição dos reagentes importados pelos de origem nacional.

Insumo/reagente avaliado	Resultado do teste	Importado (n)	Nacional (n)
EDTA Tetrassódico	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5
Cloreto de sódio; Soro de Galinha; Sulfato de estreptomicina; Tween 20; EDTA Dissódico; Fosfato de Sódio Dibásico e EDTA Tetrassódico.	Reagente	20	20
	Não-Reagente	5	5

$p = 1,000$; sensibilidade = 100% especificidade = 100%

Não houve diferença estatística entre os resultados dos testes realizados, comparando os reagentes nacionais e importados para todos os reagentes usados.

Quanto à sensibilidade e especificidade, todos os ensaios realizados mostraram 100% em ambos os parâmetros, por não apresentarem resultados falsos-positivos e falsos-negativos, quando os testes realizados compararam o desempenho dos insumos nacionais e importados, sob as mesmas condições de realização. Não houve diferença significativa entre os custos dos 07 reagentes nacionais avaliados frente aos importados. Em princípio não foi concluído o valor do frete em detrimento de distância, peso da embalagem, natureza do produto, temperatura conforme demonstrado no Quadro 6.

Quadro 6.

Planilha de custo dos reagentes nacionais e importados para a produção do tampão de corrida, em volume de 8.000 mL.

Descrição	Insumos Nacionais		Insumos Importados	
	Custo unitário (R\$)	Custo total (R\$)	Custo unitário (R\$)	Custo total (R\$)
Azida sódica	1,65	26,46	1,65	26,46
Avidina	8,89	0,71	8,89	0,71
Sulfato de gentamicina	102,56	1.025,60	102,56	1.025,60
Sulfato de estreptomicina*	3,79	37,92	2,00	20,00
Frasco pet	580,00	0,58	580,00	0,58
Cloreto de sódio*	0,03	1,93	0,08	5,61
Fosfato sódio monobásico monohidratado	0,21	5,74	0,21	5,74
Tween 20*	0,06	0,48	0,85	6,76
Fosfato de sódio dibásico*	0,05	3,68	0,29	23,69
EDTA tetracético*	0,08	1,38	0,33	5,45
EDTA dissódica*	47,08	1,40	303,60	9,04
Soro de galinha*	0,07	59,20	0,05	37,87
Total (R\$)	-	1.165,08	-	1.167,51

* Insumos avaliados neste estudo

Fonte: Departamento de Contabilidade/Administração/Bio-Manguinhos (2012).

6 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, que permite 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 relação custo/eficácia (SAVILLE *et al.*, 2001).

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, tais como equipamentos, infraestrutura laboratorial, rede de frio, transporte, pessoal treinado 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 fluido oral, além de punção venosa. O procedimento do 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).

Com o uso dos testes rápidos e a possibilidade de realização do diagnóstico da infecção pelo HIV em uma única consulta, com o teste rápido, elimina a necessidade de mais de uma vinda do usuário ao serviço de saúde para conhecer seu *status* sorológico e possibilita a rápida assistência aos portadores do HIV. Essas vantagens são de fundamental importância na prevenção da transmissão vertical do HIV e da transmissão do vírus em acidentes com material biológico, bem como facilitam o diagnóstico dessa infecção em populações vulneráveis e de difícil acesso. Além disso, esses testes não demandam uma estrutura laboratorial e altamente

pessoal especializado. Mesmo com tantas vantagens, a ampliação da testagem para o HIV no Brasil, utilizando o teste rápido, precisou superar muitas barreiras (BRASIL, 2007).

Sendo assim, o Programa Nacional de DST e Aids vem tomando medidas para favorecer o acesso ao diagnóstico por meio da incorporação do teste rápido para HIV, em algumas localidades. Sua implantação aperfeiçoa as vantagens desse tipo de teste como potente insumo, não apenas da perspectiva de sua eficiência e confiabilidade, mas também em termos da sustentabilidade econômica e da relação custo-benefício. Outra vantagem a ser levada em conta é a possibilidade de oferecer acolhida imediata aos portadores do HIV dentro da estrutura assistencial do SUS, acelerando o seu acesso à rede de serviços de saúde. Além disso, é presumido que a estrutura dos laboratórios centrais fica menos sobrecarregada para se concentrar na realização de testes que demandam maior sofisticação técnica. No Brasil, a pertinência de utilização dos testes rápidos parte de dois problemas centrais: o primeiro refere-se à fragilidade e precariedade da infraestrutura e de recursos humanos disponíveis em alguns lugares do país, onde persistem limitações para desenvolver uma atenção bem organizada e integralmente eficiente. Conspiram para isto as grandes disparidades de natureza social, econômica, cultural e regional e, conseqüentemente, a reprodução dessas desigualdades no âmbito do sistema de saúde; o segundo implica em limitações para efetuar o diagnóstico em tempo oportuno. Constata-se, em algumas localidades, a longa demora no retorno dos testes padrão e percebe-se, comumente, a impossibilidade de alguns usuários para retornar e receber seu diagnóstico (BRASIL, 2007, BRASIL, 2007a).

O Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos, conjunto de diagnóstico registrado na ANVISA / MS é uma plataforma tecnológica que se baseia na tecnologia de Imunocromatografia de Fluxo Lateral, desenvolvido e padronizado para ser usado na etapa de triagem do diagnóstico da infecção pelo HIV/aids. Resultados reativos são evidências de exposição ao HIV-1/2 e podem ser usados como suporte ao diagnóstico clínico.

A tecnologia do Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos foi transferida a partir do kit Stat-Pak[®], da empresa Chembio Diagnostic Systems, Inc. (Medford, EUA), que detém os direitos sobre o processo produtivo. Como o processo de desenvolvimento do kit foi, em sua totalidade, realizado pela empresa, as marcas dos reagentes utilizados na produção das soluções são fielmente reproduzidas por

Bio-Manguinhos, sendo todos eles importados. Este cenário nos levou a realizar um estudo no mercado nacional à procura de reagentes que pudessem ser substituídos pelos nacionais. Dentre os componentes do kit, o tampão de corrida apresenta importância peculiar por ser constituído de diversos insumos, que em solução, participam do processo de migração da amostra para os demais módulos. Por esse fator, optamos por direcionar o estudo em todos os reagentes utilizados na formulação do tampão de corrida.

Para a realização do trabalho de avaliação dos reagentes nacionais, foi utilizado o painel Anti-HIV Mixed Titer Performance PRB204 (Painel de Título Misto) contendo amostras com resultados definidos e caracterizados, além disso, foram utilizadas amostras clínicas provenientes de indivíduos infectados pelo HIV que realizam monitoramento de carga viral e contagem de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC, Fiocruz) e de doadores do Banco de Sangue do Hospital Clementino Fraga Filho, da UFRJ.

A avaliação do desempenho do tampão de corrida formulada com reagentes nacionais frente ao Teste Rápido produzido e fornecido por Bio-Manguinhos foi realizada de acordo com o fluxograma disposto na Portaria n°151 SVS/MS, de outubro de 2009.

Os ensaios de ELISA e Imunocromatografia (teste rápido) foram utilizados na caracterização de todas as amostras, sendo elas clínicas ou de painel de título misto, por meio de plataformas comerciais registradas nos órgãos reguladores. Além disso, o Western Blot foi complementarmente utilizado nas amostras clínicas. Quando o resultado dos ensaios de Teste Rápido realizados por meio do tampão de corrida com insumos nacionais foram comparados àqueles com insumos importados (utilizados, neste caso, como padrão-ouro), não houve ocorrência de falso-positivos ou falso-negativos, apresentado alta sensibilidade (100%) e especificidade (100%). Estes resultados nos permitiram observar que a substituição dos reagentes importados pelos nacionais não influenciou a reatividade do teste, sendo mantidas todas as características do processo.

Sabe-se que hoje, que o custo efetivo com a produção do tampão de corrida do kit Teste Rápido Stat-Pak[®], pelo Departamento de Produção de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos, ultrapassa a um mil reais por 8 litros produzidos. Esse capital é, evidentemente, proveniente de recursos da Autarquia Federal, que

repassa à Fiocruz, no sentido de garantir a execução do papel da Unidade como instituição pública à serviço da população brasileira. Em nosso trabalho, verificamos que não houve alteração do custo do teste com a substituição dos reagentes importados pelos de procedência nacional. Porém, não obtivemos os valores relativos ao frete de cada reagente utilizado no tampão de corrida, fosse ele nacional ou importado. Acreditamos que esse seja um fator considerável na avaliação final do custo de importação de um material proveniente da federação e que seja objeto de estudos futuros. Possivelmente os valores cobrados por frete de produtos importados proporcionaria um momento do custo de produção desses reagentes.

Em detrimento de várias dificuldades logísticas e contratuais encontradas no processo de aquisição de um material importado por um órgão público, a validação realizada neste estudo também nos permite sugerir a implementação de um exequível protocolo para avaliar os reagentes de fabricação nacional como ferramenta alternativa para casos, por exemplo, de descontinuação de um produto importado ou mesmo para a dificuldade em sua importação. Tal metodologia, por outro lado, levaria ao aumento exponencial da inserção de produtos nacionais licenciados pelas agências reguladoras, movimentando a economia do país e que, conseqüentemente, poderia promover um aumento dos recursos públicos destinados, inclusive, à saúde.

O Teste Rápido Stat-Pack[®] constitui desta forma, no quadro atual de insumos estratégicos para controle da epidemia, um instrumento ágil e importante. Mesmo sem a intenção de substituir os testes convencionais de diagnóstico para HIV, parece-nos uma alternativa para solucionar a longa demanda gerada pela carência de serviços especializados, ao mesmo tempo que redimensiona a temporalidade da epidemia. O fato do desempenho do teste e seu custo serem mantidos, independente do uso dos insumos importados ou obtidos no mercado interno, reforça a aplicabilidade e agilidade em sua utilização.

7 CONCLUSÃO

Em decorrência dos resultados observados mediante a avaliação do desempenho do tampão de corrida formulado com os reagentes nacionais frente ao convencional do Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos, podemos concluir que:

- Todos os reagentes nacionais analisados (soro de galinha, EDTA dissódico, EDTA Tetrassódico, Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado, Sulfato de Estreptomicina, Tween 20 e Cloreto de Sódio) podem ser utilizados na composição do tampão de corrida do Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos em substituição aos importados, com a condição de terem sido criteriosamente avaliados.
- Os ensaios de imunocromatografia de fluxo lateral realizados por meio do kit Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos apresentam desempenho semelhante quando o tampão de corrida é constituído tanto por insumos nacionais quanto importados;

8 PERSPECTIVAS DESTE ESTUDO

- Realizar estudo longitudinal para avaliar os reagentes utilizados neste trabalho. Torna-se necessário determinar a validade do produto obtido a partir de fabricação nacional.
- Garantir a efetiva substituição e fortalecer a substituição dos insumos e reagentes, pelos de origem nacional, sem comprometimento com a qualidade do produto final.

REFERÊNCIAS

AMERONGEN, A. van. Colloidal carbon particle as a new label for rapid immunochemical test methods: Quantitative computer image analysis of results. **Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 185-195, ago. 1993.

ATALLAH, A.N. Avaliação crítica dos testes diagnósticos e suas aplicações. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.25, n.2, p.60-63, jul.1989.

BARRÉ- SINOUSI, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, Washington, v. 220, n. 4599, p. 868-71, mai. 1983.

BARRÉ- SINOUSI, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, n. 9019, p. 31- 35, jul. 1996.

BENDET I. et. al. CO-INFECÇÃO HIV-1/HIV-2 NO BRASIL: AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS HIV-1 REATIVAS PARA HIV-2/GP36. **II congresso de Infectologia do Estado do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, ano: VIII, ed. N° 31, jul / set. 2010. Disponível em: <[HTTP://www.infectologia.org.asp?site_Ação=mostra&paginaId=136&..](http://www.infectologia.org.asp?site_Ação=mostra&paginaId=136&..)>. Acesso em: 18 mar. 2012.

BERTOZZI, S. M. et. al. Evaluation of HIV prevention programs: the case of Avahan. **Sexually Transmitted Infection**, Londres, v.86, i4-i5, mar. 2010.

BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ. **A quem se destina a produção de Biomanguinhos?** Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/perguntas-frequentes/226-a-quem-se-destina-a-prod...>>, 2010a. Acesso em: 12 mar. 2012.

BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ. **Perguntas freqüentes: reativos**. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/perguntas-frequentes/209-perguntas-frequentes-reat...>>, 2010b Acesso em: 15 mar. 2012.

BISMARA, B. A. P. **Padronização de Técnicas Moleculares para o Estudo da Resistência a Drogas Antiretrovirais em Crianças Infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) Via Perinatal**. 2006. 166 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnostico sorológico do HIV – Testes confirmatórios**. Programa da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, Brasília, Série TELELAB, 67p il, 1997a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **HIV Estratégias para Diagnósticos no Brasil**. Secretaria de vigilância Sanitária em Saúde de DST, Aids e Hepatites Virais, Série TELELAB – Triagem, Brasília, 1ª ed. 82p, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico sorológico - Testes de triagem**: Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, Brasília, Série TELELAB, 67p. il, 1997b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 6. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 816p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Instrução do Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) – Bio-Manguinhos para Diagnóstico da Infecção pelo HIV-1/2**, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2009c.

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, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2009d.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Aids/DST** – Versão Preliminar 2010 – Ano VII – Julho a dezembro de 2009/janeiro a junho de 2010a. Disponível em: <<http://www.aids.br>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Aids/DST** – Versão Preliminar 2011 – Ano VIII – nº 01 – Janeiro a Junho de 2011. Disponível em: <<http://www.aids.br>>. Acesso em: 08 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. **Formas de Contágio**, 2010c < <http://www.aids.gov.br/pagina/formas-de-contagio>>. Acesso em 17 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos- 3.ed - Brasília: Ministério da Saúde, 2010d. Disponível em: <[HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dire_trabalho_agentes_biol_3ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dire_trabalho_agentes_biol_3ed.pdf)>. Acessado em: 02 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Classificação de Risco dos reagentes Biológicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde._2.ed_Brasília: Ministério da Saúde, 2010e. Disponível em: http://bvsms.gov.br/bvs/publicações/classificação_risco_agentes_biológicos_2.ed.pdf .> Acessado em: 15 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução de Trabalho nº 0081**. Envio de amostras para o controle externo. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010f.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução de Trabalho nº 2438**. Sistema da qualidade para laboratórios que analisam amostras provenientes de ensaios clínicos. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010g.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução de Trabalho nº 3846**. Preparo filtração, envase, rotulagem e distribuição do tampão de corrida - Teste Rápido HIV 1/2. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010h.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Procedimento Operacional Padronizado nº 0014**. Diretrizes para gerenciamento de resultados fora de especificação. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010i.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Procedimento Operacional Padronizado nº 3602**. Recebimento, montagem e operação do chuveiro e lava-olhos transportável e portátil. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010j.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução de Trabalho nº2438**. Liberação do Produto Terminado do kit Teste Rápido HIV 1/2, 2010k.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Instrução do Teste Rápido – HIV 1/2 Bio-Manguinhos**. Teste Rápido de Triagem Qualitativa para a Detecção de Anticorpos para HIV-1/2. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saude. Portaria nº 686 de 27 de agosto de 1998 (ANVISA). Determina a todos os estabelecimentos que fabriquem produtos para diagnostico de uso “in vitro”, o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelas “Boas Práticas de Fabricação e Controle em Estabelecimentos de Produtos para Diagnóstico de Uso “in vitro”. **Diário Oficial da União**, p. 29, Publ. 28/08/1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 167, de 02 de julho de 2004 (ANVISA). Institui Roteiro de Inspeção para verificação do cumprimento de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos que Fabriquem ou Comercializem Produtos para Diagnóstico de Uso in vitro, a ser observado pelos órgãos de Vigilância Sanitária em todo o território nacional. **Diário Oficial da União**, p. 56, Publ. 08/07/2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Teste Rápido – Por que não**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Estudos que contribuíram para a política de ampliação da testagem para o HIV no Brasil. Programa Nacional de DST e Aids. Brasília, 132p., 2007.

BRASIL. Portaria n° 59 de 28 de janeiro de 2003. Dispõe sobre a sub-rede de Laboratórios do Programa Nacional de DST e AIDS. **Diário Oficial da União n° 2444**, pag. 45. Disponível em: <http://www.bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2003/prt0059_28_2003.html> Acesso em 03 mar. 2012.

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. **Diário Oficial da União**, p. 40, Publ. N° 16/10/2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Segurança Biológica em laboratório**. Organização Mundial de Saúde. 3 ed. Genebra, 2004. Disponível em:<[HTTP://www.who.int/csr/resources/publications/biosafy/bislab/manual3rdwebport.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafy/bislab/manual3rdwebport.pdf)>. Acessado em: 01 abr. 2012.

BRINDEIRO, R. M. et al. Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (HIV BResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, v. 17, n. 7, p. 1063-1069, mai. 2003.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL, Interpretation and use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Washington, v. 38, n. S-7, p. 1-7, jul 1989.

CHAN, D. C. et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. **Cell Press Journal**, v. 89, n. 2, p. 263-73, abr. 1997.

CLAPHAM, P. R.; WEISS, R. A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**, v. 388, n. 6639, p. 230-231, jul. 1997.

CLAVEL F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, Washington, v. 233, n. 4761, p. 343-346, jul. 1986.

CONSTANTINE, N. T.; ZINK, H. HIV testing technologies after two decades of evolution. **Indian Journal of Medical Research**, Baltimore, v. 121, n. 4, p. 519-538, abr. 2005.

CORNELISSEN, M. et al., UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes defined by *env* show high frequency of recombinant *gag* genes. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n.11, p. 8209-8212, nov. 1996.

COSTA, S. F. et al., HIV: Mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, 2010.

COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al., 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 73-78, fev. 2005.

DORFMAN, T. et. al., Hole of the matrix protein in the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1689-1696, mar. 1994.

FERREIRA, A. G. P. **Processo de Transferência da Tecnologia de Produção do Teste Rápido de HIV-1 e HIV-2 em Bio-Manguinhos: Um Modelo para a Incorporação de Novas Tecnologias**. 2005, 95p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FERREIRA-JUNIOR, O. C.; FERREIRA, C.; RIEDEL, M.; WIDOLIN, M. R.; BARBOSA-JÚNIOR, A.; HIV RAPID TEST STUDY GROUP. Evaluation of Rapid Tests for anti-HIV Detection in Brazil for the HIV Rapid Test Group. **AIDS- Journal of The International AIDS Society**, Londres, 19 (suppl4): S70 – S75, 2005.

FIOCRUZ identifica ocorrência de casos de coinfeção por HIV-1 e HIV-2 no Brasil. **NEWSLAB**. ANO XVII – n.102, p.10, São Paulo, out./nov. 2010.

GALLO, R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, Washington, v. 220, n. 4599, p. 865-867, mai. 1983.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency vírus . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 453-456, out./dez.1987.

GAO, F. et al. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. **Nature**, v. 358, n. 6386, p. 495-499, ago. 1992.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 305, n. 24, p. 1425-1431, dez. 1981.

GUIMARAES, M. L. et al. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Research Human Retroviruses**, Nova York, v. 18, n. 17, p. 1261-1269, nov. 2002.

GULTLER, L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. **Lancet**, v. 348, n. 9021, p. 176-179, jul. 1996;

HIRSCH, V. M. et al. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature**, Londres, v. 339, n. 6223, p. 389-392, jun. 1989.

HIV Medicine, **Patogênese da infecção pelo VH1**, 2008. Disponível em: <http://hivmedicine.aidsportugal.com/html/03_Pathophys.html> Acessado em: 07 set. 2011

INSTITUTO OSWALDO CRUZ – **IOC identifica casos de coinfeção por HIV-1 e HIV-2 no Brasil.** Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=941&sid=32>>.

Acessado em: 11 de outubro de 2010.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ – **Vírus da Aids, 20 anos depois.** Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/aids20anos/aidsmat3.html>>. Acesso em: 13 mar.2012.

KETEMA F. et al. Assessment of the performance of a rapid lateral flow assay for the detection of antibodies to HIV. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 72, n. 1, p. 63-70, mai. 2001.

LEUVERING, J. H. W. et al. Sol particle immunoassay (SPIA). **Journal of Immunoassay**, Nova Iorque, v. 1, n. 1, p. 77-91, jan. 1980.

MACHADO, A. A.; COSTA, J. C. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 1, p.138-146, abr./jun. 1999.

MCNEMAR, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. **Psychometrika**, v. 12, n. 2, p. 153-157, 1947.

MORGADO, M.G. et al. 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 Research and Human Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569-576, mai. 1994.

MORGADO, M. G.; GUIMARAES, M. L.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 143-50, mar. 2002.

MORIMURA, M. C. et al. Frequência de testagem rápida para o HIV durante a admissão para o parto em puérperas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 6, s. 1, p. S69-S76, mai. 2006.

MONTEIRO-CUNHA J. P. et al. Lack of Hight Resistance Mutations in HIV Type 1 BF Recombinant Strains circulating in Northeast Brazil. **AIDS RESEARCH AND RETROVIRUSES**, New York, v.6, p.623, junho 2011.

NAKAI, M.; GOTO, T. Ultrastructure and morphogenesis of human immunodeficiency. **Journal of Electronic Microscopy**, Tóquio, v. 45, n. 4, p. 247-57, ago. 1996.

PAUL, M. S.; BEATRICE, H. H. The evolution the HIV and the origin of AIDS. **Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences**, Londres, v. 365, n. 1552, p. 2487-94, ago. 2010.

PINTO A. C. S. et al. Compreensão da Pandemia da Aids nos últimos 25 anos. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmitidas**, v. 19, n. 1, p. 45-50, fev. 2007.

POPOVIC, M. et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 497-500, 1984.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A; KORF, J.; AMERONGEN, A. van. Lateral flow (immune) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 569-582, jan. 2009.

SANTOS-COSTA, Q.; SILVA, R. V.; AZEVEDO-PEREIRA, J. VIH-2 e o labirinto da patogénese - situação hospitalar: as Boas Práticas no âmbito da infecção VIH/SIDA, 2008. In: X CONGRESSO VIRTUAL DE HIV/AIDS: O VIH/SIDA nos países de Língua Portuguesa. **Ciclo infeccioso do HIV**. Disponível em: <http://www.aidscongress.net/Modules/WebC_AidsCongress/CommunicationHTML.aspx?Mid=39&CommID=114>. Acesso em: 15 dez. 2009.

SAVILLE, R. et al. Fourth generation immunoassay for the simultaneous detection of antigen and antibody utilizing an automated platform. **Journal clinical Microbiology**; 30: 2518 – 24, 2001.

SIMMONS, G. et al. Primary, syncytium-induction human immunodeficiency virus type 1 isolates are dualtropic and can use either or CCR5 as co-receptors for virus entry. **Journal of Virology**, Massachusetts, v. 70, n. 12, p. 8355-8360, dez. 1996

SIMON, F. et al. Sensitive of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. **AIDS**, Londres, v. 8, n. 11, p. 1628-1629, nov. 1994.

SMITH, M. W. et al. SJCCR2 chemokine receptor and AIDS progression. **Nature Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1160-1162, out. 1997.

SOARES, M. A. et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. **AIDS**, v. 17, p. 11-21, jan. 2003.

The Biologic Project Immunology. Disponível em:
http://www.biology.arizona.edu/IMMUNOLOGY/activities/elisa/elisa_intro.html.
Acessado, em 15 de mar. 2012.

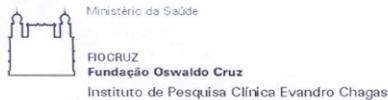
TSCHERNING, C. et al. Differences in chemokine co-receptor usage between genetic subtypes of HIV-1. **Virology**, Massachusetts, v. 241, n. 2, p. 181-188, feb. 1988.

UNAIDS. Relatório Global sobre a epidemia de aids no mundo. Disponível em:
< <http://www.aids.gov.br/galerias/2011>. Acessado em: 01 mar. 2012.

VELOSO, A.C.R; FINK, H.T.K; LIMA, L.M.P. Genotipe resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiretroviral. **Com. Ciências Saúde**, 21 (1): 49-60, agosto 2010.

ZHU, T. et al. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. **Nature**, v. 391, n. 6667, p. 531-532, fev. 1998.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IPEC/FIOCRUZ.



Rio de Janeiro, 21 de fevereiro de 2011.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC
Para: Dra. Maria de Lourdes de Sousa Maia

Prezada Dra. Maria de Lourdes,

O projeto **“Validação dos reagentes e insumos disponíveis no mercado nacional em comparação aos utilizados atualmente na produção do tampão de corrida do teste rápido para diagnóstico de HIV-1/2 produzido por Bio-Manguinhos”**, submetido a este Comitê em 15/02/2011, trata-se de um adendo ao **“Projeto de avaliação dos conjuntos de diagnóstico desenvolvidos por Bio-Manguinhos”**, coordenado pelo Dr. José Antonio Pinto de Sá Ferreira, registrado sob o CAAE 0017.0.009.000-08 e aprovado por este Comitê em 09/06/2008.

Partindo desse adendo, Claudia Bastos Barroso, aluna do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz, apresenta sua dissertação de mestrado propondo-se a validar os reagentes disponíveis no mercado nacional em comparação aos atualmente utilizados na produção do tampão de corrida do teste rápido para diagnóstico de HIV-1/2 por imunocromatografia e fluxo lateral produzido por Bio-Manguinhos/Fiocruz, objetivando-se: 1) Selecionar o painel comercial de título misto e amostras clínicas caracterizadas para HIV para a determinação de sensibilidade, especificidade; 2) Avaliar o desempenho do tampão de corrida formulado com reagentes encontrados no mercado nacional, frente ao kit teste rápido produzido por Bio-Manguinhos/Fiocruz; 3) Propor a validação dos insumos encontrados no mercado nacional ao responsável pela transferência da tecnologia. A amostra inicial a qual se reporta esta validação será composta de 06 (seis) reagentes (Fosfato de Sódio Monobásico, Sulfato de Estreptomicina, EDTA Difásico, EDTA Tretassódico, Azida Sódica e Soro de Galinha), provenientes e fornecidas por duas empresas nacionais. Os critérios utilizados para a seleção dos reagentes foram em consequência de serem importados e



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



utilizados na formulação do tampão de corrida que compõe o Kit de Teste Rápido para HIV-1/2 produzido por Bio-Manguinhos.

Este documento foi apreciado e aprovado por esta Coordenação na presente data.

Atenciosamente,

Dr.^a Lúcia Camillo Costa
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

VL

ANEXO C - PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DOS INSUMOS NACIONAIS NO KIT PARA TESTE RÁPIDO HIV-1 / 2.

Data inicial da análise:

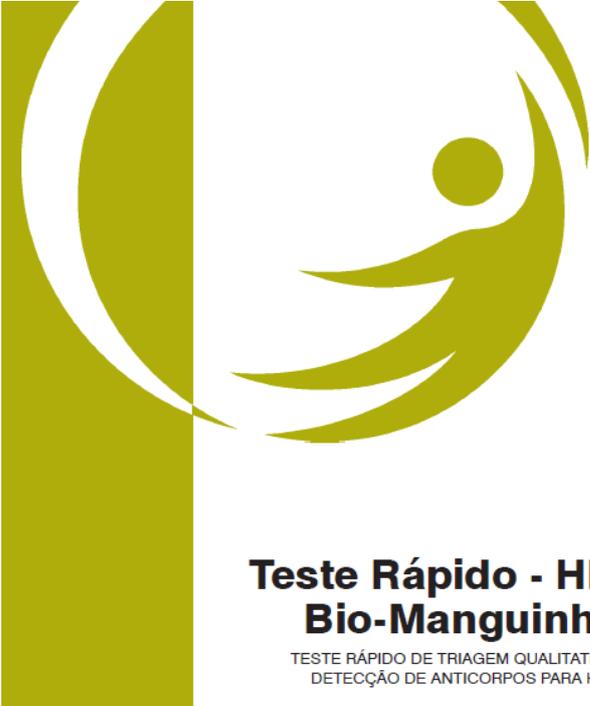
Data final da análise:

Laboratório:

COMPONENTES	LOTE	FABRICAÇÃO	VALIDADE
KIT			
SUORTE			
ALÇA COLETORA ESCARTÁVEL			
CURATIVO ADESIVO			
TAMPÃO DE CORRIDA			

Técnico Responsável: _____

ANEXO D - MANUAL DE INSTRUÇÃO DO TESTE RÁPIDO - HIV-1/2 - BIO-MANGUINHOS.



Ministério da Saúde
Fiocruz
 Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

SAC: 08000.210.310
 sac.reativos@bio.fiocruz.br
 www.bio.fiocruz.br

Teste Rápido - HIV-1/2 Bio-Manguinhos

TESTE RÁPIDO DE TRIAGEM QUALITATIVA PARA
 DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA HIV-1/2

Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos TESTE RÁPIDO DE TRIAGEM QUALITATIVA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA HIV-1/2 (material fornecido para 20 determinações)

INDICAÇÃO DE USO:

O Teste Rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos é um teste de triagem de uso único, que usa um coquetel de antígenos para detectar anticorpos para HIV-1/2 em soro, plasma e sangue total, humanos. O teste se baseia nas tecnologias de imunocromatografia e fluxo lateral. Resultados reativos são evidências de exposição ao HIV-1/2 e podem ser usados como suporte ao diagnóstico clínico. O Teste Rápido HIV-1/2 – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS:

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um retrovírus, identificado em 1983 como agente etiológico da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A AIDS é caracterizada por mudanças na população de linfócitos T, que tem um papel chave no sistema imunológico. Nos indivíduos infectados o vírus causa uma redução da sub-população de células T, chamadas células T "helper", que torna estes pacientes suscetíveis a infecções oportunistas e certas malignidades. As principais vias de transmissão são: relação sexual desprotegida, contaminação por sangue ou hemoderivados e a transmissão de mãe para filho durante o parto.

De acordo com o relatório anual do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids, existem no mundo aproximadamente 33 milhões de pessoas vivendo com HIV/aids. Esse número inclui os 2,7 milhões estimados de pessoas que adquiriram o HIV durante o ano de 2007.

Em termos globais, as mulheres contribuem com a metade do número de casos de infecção pelo HIV.

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

15

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
 Bio-Manguinhos | Fiocruz
 CNPJ: 33.781.055/0001-35

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
 CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ
 SAC: 08000.210.310 ou sac.reativos@bio.fiocruz.br
 www.bio.fiocruz.br

Edição: julho de 2009
 BM-BUL-049-05-R-190751
 Texto: MI_TRHIV_20_06

14 Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

- Um resultado não-reagente não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por HIV, dado que uma resposta imunológica à exposição recente pode levar alguns meses para atingir níveis detectáveis.
- Como todo teste sorológico que se baseia na detecção de anticorpos, não recomendamos a utilização do "TR-HIV-1/2-Bio-Manguinhos" para amostras de crianças com idade inferior a 2 anos

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Em estudo comparativo entre Ensaio Imunoenzimático (EIE) e os kits Teste Rápido *Stat Pak*® realizado pelo Grupo de Avaliação do TR para HIV-1/2 no Brasil, foi evidenciado que kits *Stat Pak*® para TR com Sensibilidade Clínica igual a 100% e Especificidade Clínica igual a 99,77%.

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

A simplicidade e rapidez na utilização dos kits *Stat Pak*® de TR garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz no diagnóstico rápido da infecção por HIV-1/2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Essex, M. (1999) Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Adv Virus Res* 53:71-88.
2. Kanki, P.J.; Hopper, J.R. and Essex, M. (1978) The origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2. *Ann N Y Acad Sci* 511: 370-375.
3. Nicoll, A.; Gill, O.N. (1999) The global impact of HIV infection and disease. *Commun Dis. Publ Health* 2: 85-95.
4. Valdiserri, R.O.; Holtgrave, D.R.; West, G.R. (1999) Promoting early diagnosis and entry into care. *AIDS* 13: 2317-2330.
5. UNAIDS. 2008 report on the global HIV/AIDS epidemic.
6. Essex, M.; Kanki, P.J.; Marlink, R., et al. (1990) Antigenic characterization of the human immunodeficiency viruses. *J Am Acad Dermatol* 22:1206-1210.

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

3

A África Subsaariana é a região mais afetada, com aproximadamente dois terços do total mundial (22 milhões de pessoas com o HIV) e desse número três quartos são do sexo feminino.

O HIV é constituído por uma molécula de RNA, protegida por um capsídeo e um envelope. O envelope do HIV é o principal alvo da resposta imune. A presença do vírus faz com que o sistema imune dos pacientes produza anticorpos anti-HIV. A detecção destes anticorpos pode ser usada como um instrumento de diagnóstico.

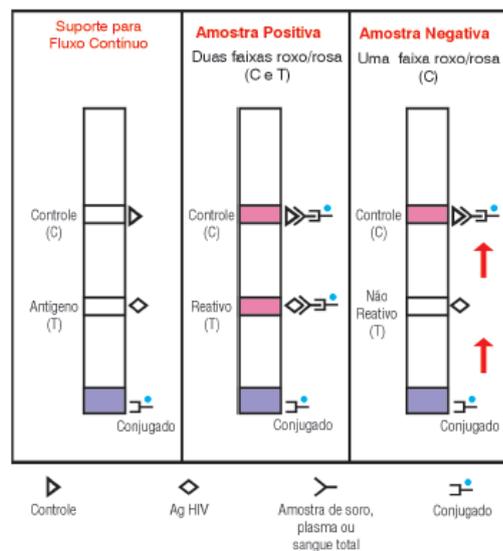
O sistema do Teste Rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos utiliza antígenos fixados para a detecção de anticorpos para o HIV-1/2 em soro, plasma ou sangue total humanos. O Teste Rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos é um teste imunocromatográfico rápido de simples execução. Ensaio imunoenzimáticos, Imunofluorescência, Western Blot, técnicas de PCR e diversos outros testes também estão disponíveis para a detecção do HIV-1/2.

PRINCÍPIO DO TESTE:

O Teste Rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos emprega uma combinação de uma proteína conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos de HIV-1/2 ligados a uma fase sólida (membrana). A AMOSTRA é aplicada ao respectivo poço (S), seguida pela adição de um tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral dos componentes liberados, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Os anticorpos presentes (caso existam) se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal. No caso de uma amostra ser positiva o complexo "imuno-conjugado" migra na membrana de nitrocelulose, sendo capturado pelos antígenos fixados na área do TESTE (T) e produzindo uma linha roxa/rosa. Na ausência de anticorpos para HIV-1/2, a linha roxa/rosa não aparece na área do teste. Em todos os casos, a amostra continua a migrar na membrana produzindo uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

4 Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

ESQUEMA DO TESTE:



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

13

CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE:

Após o término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO:

Comunicado Importante:

- Resultados falso-negativos podem ser obtidos caso o teste seja utilizado em amostras de pacientes conhecidamente soropositivos, que estejam ou tenham sido submetidos à terapia anti-retroviral.
- O kit Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.
- O kit Teste Rápido para HIV-1/2 Bio-Manguinhos deve ser utilizado apenas com amostras de sangue total (por punção digital ou venosa), soro ou plasma. Outros tipos de amostra ou amostras de sangue coletadas em tubos contendo anticoagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados.
- Faça a leitura do teste em no máximo 10 minutos.
- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.
- Não utilize kits ou componentes com a data de validade vencida.
- Um resultado reagente sugere a presença de anticorpos para HIV-1 e/ou HIV-2 na amostra testada.
- No caso de um resultado reagente, a intensidade da linha de teste não está necessariamente relacionada ao título de anticorpos na amostra.
- Inicialmente, pressupõe-se um indivíduo que apresenta anticorpos para HIV-1 ou HIV-2 esteja infectado com HIV. Exceto no caso dos voluntários de estudos clínicos com vacinas anti-HIV, que podem ter desenvolvido anticorpos para a vacina, estando ou não infectados com o vírus.

12 Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

Resultados Reagentes



A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escura conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de 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 recomendações do MS (Ministério da Saúde).

Resultados Inconclusivos ou Inválidos



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 novo suporte de teste e nova amostra. Caso o problema persista, entrar em contato com o Serviço de Atendimento ao Cliente (SAC) 08000.210.310.

6 Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como: O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde, segundo as instruções contidas neste manual.

Não realizar mais de (5) cinco testes por vez. Esta conduta reduz falhas no procedimento do teste para realização do Teste Rápido HIV 1/2 Bio-Manguinhos, bem como na interpretação dos resultados;

- As amostras, assim como outros insumos, devem ser estocadas e manipuladas adequadamente;
- As amostras devem ser homogêneas antes do uso;
- As amostras de sangue devem ser preferencialmente utilizadas imediatamente após a coleta. Caso estas amostras não sejam testadas imediatamente, estas devem ser refrigeradas logo após a coleta, podendo ser usadas em até 3 dias. Não devem ser utilizadas amostras de sangue com mais de 3 dias de armazenagem;
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas refrigeradas por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro deste período, as amostras devem ser congeladas (-20°C ou abaixo);
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após sua data de validade;
- Componentes ou kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- A integridade dos componentes do kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta e que nenhuma linha seja visível na janela do suporte de teste. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, não utilizar o kit. Segregar o kit e entrar em contato com o SAC;
- Nunca fracionar os kits;
- Não pingar sangue diretamente da ponta do dedo no suporte de

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

5

MATERIAL FORNECIDO:

Apresentação:	
Suportes de Teste	20 unidades
Tampão de Corrida	1 Frasco com 5 mL
Alças Coletoras Descartáveis (5 µL)	20 unidades
Lancetas Descartáveis	20 unidades
Curativo Adesivo	20 unidades
Manual de Instrução de Uso	1 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO:

- Cronômetro e ou relógio
- Micro-pipetador calibrado para 5µL
- Luvas descartáveis
- Algodão
- Álcool 70%
- Recipiente seguro para descarte de material biológico

Obs: em caso de coleta de sangue do dedo, também é necessário:

- algodão
- álcool 70%

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

O kit Teste Rápido HIV-1/2 Bio-Manguinhos deve ser mantido/armazenado entre 2°C e 30°C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30°C. **Não congele o kit ou seus componentes.** Os envelopes contendo os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida também deve ser mantido entre 2°C e 30°C, em seu recipiente original (frasco conta-gotas).

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

Somente para uso em diagnóstico *IN VITRO*.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos

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

11

5. Aplicar 3 gotas de tampão no suporte de teste.

Manter o frasco na posição vertical para garantir que o volume adequado de tampão seja aplicado ao suporte.



6. Aguardar 10 minutos para a migração dos componentes pela fita de teste e ler o resultado. Descartar o teste em seguida. Leituras posteriores a esse período não devem ser consideradas.



LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Resultados Não Reagentes

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

10 Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

1. **Separar os componentes.**
Verificar a integridade de todos os componentes e a inexistência de linhas na janela do suporte de teste. Caso contrário, descartar o teste.
2. **Utilizar a lanceta para obtenção da amostra de sangue.**
Seguir as instruções contidas no manual de uso da lanceta.
3. **Coletar a amostra, utilizando a alça coletora de 5 µL.**
Alternativamente pode-se utilizar micropipeta calibrada para 5 µL.
4. **Aplicar a amostra no suporte de teste.**
Assegurar que a alça esteja na posição vertical e que a amostra seja dispensada no centro do orifício.

*Fotos meramente ilustrativas.



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

7

teste. Utilizar sempre a alça coletora fornecida no kit, segundo as orientações abaixo (seguir Procedimento para Realização do Teste Rápido HIV 1/2 Bio-Manguinhos);

- Não adicionar volumes de amostra superiores ao preconizado (5µL);
- Cuidado ao adicionar a amostra: a alça deve ser mantida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício ou poço (S) do suporte de teste;
- Cuidado ao adicionar o tampão: o frasco deve ser mantido em posição vertical e apenas três gotas do líquido devem ser dispensadas ao orifício ou poço (S) do suporte de teste onde se encontra a amostra;

ATENÇÃO: alguns resultados reagentes podem aparecer em menos de 10 minutos, mas são necessários 10 minutos para detectar um resultado não-reagente. Ler os resultados em ambiente bem iluminado.

- Não ler os resultados após o período preconizado para a realização do teste (10 minutos);
- Após o uso, suportes, ponteiros, lancetas, alças coletoras e luvas devem ser descartados em água sanitária ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%.

COLETA DE AMOSTRA:

ATENÇÃO: para o perfeito funcionamento do teste, usar 5µL de amostra.



Nunca utilizar pipetas calibradas para volumes diferentes de 5 µL.

8 Teste Rápido - HIV-1/2 - Bio-Manguinhos

*Fotos meramente ilustrativas.



- Nunca utilizar pipetas pasteur.
- Nunca pingar diretamente do dedo.
- Nunca aplicar o tampão com o frasco inclinado.

COLETA DE AMOSTRA:

O Teste rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostras de soro, plasma ou sangue total humano.

Soro: o soro é obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular à temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

Plasma: coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugue a 2000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

Sangue total: coletar o sangue nos tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Para sangue de punção digital, furar o dedo do paciente com a lanceta fornecida no kit e desprezar a primeira gota.

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

9

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO HIV 1/2 BIO-MANGUINHOS :

1. Certificar-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra esteja refrigerada ou congelada, permitir que o mesmo alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.
2. Retirar o número de componentes do kit TESTE RÁPIDO HIV-1/2 - BIO-MANGUINHOS necessários e colocá-los sobre uma superfície plana.
3. Identificar o suporte do teste com o nome do indivíduo ou seu número de identificação e com o número do lote do kit do qual o teste foi retirado.
4. Verificar a integridade de todos os componentes e a inexistência de linhas na janela do suporte de teste. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, não utilizar o kit. Segregar o kit e entrar em contato com o SAC.
5. Encostar a alça coletora de 5µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou/escorreu da alça para o local do teste quando da adição da amostra ao suporte de teste. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5µL.
- Obs.:** em caso de coleta de sangue por punção digital, utilizar as lancetas (inclusas no kit), de acordo com as instruções de uso que as acompanham.
6. Segurar a alça coletora na posição vertical e encostar-se à área de aplicação da amostra do suporte para liberar 5µL de amostra.
7. Virar o frasco de tampão e manter na vertical (sem inclinar) sobre o poço da amostra. Adicionar o tampão lentamente, gota a gota: não adicionar mais que três gotas (120 µL) devem ser adicionadas ao poço da amostra.
8. Deixar o teste correr por 10 minutos à temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 minutos, não utilizar o kit. Segregar o kit e entrar em contato com o SAC.
9. Ler os resultados do teste 10 minutos após a adição do tampão. Em seguida, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico.