

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

Rafaelle da Silva Motta

**AMPLIAÇÃO E CONFECÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO POSITIVO DE HIV,  
DESTINADO AO CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA O DIAGNÓSTICO  
SOROLÓGICO DO HIV**

Rio de Janeiro

2016

Rafaelle da Silva Motta

**AMPLIAÇÃO E CONFECÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO DE HIV, DESTINADO  
AO CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA O DIAGNÓSTICO  
SOROLÓGICO DO HIV**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutor: Marisa Coelho Adati

Preceptor: Helena C. B. Guedes Borges

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Motta, Rafaelle da Silva

Ampliação e confecção do painel sorológico de HIV, destinado ao controle de qualidade de kits para o diagnóstico sorológico do HIV. / Rafaelle da Silva Motta – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

62 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Preceptor: Helena Cristina Balthazar Guedes Borges.

Tutor: Marisa Coelho Adati

1. HIV. 2. Kit de Reagentes para Diagnóstico. 3. Controle de Qualidade. 4. Vigilância Sanitária. I. Título

Rafaelle da Silva Motta

**AMPLIAÇÃO E CONFECÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO DE HIV, DESTINADO  
AO CONTROLE DE QUALIDADE DE KITS PARA O DIAGNÓSTICO  
SOROLÓGICO DO HIV**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges (Mestre)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Marisa Coelho Adati (Mestre)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter me dado forças, aos meus pais que me deram a vida, amor, educação, apoio e uma base forte para chegar até aqui, a minha irmã por todo apoio moral e emocional e amor incondicional, todos esses anos e todos aqueles que me apoiaram de todas as formas para minha formação...

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado, iluminado, protegido e abençoado todos os dias da minha vida;

Aos meus pais Rosângela e Roberto, que são e sempre serão um exemplo na minha vida, são os melhores pais do universo, me amaram além do que se pode imaginar, se dedicaram, sacrificaram e esforçaram para me ensinar e deram formação e instruções maravilhosas que me guiaram por todo percurso, sem vocês nada disso seria possível;

A minha irmã Rebeca, que é minha melhor amiga, me ama incondicionalmente, me dá carinho, atenção, mesmo me sacaneando a todo tempo, me deu todo apoio para essa minha fase, me atualizou sobre todas as novas tecnologias e músicas lançadas e para ela que eu tento ser melhor a cada dia, para ser um bom exemplo e referencial;  
Ao meu namorado Tarcílio, que me deu apoio, amor, carinho e me compreendeu em todos os momentos, principalmente naqueles em que eu precisei me ausentar para escrever este trabalho, Te amo;

Aos meus tios Elinethe e André que nos últimos meses me acolheram e aturaram em sua casa, dedicaram todo amor e carinho, como se eu fosse sua própria filha, obrigada por tudo;

À toda minha família por tudo que representam em minha vida e por todo esforço e dedicação a mim todos esses anos;

Às minhas “bffs” Karine, Stephanie, Emily, Roberta, Daiana, Carolina, Dayane, Jéssica e Priscila que acompanharam toda a minha trajetória, me incentivaram, ajudaram e compreenderam todas as ausências em saídas de final semana e reencontros nas quais estava me dedicando à conclusão da Residência;

Aos meus amigos Paola, Marlon, Karla, Nathália, Sabrina, Cristiane e Joice, por toda a bagunça organizada por vocês durante os almoços e saídas, todo o ensinamento, alegrias e momentos vividos com vocês, sempre se é feliz quando se tem bons amigos. Eu não seria tão feliz se eu não tivesse você;

Aos meus colegas Álvaro, Helena, Danielle Vigo, Danielle Deslandes, Roberto, Vanderlei, Margaret, Marli, Jorge e Renato, que me deram não só instruções profissionais, como também pessoais, me ensinaram tudo o que sabiam e mais um pouco e fizeram com que eu me sentisse parte de uma equipe extremamente eficiente, com eles aprendi os significados de equipe e companheirismo;

Às meninas da Pós, Gisele e Jéssica por todo suporte e ajuda concedida durante o percurso;

À minha orientadora Helena por todo suporte em minha formação profissional, pessoal e principalmente tecnológica, incentivos e todos os momentos engraçados vividos nestes dois anos;

À minha Tutora Marisa por toda experiência transmitida, paciência, apoio, confiança, suporte em minha formação e principalmente pela oportunidade profissional, obrigada;

Aos professores, coordenadores e equipe da Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos e suporte em tudo que precisei neste período.

*“A educação é a arma mais poderosa que  
temos para mudar o mundo.”*

Nelson Mandela

## RESUMO

O controle de qualidade dos conjuntos para detecção do Vírus da imunodeficiência humana - HIV (antígeno e anticorpos) é de extrema importância, já que são utilizados em Serviços de Hemoterapia e na clínica, com a finalidade de qualificar ou excluir uma possível doação de sangue e obter informações para o diagnóstico de uma doença ou para acompanhamento de um estado clínico, respectivamente. Desta forma, auxiliam na aferição da sensibilidade e especificidade analítica, a fim de assegurar a confiabilidade dos testes para diagnóstico sorológico do HIV, tendo em vista a grande variedade de kits, disponíveis no mercado, evitando a ocorrência de resultados falso-negativos, devido ao risco sanitário ou falso-positivos, por conta do prejuízo social e emocional causado ao doador. Este trabalho buscou caracterizar unidades de plasma para compor um painel de referência positivo para HIV a ser utilizado na avaliação da qualidade dos conjuntos para diagnóstico do HIV-1/2 e, conseqüentemente, aumentar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde – INCQS.

A fim de atender o objetivo proposto analisamos no período de 2001 a 2013, 3828 unidades de plasma provenientes dos Serviços de Hemoterapia localizados nas diferentes regiões do Brasil, destas 130 foram selecionadas, pois foram enviadas exclusivamente como positivas para HIV. Tal amostragem foi analisada para Vírus Linfotrópico para células humanas - HTLV-I/II, Vírus da Hepatite C - HCV, Vírus da Hepatite B - HBV, Doença de Chagas, Sífilis e inicialmente 02 testes para HIV-1/2. As unidades de plasma que obtiveram resultados positivos exclusivamente para anti-HIV-1/2 foram submetidas à qualificação sorológica complementar, empregando ELISAs (Ensaio Imunoenzimático) com composições antigênicas diferentes do anterior, testes rápidos, quimioluminescência e confirmação por *Western Blot* a fim de conferir padronização e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Das 130 unidades de plasma recebidas, apenas 50 apresentaram resultados verdadeiramente positivos, padronizados, lineares e reprodutíveis para presença de antígeno de HIV-1/2 e/ou anticorpos anti-HIV 1/2. Tais amostras irão ampliar o painel sorológico para HIV e conseqüentemente a capacidade analítica do laboratório. Além disto, foi proposta a inserção da identificação por código de barras que permitirá a captação de dados rápida, precisão nas informações e permitir maior controle e redução de erros, logo reduzindo o tempo de análise.

Palavras-Chaves: Painel sorológico. HIV. Vigilância Sanitária.

## ABSTRACT

The quality control of the sets for the detection of Human immunodeficiency virus - HIV (antigen and antibodies) is of extreme importance, since they are used in Services of hemotherapy and clinic, with the purpose of qualifying or exclude a possible blood donation and obtain information for the diagnosis of a disease or for monitoring a clinical state, respectively. In this way, assist in benchmarking of analytical sensitivity and specificity, in order to ensure the reliability of the tests for serological diagnosis of HIV, in view of the great variety of kits available in the market, preventing the occurrence of false-negative results due to the health risk or false-positive, on account of the injury caused to the social and emotional donor. This work aimed to characterize the plasma units to compose a reference panel for HIV to be used in the evaluation of the quality of the sets for the diagnosis of HIV-1/2 and consequently increase the analytical capacity of the Laboratory of blood and blood products of the National Institute for Quality Control in Health - INCQS.

In order to meet the proposed objective we analyzed in the period 2001 to 2013, code 3828 units of plasma units of plasma from departments of hemotherapy located in different regions of Brazil, of these 130 were selected because they were sent exclusively as positive for HIV. Such sampling was analyzed for lymphotropic virus for human cells - HTLV-I/II, Hepatitis C virus - HCV, Hepatitis B virus - HBV, Chagas disease, Syphilis and initially 02 tests for HIV-1/2. The units of plasma which achieved positive results exclusively for anti-HIV-1/2 were submitted to complementary serologic qualification, employing ELISAs (immunoassays will) with antigenic compositions of the different anterior, rapid tests, chemoluminescence and confirmation by Western Blot in order to confer standardization and reproducibility of the results obtained. Of the 130 units of plasma received, only 50 presented really positive results, standardized, linear and reproducible for presence of antigen of HIV-1/2 and/or anti-HIV antibody 1/2, such samples will enlarge the pane serological tests for HIV and consequently the analytical capacity of the laboratory. In addition, has been proposed on the samples the insertion of identification by bar code that will allow the capture of data fast, precision in information and allowed greater control and reduction of errors, soon will reduce analysis time.

Key-Words: Serological Panel. HIV. Health surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutural Viral – HIV.....	18
Figura 2	- Marcadores da Infecção por HIV de acordo com a evolução em semanas.....	22
Figura 3	- Testes Imunoenzimático – ELISA .....	23
Figura 4	- Teste Imunocromatográfico – Teste Rápido.....	24
Figura 5	- Western Blot.....	26
Figura 6	- Obtenção das unidades de plasma.....	30
Figura 7	- Modelo de Cadastro das Unidades de Plasma no Caderno de cadastro.....	31
Figura 8	- Esquema de Fracionamento do Plasma em Estoques.....	33
Figura 9	- Esquema para Caracterização de Unidades de Plasma.....	35
Figura 10	- Estrutura do Lote das amostras.....	53
Figura 11	- Modelo do Código de Barras.....	54
Quadro 1	- Principais Componentes Virais do HIV.....	19
Quadro 2	- Recipiente, Volume e Quantidade das Unidades de Plasma.....	32
Quadro 3	- Conjunto de diagnósticos empregados na confirmação e caracterização sorológica das amostras.....	37
Quadro 4	- Interpretação das tiras de <i>Western Blot</i> conforme fabricante.....	40
Gráfico 1	- Quantidade de Bolsas Recebidas.....	41
Gráfico 2	- Origem das unidades de plasmas.....	42
Gráfico 3	- Seleção das amostras.....	42
Gráfico 4	- Resultados dos Elisa para detecção de Anticorpos.....	43
Gráfico 5	- Resultados dos Elisa para detecção de Antígenos.....	44
Gráfico 6	- Resultados dos Elisa para detecção de Antígenos e Anticorpos..	45
Gráfico 7	- Distribuição dos <i>Rácios</i> das amostras Reagentes para HIV .....	46
Gráfico 8	- Resultados dos Testes Rápidos para detecção de Anticorpos.....	47
Gráfico 9	- Resultados dos Testes Rápidos para detecção de Antígenos e Anticorpos.....	47
Gráfico 10	- Resultados das Quimioluminescências para detecção de Anticorpos.....	48

Gráfico 11	- Resultados das Quimioluminescências para detecção de Antígenos.....	49
Gráfico 12	- Resultados das Quimioluminescências para detecção de Antígenos e Anticorpos.....	50
Gráfico 13	- Resultados encontrados nos testes de <i>Western Blot</i> .....	51
Gráfico 14	- Distribuição e frequência das bandas da técnica de <i>Western Blot</i> .....	52

## LISTA DE SIGLAS

Ac	- Anticorpo
Ag	- Antígeno
AIDS	- <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CID	- Classificação Internacional de Doenças
D.O.	- Densidade ótica
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EIA	- Ensaio Imunoenzimático
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático ligado a fase sólida
EUA	- Estados Unidos da América
HBc	- Antígeno do core do Vírus da Hepatite B
HBsAg	- Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
HBV	- Vírus da Hepatite B
HCV	- Vírus da Hepatite C
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	- Vírus Linfotrópico de células T humanas
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LSH	- Laboratório de Sangue e Hemoderivados
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
POP	- Procedimento Operacional Padrão
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA
RF	- Forma Recombinante
RLU	- Unidade Relativa de Luz
RNA	- Ácido Ribonucleico
RT-PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa
SIDA	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SINAN	- Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação
TR	- Teste Rápido
URF	- Forma recombinante Única
WB	- <i>Western Blot</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	- <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	- EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	16
1.2	- O VÍRUS.....	17
1.3	- FORMAS DE TRANSMISSÃO.....	20
1.4	- INFECÇÃO PELO VÍRUS.....	20
1.5	- DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E EVOLUÇÃO DOS TESTES..	21
1.8	- PAINEL SOROLÓGICO.....	26
<b>2</b>	- <b>OBJETIVOS GERAL</b> .....	<b>28</b>
2.1	- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3</b>	- <b>METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
3.1	- OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	29
3.2	- RECEBIMENTO, CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA.....	31
3.3	- PROCESSAMENTO DAS UNIDADES DE PLASMA.....	32
3.4	- CARACTERIZAÇÃO E CONFIRMAÇÃO SOROLÓGICA.....	34
3.5	- METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DO HIV.....	38
3.5.1	- Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	38
3.5.2	- Quimioluminescência.....	38
3.5.3	- Testes Imunocromatográficos (Testes Rápidos).....	39
3.5.4	- <i>Western Blot</i> .....	39
3.6	- CÓDIGO DE BARRAS.....	39
<b>4</b>	- <b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1	- DA QUANTIDADE DE BOLSAS RECEBIDAS.....	41
4.2.	- DA ORIGEM DAS BOLSAS.....	41
4.3	- DA SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O VOLUME.....	42
4.4	- RESULTADOS OBTIDOS – METODOLOGIA ELISA.....	43
4.4.1	- ELISA – Detecção de anticorpos do HIV.....	43
4.4.2	- ELISA – Detecção de antígenos do HIV.....	44
4.4.3	- ELISA – Detecção de antígenos e anticorpos do HIV.....	44
4.4.4	- Quanto ao <i>racio</i> dos resultados obtidos.....	45

4.5	-	TESTE IMUNOTOMATOGRÁFICO – TESTE RÁPIDO.....	46
4.5.1	-	Teste Rápido- Detecção de anticorpos.....	47
4.5.2	-	Teste Rápido- Detecção de antígeno e anticorpos.....	47
4.6	-	ENSAIO QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	48
4.6.1	-	Ensaio Quimioluminescência- Detecção de anticorpos.....	48
4.6.2	-	Ensaio Quimioluminescência- Detecção de antígeno.....	49
4.6.3	-	Ensaio Quimioluminescência- Detecção de antígeno e anticorpos.....	49
4.7	-	<i>WESTERN BLOT</i> .....	50
4.7.1	-	<i>Western Blot</i> - presença das bandas ENV, GAG e POL.....	51
4.8.	-	QUANTITATIVO DE AMOSTRAS VERDADEIRO POSITIVAS PARA HIV.....	52
4.9	-	CODIFICAÇÃO E INSERÇÃO DO NOVO LOTE.....	53
4.10	-	CÓDIGO DE BARRAS.....	53
<b>5</b>	-	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1	-	DA QUANTIDADE DE UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS.	54
5.2	-	DA ORIGEM DAS UNIDADES DE PLASMA.....	54
5.3	-	DA SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O VOLUME.....	54
5.4	-	DOS RESULTADOS OBTIDOS- METODOLOGIA: ELISA.....	55
5.5	-	TESTE IMUNOTOMATOGRÁFICO – TESTE RÁPIDO.....	55
5.6	-	ENSAIO QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	56
5.7	-	<i>WESTERN BLOT</i> .....	56
5.8	-	QUANTITATIVO DE AMOSTRAS VERDADEIRO POSITIVAS PARA HIV.....	57
<b>6</b>	-	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>7</b>	-	<b>PERSPECTIVA</b> .....	59
		<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Na década de 1980 ocorreu a primeira descrição do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), tendo a descoberta ocorrida após já ser conhecida a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e após relatos de cinco casos de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (atualmente *P. jiroveci*) em hospitais de Los Angeles, acometendo pacientes homossexuais e do sexo masculino. Nos meses seguintes o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) relatou novos casos de pneumonia pelo mesmo agente em outras cidades dos Estados Unidos da América (EUA). Devido a isto observou-se um aumento de ocorrência de sarcoma de Kaposi, doença até então rara no país. Na mesma época foram registrados casos semelhantes entre imigrantes africanos e indivíduos homossexuais do sexo masculino. Devido a estes casos, profissionais da época supunham que a transmissão se dava provavelmente por relação sexual entre homens (SANTOS *et al*, 2015).

Alguns estudos demonstraram grande semelhança com o Vírus Linfotrófico de células T humanas (HTLV), sendo caracterizado como HTLV III, no entanto em 1983, foi identificada a atividade da enzima transcriptase reversa em pacientes com linfadenopatia generalizada e outros sintomas que caracterizavam quadro de AIDS. Com isto, em 1985, caracterizaram esse novo retrovírus e determinaram ser diferente do HTLV. Somente em 1986, foi caracterizado como HIV (SANTOS *et al*, 2015).

Desde sua introdução em 1985, os testes de triagem e confirmatórios empregados no diagnóstico sorológico do HIV estão em constante evolução tecnológica. A busca por testes mais sensíveis e específicos levou ao desenvolvimento de ensaios de diferentes gerações, classificados de acordo com o antígeno empregado (ALDOVINI E WALKER, 1990).

As avaliações laboratoriais devem persistir seu foco nas características funcionais, que inclui a facilidade de utilização e as características de desempenho (sensibilidade e especificidade diagnóstica e os aspectos analíticos, compreendendo as variações de lote para lote). O ensaio deve utilizar painel sorológico contendo amostras de diferentes regiões geográficas, bem caracterizadas, além de painéis de soro conversão, painéis de títulos variados (mistos e/ou baixos), originárias de fontes comerciais (WHO, 2015).

Para identificar, diagnosticar e monitorar a infecção durante o tratamento, vários métodos para diagnóstico foram e ainda estão sendo desenvolvidos. Sensibilidade clínica ou diagnóstica é reconhecida pela avaliação da incidência de resultados verdadeiramente positivos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos conhecidamente portadores de uma determinada doença e a especificidade clínica ou diagnóstica é a incidência de resultados verdadeiramente negativos obtidos quando o teste é aplicado em indivíduos não reagentes para a doença em questão (BRASIL, 2006).

Os produtos que utilizam amostras humanas para obter informações para o diagnóstico de uma doença ou para acompanhamento de um estado clínico são denominados “produtos para diagnóstico de uso *in vitro*”, no Brasil. Estes produtos englobam: reagentes, padrões, calibradores, controles, materiais, artigos e instrumentos, em edição as instruções para uso que contribuem para realizar uma determinação de qualquer natureza de uma amostra humana e que não estejam destinados a cumprir alguma função anatômica, física ou terapêutica, que não sejam ingeridos, injetados ou inoculados em seres humanos e que são utilizados unicamente para prover informação sobre amostras obtidas do organismo humano (BRASIL, 2015).

Em 1976, foi regulamentada a Lei nº 6.360 de 23/09/1976, atualmente sancionada pelo Decreto nº 8.077/13 que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os saneantes, cosméticos, medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos e outros produtos (BRASIL, 1976). De acordo com seu artigo 12, “Nenhum dos produtos de que trata esta Lei, inclusive os importados, poderá ser industrializado, exposto à venda ou entregue ao consumo antes de registrado no Ministério da Saúde”. Desta forma, o registro de um produto é o ato privativo do Ministério da Saúde destinado a comprovar o direito de fabricação ou importação de produtos submetidos à Vigilância Sanitária (BRASIL, 1976).

O núcleo central das ações institucionais de saúde é composto pela Vigilância Sanitária em conjunto com a assistência à saúde e a vigilância epidemiológica. Enquanto as duas tratam do acompanhamento do estado de saúde da população e do atendimento às suas necessidades, a Vigilância Sanitária procura normatizar, regulamentar, controlar e fiscalizar processos, produtos e insumos que, potencialmente, ocasionam danos à saúde humana. (MELLO, 1993). Além disso, cabe

ressaltar o monitoramento de produtos pós-mercado, utilizado como método que a Vigilância Sanitária dispõe para acompanhamento, avaliação e controle de produtos sob sua jurisdição (SAID, 2004 apud ROUQUAYROL, 2003, p.2).

Segundo a Resolução RDC nº 36/15 e ratificando o inciso IV, art. 16 da Lei nº 6.360/76, produtos para diagnósticos de uso *in vitro* classificados como alto risco, ou seja, Classe III e IV devem ser enviados para análise a uma unidade da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Ainda segundo esta Resolução, atualmente, os produtos indicados para tal análise são produtos que pertencem às Classes III e IV destinados a testes de triagem em serviços de hemoterapia, tais como: reagentes para imunohematologia (sistema ABO, sistema Rh e anticorpos irregulares), HTLV, Hepatites B e C, HIV, Sífilis, Chagas e, mais recentemente, Dengue.

Neste contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) vem analisando sistematicamente os conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* da Classe IV (reagentes, controles e calibradores que apresentam alto risco ao usuário, ao paciente e/ou à saúde pública) em cumprimento a legislação vigente (BRASIL, 2015), através de análise prévia, fiscal e de controle, em atendimento a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS (ANVISA) (BRASIL, 1976).

A ampliação do painel constituído no presente trabalho terá por finalidade avaliar a sensibilidade e especificidade clínica dos conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* empregados na triagem e confirmação sorológica do HIV.

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Segundo o Ministério da Saúde (2015), desde o surgimento do primeiro caso de AIDS até junho de 2015, no Brasil foram registrados aproximadamente 798.366 casos da doença. Sendo as regiões Sul e Centro-Oeste as com mais casos notificados no SINAN (Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação). No entanto, a distribuição proporcional dos casos revela que a maioria em torno de, 53,8% e 20%, do total de casos identificados de 1980 a 2015, estão concentrados nas regiões Sudeste e Sul, respectivamente.

Nos últimos cinco anos, o país registrou cerca de 40 mil novos casos da doença e com uma estabilização de 20,5 novos casos para cada 100 mil habitantes. Todas as regiões apresentaram um crescimento significativo, com exceção da região Sudeste que é a única que apresenta queda nos últimos anos, chegando a 18,6 novos casos a cada 100 mil habitantes, o que corresponde a 26,5% de queda (BRASIL, 2015).

Até o ano de 2008, em relação ao sexo, relatou-se ocorrência de 15 casos em homens para cada 10 casos em mulheres. Entretanto, desde 2009 é possível notar uma redução de casos em mulheres e aumento de casos em homens, passando a ser de 19 casos de AIDS em homens para cada 10 casos em mulheres no ano de 2014. Vale ressaltar que esta razão varia entre as diferentes regiões e faixa etária (BRASIL, 2015).

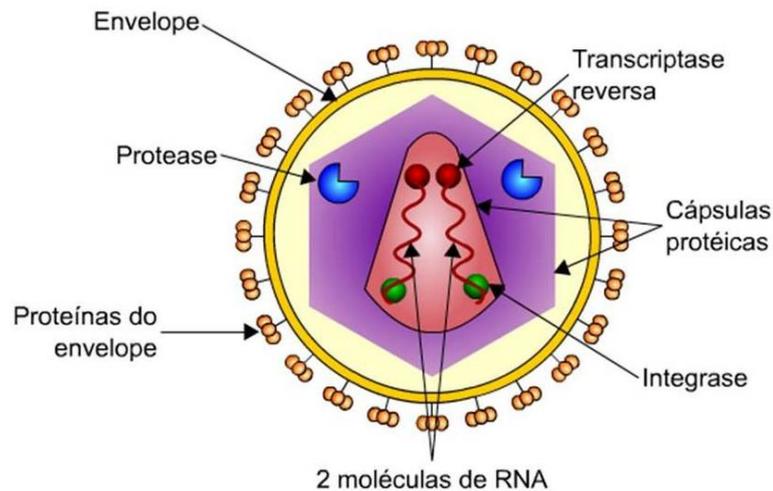
Desde o início da epidemia da AIDS até dezembro de 2014 foram identificados um total de 290.929 óbitos representado pelo CID10:B20 a B24 (SIDA), sendo a maioria da região sudeste, seguida da Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte (BRASIL, 2015).

Ao analisar o índice de mortalidade é possível observar uma queda de 5% nos últimos dez anos, no contexto nacional. Esta queda, no entanto, é notada nas regiões Sudeste e Sul, sendo de mais de 10% em ambas as regiões. Nas demais regiões há tendência de crescimento no mesmo período, com exceção da região Centro-Oeste que manteve o coeficiente (BRASIL, 2015).

## 1.2 O VÍRUS

O Vírus da Imunodeficiência Humana é pertencente ao gênero *Lentivirinae* e da família *Retroviridae*. Apresenta em seu núcleo duas cópias de Ácido Ribonucleíco (RNA) de cadeia simples, encapsuladas por uma camada proteica ou núcleo-capsídeo, capsídeo e um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica, conforme demonstrado na FIGURA 1 (BRASIL, 2013).

Figura 1 – Estrutura Viral do HIV.



Fonte: <http://brainly.com.br/tarefa/198753>.

O genoma viral, possui três genes estruturais (*gag*, *env*, *pol*) e seis regulatórios (*vif*, *vpr*, *tat*, *ver*, *vpu*, *nef*) (DEWHURST, 1999). Segundo Connor, 1992, o gene *gag* codifica uma poliproteína que ao sofrer clivagem origina as proteínas da matriz, do capsídeo e do núcleo capsídeo viral. O gene *pol* codifica uma poliproteína *gag-pol* que origina as enzimas virais protease, transcriptase reversa e integrase, sendo essas essenciais para o ciclo reprodutivo deste vírus. O gene *env* origina poliproteínas que sintetizam glicoproteínas de transmembrana e superfície, gp41 e gp120 respectivamente, conforme QUADRO 1. Os principais componentes virais com utilidade diagnóstica incluem as proteínas do envelope (*env*), as proteínas codificadas pelos genes *gag* e *pol* (BRASIL, 2013).

Quadro 1: Principais componentes virais do HIV.

Gene	Produto
Gag	p55 (precursor) <ul style="list-style-type: none"> <li>p6</li> <li>p9</li> <li>p17</li> <li>p24</li> </ul>
Pol	p66 p51 p31 p10
Env	gp160 (precursor) <ul style="list-style-type: none"> <li>gp120</li> <li>gp41</li> </ul>
vif vpr vpu nef	Genes Regulatórios.

Fonte: Elaborado pela autora.

A classificação do HIV atual é hierárquica e consiste em tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes. O tipo HIV-1 é mais patogênico e prevalente, enquanto que o HIV-2 é endêmico na África (LAZZAROTTO, 2010). O HIV-1 é subdividido em 4 grupos: grupo M (do inglês, majoritário), grupo N (do inglês, *new*), grupo O (do inglês, *outlier*) o mais divergente dentre os grupos, é o grupo P. A maioria das infecções ocorre com HIV-1 do grupo M, o qual é diferenciado em subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), que podem ainda assim ser subdivididos. Isso ocorre, pois quando um indivíduo é portador de uma infecção mista, por dois ou mais subtipos diferentes, pode ocorrer a transferência de material genético e dar origem a novos subtipos ou formas recombinantes (RF, do inglês *recombinant forms*). Quando a forma recombinante é documentada em mais de três indivíduos é denominada como CRF (forma recombinante circulante, do inglês, *circulating recombinant form*). Caso não sejam relatadas em novos indivíduos são definidas como URF (forma recombinante única ou, do inglês, *unique recombinant form*). Estas variações genéticas do HIV têm implicação na sua transmissão, na biologia viral, na reatividade e na reação cruzada em testes diagnósticos para identificação de antígenos e anticorpos (BRASIL, 2013).

### 1.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO

A capacidade de infecção do HIV depende de fatores que são relacionados com suas características biológicas e também comportamentais. Dentre eles ressaltam-se: concentração no fluido biológico; integridade e vulnerabilidade da mucosa; tempo de exposição ao vírus e pré-disposições genéticas, no caso de fatores biológicos. Já os fatores comportamentais englobam indivíduos com múltiplos parceiros, a não utilização de preservativo e compartilhamento de pérfuro-cortantes e/ou seringas contaminados (SANTOS *et al*, 2015).

Segundo LOPES (2006), a transmissão do vírus HIV pode ocorrer por via sexual, com maior frequência, por contaminação sanguínea (através de transfusão ou compartilhamento de pérfuro-cortantes), por “transmissão vertical” (da gestante para o bebê) e acidentes de trabalho (ocasionada por eventuais acidentes de trabalho de profissionais da área da saúde com perfuro cortante).

### 1.4 INFECÇÃO PELO VÍRUS

A Infecção pelo HIV pode ser caracterizada por 3 fases: fase aguda ou primária, fase persistente ou crônica e AIDS (RIBEIRO; BORGES, 2006).

A fase aguda ocorre nas primeiras semanas de infecção, onde há intensa replicação viral (alta carga viral plasmática), associada a uma queda significativa de linfócito TCD4+ circulantes, tendo em vista que a resposta imunológica inata que encaminha uma quantidade adicional de células T suscetíveis ao foco da infecção. A partir dessa pequena população de células infectadas, o vírus é disseminado inicialmente para os linfonodos locais e depois sistemicamente e em número suficiente para estabelecer e manter a produção de vírus nos tecidos linfoides (NEUBERT, 2010).

Nesta fase o indivíduo pode ou não apresentar sintomas clínicos. Em alguns indivíduos é possível observar um conjunto de sintomas definidos como síndrome retroviral aguda, aproximadamente entre duas e quatro semanas. Esta fase pode ocorrer uma fase denominada janela imunológica ou região sombreada, caracterizada

pelo intervalo de tempo entre a infecção pelo vírus e a produção de anticorpos anti-HIV.(RIBEIRO, 2006).

A partir deste mesmo período de 2 a 4 semanas de infecção já é possível detectar anticorpos devido à elevada carga viral plasmática e em fluidos corporais. Esta etapa da infecção é mediada por células TCD8+ que inibem a infecção diminuindo drasticamente a quantidade de vírus circulante e uma restauração parcial dos níveis de TCD4+ (CANTEJÓN *et al*, 2009).

A fase persistente crônica é caracterizada pela manutenção dos níveis de linfócitos TCD4+ e por uma concentração baixa, muitas vezes indetectável, de HIV plasmático, nesta fase o indivíduo apresenta-se clinicamente \*\*\* (CANTEJÓN *et al*, 2009).

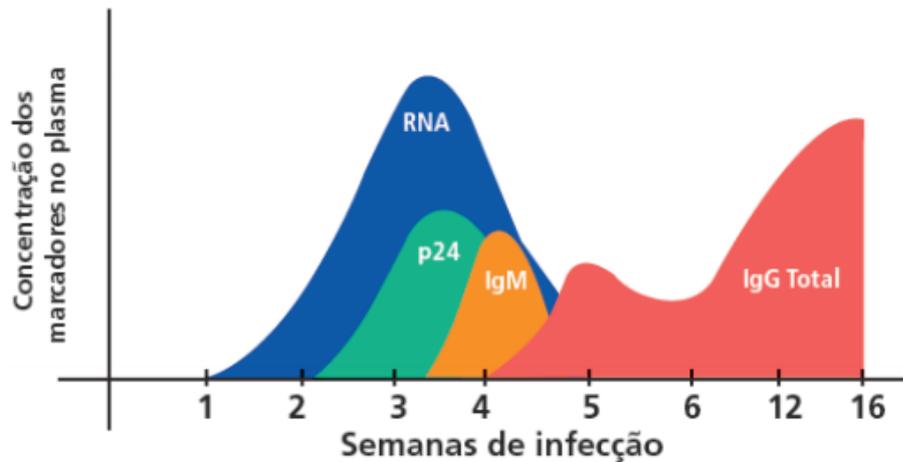
Com a progressão da infecção e, conseqüentemente, da disfunção imunológica o indivíduo entra na etapa reconhecida como AIDS. Caracterizada por redução significativa de células TCD4+, altos níveis virais e aparecimento de manifestações clínicas características e infecções oportunistas. O tempo de progressão para esta fase pode variar de 8 a 10 anos, podendo em alguns indivíduos progredir em menos de três anos (progressores rápidos) ou não (não progressores) (SANTOS *et al*, 2015).

## 1.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E EVOLUÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS

Após a identificação do HIV, em 1985, foi introduzido o primeiro teste para diagnóstico da AIDS baseado na detecção de anticorpos específicos (SANTOS *et al*, 2015).

Segundo LAJOLO *et al* (2008), durante a infecção pelo HIV, o diagnóstico do vírus pode ocorrer por meio da detecção direta de componentes do vírus (antígeno p24, RNA ou DNA pró-viral). A detecção do antígeno p24 do HIV-1 ou de RNA é essencial quando a detecção de anticorpos não é possível, conforme mostra a FIGURA 2.

Figura 2: Marcadores da infecção por HIV de acordo com a evolução em semanas.



Fonte: Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV, Brasil, 2013.

A detecção de RNA viral pode ser realizada por diferentes técnicas, a maior parte delas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos, um exemplo é a amplificação com iniciadores específicos após transcrição reversa (RT-PCR) acoplada à detecção colorimétrica por meio de sonda específica e reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real. No entanto, nenhum deles é utilizado para diagnóstico da infecção, sendo somente utilizado para acompanhamento da carga viral e triagem sorológica (Qualitativo). Estes testes podem detectar a presença da infecção viral nas primeiras duas semanas após exposição e são utilizados na triagem de doadores (LAJOLO *et al*, 2008).

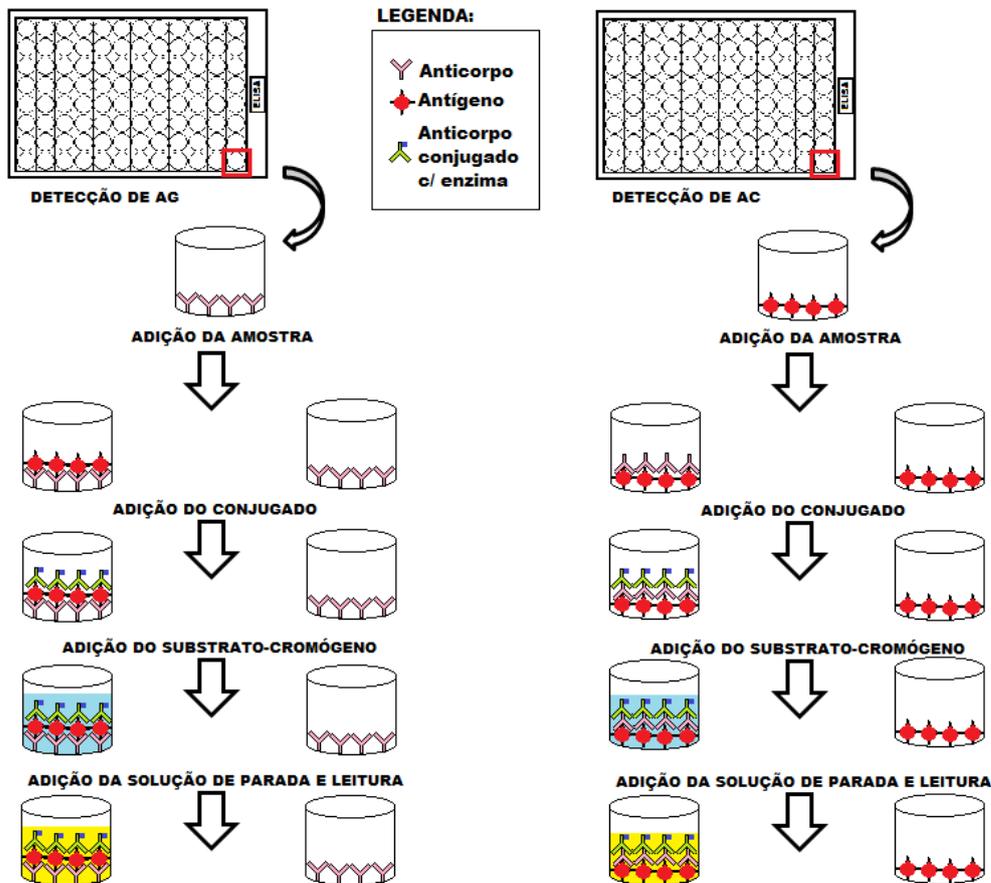
Os testes de EIA ou ELISA – Ensaio Imunoenzimático são utilizados para identificação de antígenos ou anticorpos. O sistema envolve anticorpos conjugados a enzimas. O resultado do teste é determinado por observação (avaliação qualitativa) e medida por espectrofotometria a mudança de cor, produzida pela reação entre enzima e substrato (BRASIL, 2013)

Nos EIA de 1ª e 2ª gerações as amostras são incubadas em presença de um lisado viral e proteína viral recombinante, respectivamente. Nos testes de 3ª geração as amostras são incubadas na presença de uma proteína viral recombinante ou peptídeo sintético e a presença de anticorpos anti-HIV pode ser detectada mais precocemente do que os de gerações anteriores. Além disto, a partir desta geração foi possível detectar não só anticorpos do HIV-1 grupo M como também os de HIV-1 grupo O e do HIV-2. Nos testes de 4ª geração (“combinados”) detecta-se o antígeno p24 e anticorpos específicos anti-HIV no mesmo teste, assim, além dos peptídeos e/ou proteínas recombinantes, há também anticorpo anti-p24 na fase sólida. Logo, a

detecção de anticorpos na amostra ocorre conforme os testes de 3ª geração, o que os difere é que o teste de 4ª geração também identifica o antígeno p24, assim esses testes permitem que o diagnóstico por HIV seja realizado ainda mais precocemente, pois permite a detecção do antígeno antes da produção de anticorpos específicos (BRASIL, 2013).

Resumidamente o teste de ELISA envolve um componente (antígeno ou anticorpo) ligado a um suporte sólido (Ex: micro cavidade de placa de poliestireno) que interage com anticorpo ou antígeno presente na amostra formando um imunocomplexo. Após incubação há lavagens para remoção do material não ligado, e então é adicionado o conjugado (anticorpo-enzima ou anti-anticorpo-enzima). Após interação há novamente um ciclo de lavagens para retirada do material excedente e adição do substrato específico da enzima associado ao cromógeno. A enzima irá reduzir o substrato e o produto da degradação oxida o cromógeno, resultando em uma reação colorida. Há a adição de uma solução de interrupção, que provoca alteração da coloração (FIGURA 3). Finalmente, o resultado é lido por medida de absorbância, utilizando espectrofotômetro (SANTOS *et al*, 2015).

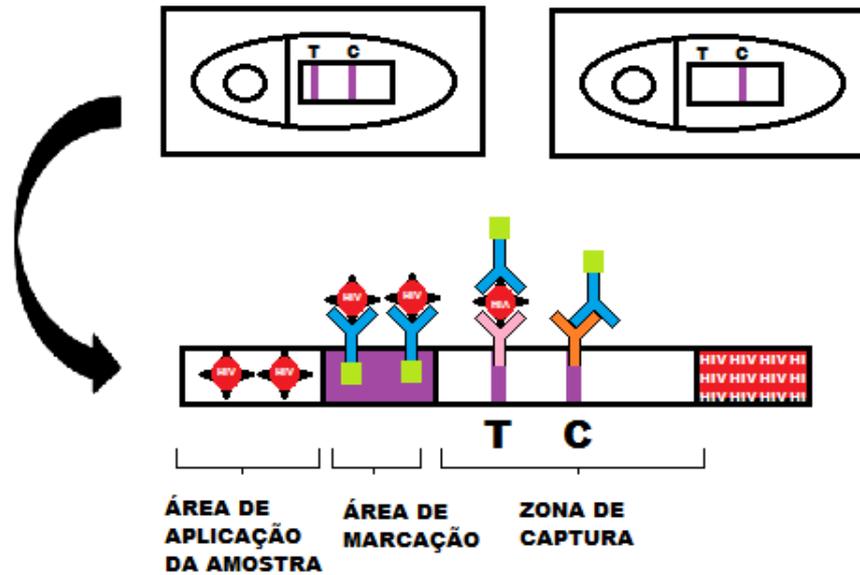
Figura 3: Teste Imunoenzimático – ELISA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Há também testes imunocromatográficos ou testes rápidos, que também detectam antígenos e/ou anticorpos. Este teste não requer o uso de instrumentos e disponibiliza o resultado em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 5 a 30 minutos. Assim, anticorpos ou antígenos conjugados a um detector (exemplo ouro coloidal) são imobilizados em uma fita de nitrocelulose ou látex, assim a amostra de soro ou plasma é inoculada e migra por capilaridade por toda a fita, ocorrendo a ligação dos epítomos e reação com o conjugado formando um imunocomplexo (Figura 4). Em geral, a sensibilidade deste teste é baixa comparada a de outras metodologias. No entanto, com o avanço das metodologias, os testes rápidos de última geração tem apresentado sensibilidade melhor quando comparado aos de primeira geração (BRASIL, 2015).

Figura 4: Testes Imunocromatográficos – Testes Rápidos

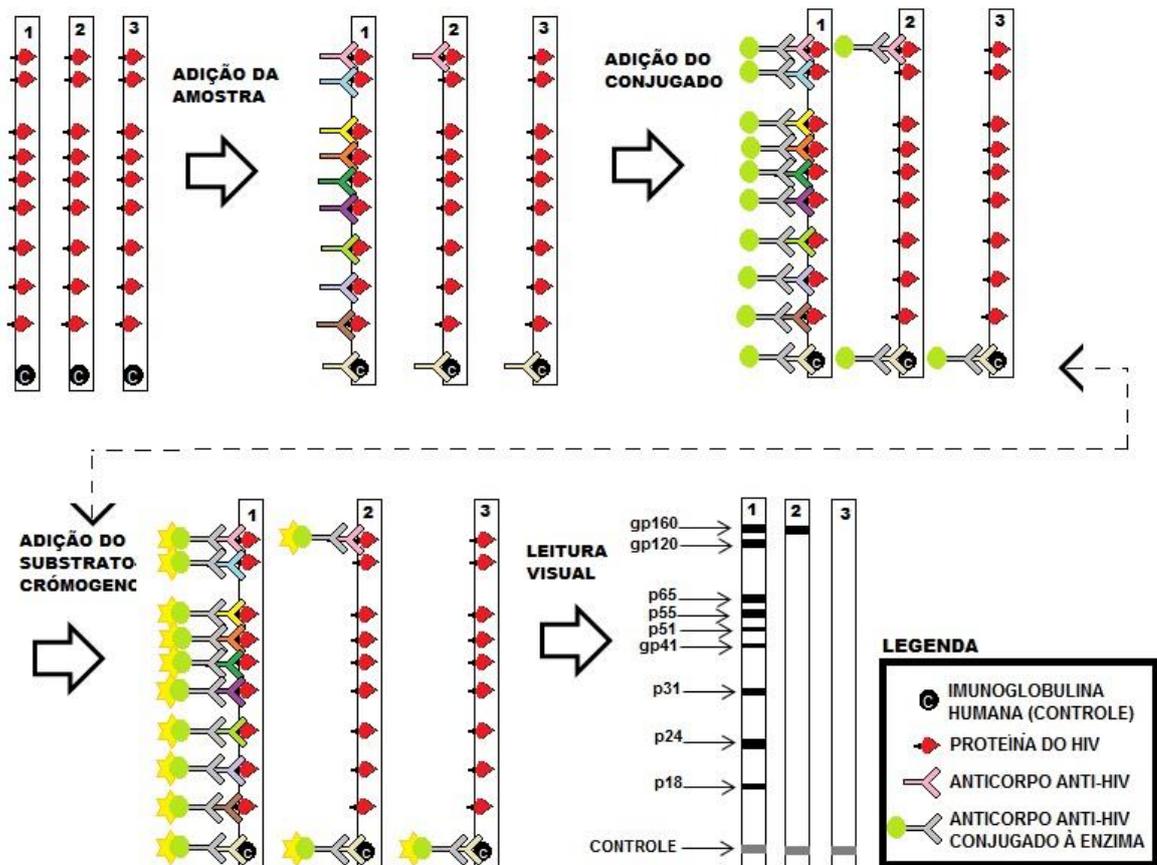


Fonte: Elaborada pela autora.

Há também a quimioluminescência que consiste em um subtipo de luminescência em que a energia de excitação do elétron produz radiação luminosa através de uma reação química, ou seja, a produção de luz ocorre devido a quebra de ligações ricas em energia já existentes na moléculas presente na reação. (LEITE et al., 2004)

O *Western Blot* é um imunoenensaio em suporte sólido (tiras de nitrocelulose) que contém proteínas virais imobilizadas para detectar anticorpos dirigidos a estas proteínas específicas. É um teste pra confirmação, ou seja, tem a finalidade de medir um resultado obtido em outro teste. Assim, essas tiras de nitrocelulose são incubadas com amostras de soro ou plasma. Os anticorpos presentes na amostra se ligam especificamente às proteínas das tiras e esses anticorpos anti-HIV específicos ligados às proteínas são detectados por anticorpos secundários, conjugados com uma enzima, seguido por um substrato que gera uma banda colorida (SANTOS et al/2015).

A principal vantagem deste teste é possibilitar a visualização da resposta de anticorpo aos antígenos em separado. É considerado como padrão ouro, pois é altamente sensível e específico, sendo a sua desvantagem seu alto custo (FIGURA 5). (BRASIL, 2013)

Figura 5: *Western Blot*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Desde o início da epidemia do HIV, o diagnóstico sorológico da infecção é realizado utilizando-se pelo menos dois testes, um para triagem e um segundo, mais específico, para confirmar o resultado da triagem. A combinação mais utilizada era um imunoenzimático de triagem seguido pelo *Western Blot* (WB), como teste confirmatório (BRASIL, 2013).

## 1.6 PAINEL SOROLÓGICO PARA HIV

Segundo a definição do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos- BIODIVERSIDADE/FIOCRUZ, entende-se por Painéis Sorológicos um conjunto de amostras produzidas a partir de plasma humano processado que se destinam ao controle de qualidade dos kits para diagnóstico em sorologia. Sabe-se que as

amostras contêm determinantes antigênicos de um determinado marcador (Painel Sorológico Positivo) ou não (Painel Sorológico Negativo) (INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBOLÓGICOS, 2014). Podem ser feitos “*in house*” ou adquiridos comercialmente.

As amostras que compõem um Painel comercial são sequencialmente numeradas e codificadas. Logo, para a identificação de cada amostra é necessário conferir seus registros de caracterização e classificação como: verdadeiro positivas ou verdadeiro negativas de acordo com o descrito em documento que acompanha o mesmo (chave do painel), contendo resultado e caracterização das amostras por diversos testes. Para os painéis utilizados em avaliações externas da qualidade, essas informações só são devidamente fornecidas pelo próprio fabricante.

Logo, estes painéis são imprescindíveis, pois auxiliam na aferição da sensibilidade analítica, a fim de assegurar a segurança e confiabilidade dos testes para diagnóstico sorológico do HIV, tendo em vista que atualmente, observa-se que a cada ano o mercado disponibiliza uma grande variedade de kits, a fim de atender a demanda de testes cada vez mais sensíveis (RIBEIRO; BORGES, 2006).

O monitoramento contínuo dos conjuntos para diagnóstico de uso laboratorial para a detecção de anti-HIV, encontra-se regulamentado por força de legislação sanitária, RDC nº 36/15, tornando obrigatória a avaliação da sua qualidade antes do mesmo ser disponibilizado no mercado (Brasil, 2015).

Tendo isto em vista, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados - LSH do INCQS, em atendimento à demanda da ANVISA, analisa sistematicamente conjuntos de diagnóstico de classe IV através de análise prévia, fiscal e de controle, quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade diagnóstica, empregando os painéis sorológicos específicos.

## 2 OBJETIVO GERAL

Ampliar o Painel Sorológico Positivo para HIV e contribuir para a melhoria do diagnóstico da infecção pelo HIV, assim como para a triagem sorológica, por meio de controle de qualidade dos kits destinados ao diagnóstico sorológico do HIV, largamente utilizados em laboratórios de Análises Clínicas e Serviços de Hemoterapia.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1. Identificar as amostras – Unidade de Plasma - recebidas de diferentes regiões do país como Reagentes para HIV;
- 2.1.2. Caracterizar unidades de plasma para compor painel a ser empregado na avaliação de conjuntos diagnósticos utilizados na triagem e no diagnóstico laboratorial do HIV;
- 2.1.3. Analisar criticamente os resultados dos testes para HIV realizados, utilizando as seguintes metodologias: ELISA, Teste Rápido, Quimioluminescência, Western Blot.
- 2.1.4. Estratificar e quantificar as amostras Verdadeiro Positivas para HIV;
- 2.1.5. Inserir identificação por código de barras em cada amostra Verdadeiro Positiva identificada;
- 2.1.6. Compor um novo lote do Painel Sorológico Positivo para HIV.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram recebidas no período de 2001 até 2013 unidades de plasmas provenientes de Serviços de Hemoterapia de diferentes regiões do país.

Os Serviços de Hemoterapia foram contatados por meio de solicitação formal, para envio de unidades de plasma que após realização dos testes de triagem sorológica foram consideradas Reagentes para algum marcador sorológico. Vale salientar que de acordo com a Resolução RDC nº 34/2014 e a Portaria nº 2712/2013 a cada doação devem ser realizados obrigatoriamente testes laboratoriais de triagem de alta sensibilidade, para detecção de marcadores para as seguintes doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue, independentemente dos resultados de doações anteriores, segundo critérios determinados nesta Resolução e nas demais normas do Ministério da Saúde:

I - Sífilis: 1 (um) teste para detecção de anticorpo antitreponêmico ou não-treponêmico;

II - Doença de Chagas: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti - T. Cruzi;

III - Hepatite B (HBV): 1 (um) teste para detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e 1 (um) teste para detecção de anticorpo contra o capsídeo do vírus da hepatite B (anti-HBc), com pesquisa de IgG ou IgG + IgM;

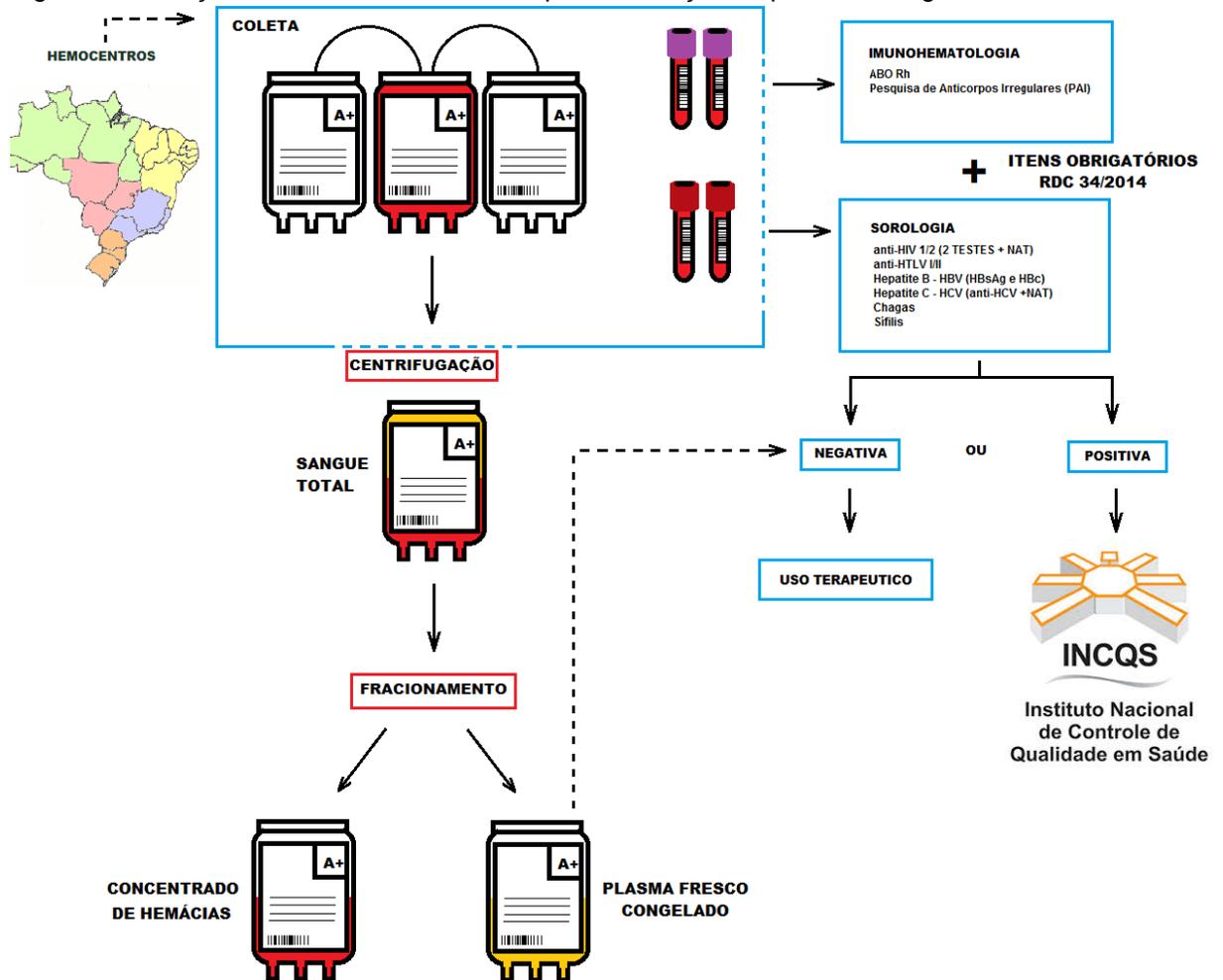
IV - Hepatite C: 2 (dois) testes em paralelo: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti - HCV ou para detecção combinada de antígeno/anticorpo; e 1(um) teste para detecção de ácido nucléico do HCV por técnica de biologia molecular;

V - HIV 1 e 2: 2 (dois) testes em paralelo: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti - HIV (que inclua a detecção do grupo O) ou 1(um) teste para detecção combinada de antígeno/anticorpo (que inclua a detecção do grupo O); e 1(um) teste para detecção de ácido nucléico do HIV por técnica de biologia molecular; e

VI - HTLV I/II: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti – HTLV I/II.

As bolsas recebidas possuíam pelo menos um resultado reagente/positivo ou inconclusivo nos testes sorológicos de triagem citados anteriormente e todas as bolsas de plasma foram obtidas a partir do fracionamento do sangue total de doadores de sangue, colhido com anticoagulante, nos serviços de hemoterapia esquematizados na FIGURA 6.

Figura 6: Obtenção das unidades de Plasma para confecção de painel sorológico.



Fonte: Elaborada pela autora.

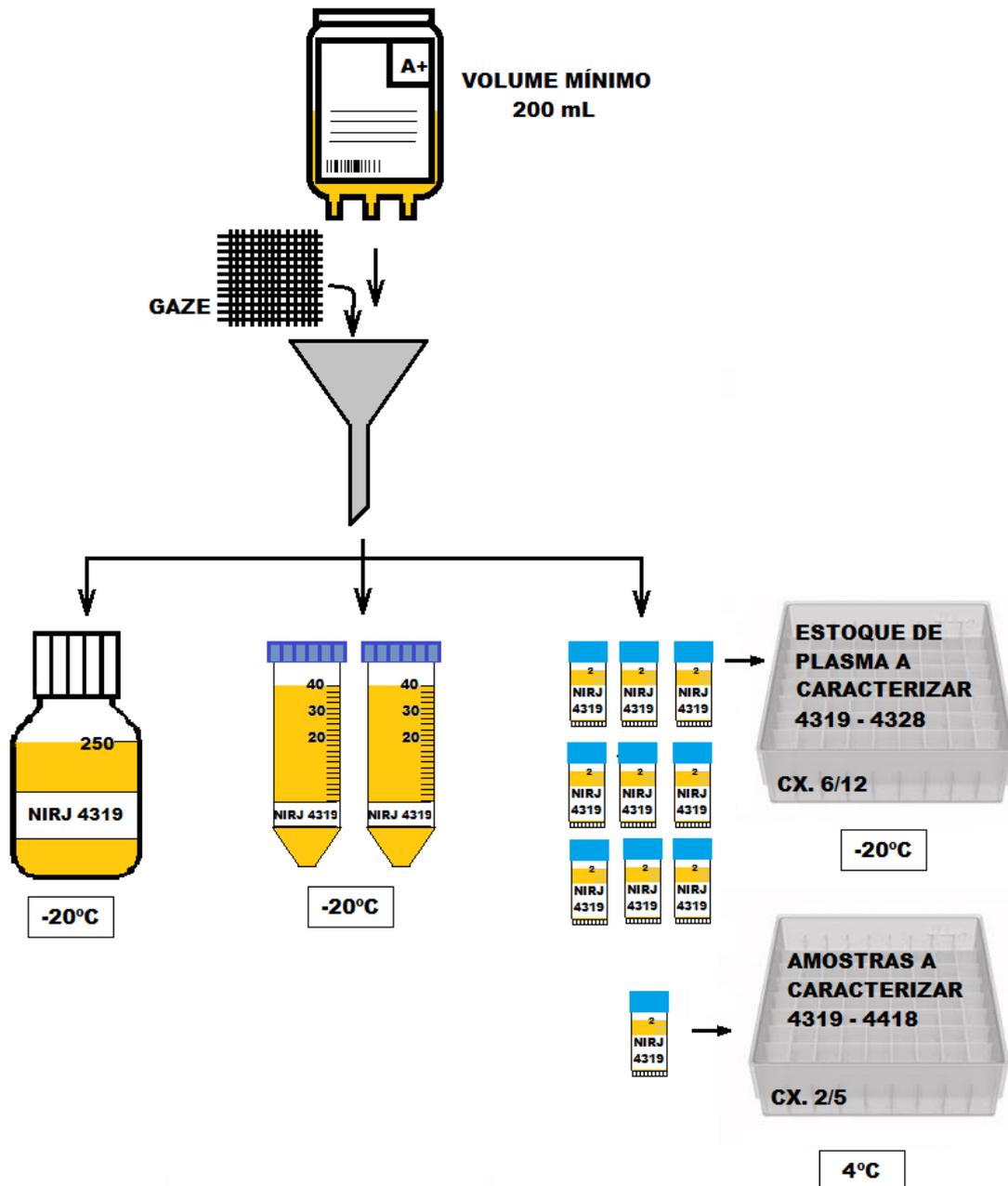


<b>Recipiente (Capacidade Total)</b>	<b>Volume Total</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Criotubos (2 mL)</b>	20 mL	10 Criotubos
<b>Tubo Falcon™ (40 mL)</b>	80 mL	2 Tubos
<b>Garrafas Nalgene™ (250 mL)</b>	O restante do plasma, sendo utilizado no mínimo 100 mL	1 ou mais garrafas;

Fonte: Elaborada pela autora.

A estocagem das alíquotas de plasma foi realizada de acordo com o recipiente/volume. As garrafas Nalgene™ e Tubos Falcon™ de volume acima de 50 mL foram acondicionados em cestos separados e estocados a -20°C (Câmara fria - 20°C ± 5°C). Os criotubos de volume entre 1,0 a 1,8 mL foram acondicionados em duas caixas distintas, uma contendo 09 criotubos foi estocada a -20°C (Freezer - 20°C ± 5°C) e outra contendo um criotubo, representando cada unidade de plasma, estocado a 4°C (refrigerador, 4°C ± 2°C), para realização da rotina dos testes sorológicos. Caso a alíquota não tenha volume suficiente para realização dos testes são utilizadas as alíquotas congeladas e assim sucessivamente (FIGURA 8).

Figura 8: Esquema de fragmentação do Plasma em Estoques.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO E CONFIRMAÇÃO SOROLÓGICA

Após o recebimento, codificação e armazenamento das unidades de plasma, pelo laboratório, a próxima etapa constituiu na caracterização e confirmação

sorológica das unidades de plasma seguindo rigorosamente a legislação vigente aplicável à triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia.

As unidades de plasma foram testadas frente a diferentes infecções: HIV1/2, HTLV-I/II, Hepatite B, Hepatite C, Doença de Chagas e Sífilis e foram realizados em cumprimento à legislação vigente:

- ✓ Sífilis: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-treponêmico ou não treponêmico;
- ✓ Doença de Chagas: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-T Cruzi;
- ✓ Hepatite B (HBV): 1 (um) teste para detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e 1 (um) teste para detecção de anticorpo contra o capsídeo do vírus da hepatite B (anti-HBc), com pesquisa de IgG ou IgG + IgM;
- ✓ Hepatite C (HCV): 2 (dois) testes em paralelo: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HCV ou para detecção combinada de antígeno/anticorpo; e 1(um) teste para detecção de ácido nucléico do vírus HCV por técnica de biologia molecular (NAT);
- ✓ HIV 1 e 2: 2 (dois) testes em paralelo: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HIV (que inclua a detecção do grupo O) ou 1(um) teste para detecção combinada de antígeno/anticorpo (que inclua a detecção do grupo O); e 1(um) teste para detecção de ácido nucléico do vírus HIV por técnica de biologia molecular (NAT);
- ✓ HTLV I/II: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HTLV I/II.

A resolução 34/2014, citada anteriormente, esta vigente desde julho de 2014, sendo assim, não abrange as amostra utilizadas, tendo em vista que as amostras recebidas foram recebidas em data anterior à vigência desta, logo, foram executadas conforme a Resolução 153/04, as amostras anteriores a 2010, e Resolução 57/10 as amostras anteriores a 2014.

Para ampliação e confecção do novo lote do painel HIV foram selecionadas apenas amostras inicialmente reagente para HIV, ou seja, enviadas pelos hemocentros como bloqueadas apenas para este marcador.

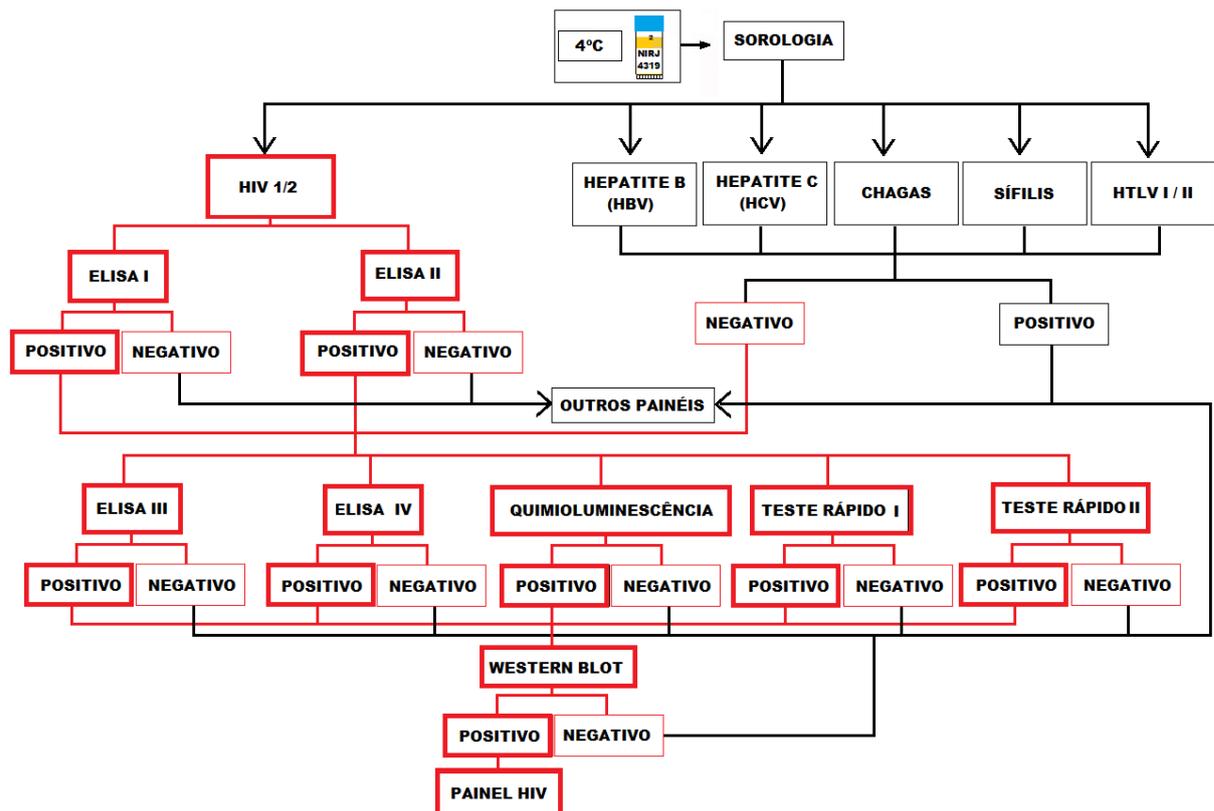
Após confirmação da sorologia nos testes ELISA I e II foram avaliadas frente a outras metodologias objetivando melhor caracterização do painel HIV. Para tal foram realizados:

- ✓ No mínimo 02 (dois) ELISA;
- ✓ No mínimo 01 (um) Ensaio de Quimioluminescência e;

- ✓ No mínimo 02 (dois) Testes Imunocromatográficos (Testes Rápidos).

A presença de anticorpos dirigidos a proteínas diversas do HIV-1/2 foi confirmada através da utilização da técnica de *Western Blot* (FIGURA 9).

Figura 9: Esquema para caracterização de Unidades de Plasma.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os testes realizados seguiram rigorosamente as instruções de uso do fabricante. Todos os conjuntos de diagnóstico utilizados possuem registro na ANVISA/MS. Com relação à caracterização no LSH:

- a) ELISA- Ensaio Imunoenzimático: no mínimo 02 (dois) testes:
- ✓ para Detecção de anticorpos- todas as amostras;
  - ✓ para Detecção de antígenos- algumas amostras;
  - ✓ para Detecção de antígenos e anticorpos- algumas amostras.

**b) TESTE RÁPIDO:**

- ✓ para Detecção de Anticorpos- todas as amostras;
- ✓ para Detecção de Antígenos e Anticorpos- algumas amostras.

**c) ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA:**

- ✓ para Detecção de Anticorpos- todas as amostras;
- ✓ para Detecção de Antígenos- algumas amostras;
- ✓ para Detecção de Antígenos e Anticorpos- algumas amostras.

Todos os produtos utilizados para caracterização encontram-se listados no QUADRO 3 independentemente do número de amostras que contemplaram as análises, isto porque devido a grande heterogeneidade de recebimento e grande número de amostras, não foi possível caracterizá-las com os mesmos fabricantes de produtos, porém, apresentavam sensibilização da fase sólida semelhante.

QUADRO 3: Kits empregados na confirmação e caracterização sorológica das amostras.

Metodologia	Testes	Sensibilização da fase sólida
<b>ELISA – Detecção de Anticorpos</b>	ELISA – A	Peptídeo Sintético do HIV-1(O), proteína recombinante derivada do envelope do HIV-1 e HIV-2 e uma proteína do core.
	ELISA – B	Antígeno e Peptídeo
	ELISA – C	Antígenos rDNA HIV-1 env (gp120/41) e HIV-2 env (gp105/gp36)
	ELISA – D	Peptídeo do HIV 1/2
	ELISA – E	Antígeno recombinante do HIV
	ELISA – F	Polipeptídios sintéticos e proteínas recombinantes do HIV 1/2
	ELISA – G	Antígenos recombinantes para HIV-1 (gp120 / gp41, p24, p17) e HIV-2 (gp36)
	ELISA – H	Peptídeos sintéticos e recombinantes do HIV-1 e HIV-2
	ELISA – I	Ag recombinante do HIV-1 (gp41 e p24) e HIV-2(gp36)
	ELISA – J	Microplacas revestidas com HIV rAg (proteínas recombinantes)
<b>ELISA – Detecção de Antígenos</b>	ELISA – K	Anticorpos monoclonais p24 biotinizados
<b>ELISA – Detecção de Antígenos e Anticorpos</b>	ELISA – L	Mistura de Antígenos e Anticorpos
	ELISA – M	Anticorpos monoclonais p24 do HIV-1 e Antígenos purificado do HIV 1/2
	ELISA – N	Anticorpos. Monoclonais e Antígenos Recombinantes
	ELISA – O	Proteína Recombinante + Anticorpo monoclonal p24
	ELISA – P	Mistura otimizada de Antígenos e Anticorpos
<b>TESTE RÁPIDO – Detecção de Anticorpos e Anticorpos</b>	TR – A	Antígenos recombinantes do HIV-1/2 e peptídeos sintéticos, anticorpos anti p-24 e avidina
	TR – B	Antígenos Recombinantes de captura HIV-1(gp41, p24) e HIV-2(gp36)
	TR – C	Antígenos (gp41 / gp36)
<b>TESTE RÁPIDO – Detecção de Anticorpos</b>	TR – D	Antígenos HIV-1 (p31, gp160, p24, gp41) e HIV-2 (gp36, gp140)
	TR – E	Antígenos recombinantes do HIV-1 (gp41 e p24) e HIV-2(gp36)
	TR – F	Antígenos recombinantes e peptídeo sintético.
	TR – G	Antígenos gp41, p24, do HIV-1 e gp36 do HIV-2
	TR – H	Proteínas recombinantes do HIV-1, das regiões gp41 e epítipo gp36 do HIV-2
<b>QUIMIOLUMI NESCÊNCIA – Detecção de Acs</b>	QUIMIO – A	Antígeno Recombinante do HIV-1 e proteína do HIV-2
	QUIMIO – B	Antígenos do HIV-1 (gp160, gp41, p25) e HIV-2 (GP36)
	QUIMIO – C	Antígenos do HIV-1 gp120, gp41, p24, gp36, HIV-II peptídeo sintético
	QUIMIO – D	Partículas paramagnéticas sensibilizadas com 2 polipeptídios HIV-1 (gp41), HIV-2 (gp36) e 2 proteínas recombinantes HIV-1 (gp 160 e p25)
	QUIMIO – E	Micro partículas paramagnéticas revestidas com estrevidavidina e antígenos recombinantes HIV 1/2 e peptídeos
	QUIMIO – F	Antígenos recombinantes do HIV-1 e HIV-2
<b>QUIMIOLUMI NESCÊNCIA – Detecção de Ags</b>	QUIMIO – G	Anticorpos Anti HIV-1 e HIV-2 recombinante
	QUIMIO – H	Anticorpos Monoclonais contra o p24 do HIV-1
	QUIMIO – I	R1 - Anticorpos monoclonais biotinizados anti-Agp24 HIV; R2- Anticorpos monoclonais Anti-Agp24 do HIV
<b>QUIMIOLUMI NESCÊNCIA – Detecção de Ags e Acs</b>	QUIMIO – J	Antígenos. p24 e anticorpos HIV-1 e HIV-2
	QUIMIO – K	Micro partículas revestidas de antígenos e anticorpos de HIV - 1 e HIV-2 ; Sondas biotinizadas com antígenos de HIV-1 / HIV- 2 e anticorpos anti-HIV p24
	QUIMO – L	Antígeno p24 monoclonal e Anticorpo recombinante c/ complexo de Rutênio
	QUIMIO – M	Proteína do HIV-1 recombinante e Polipeptídeo do HIV-1-O / HIV-2 / Anticorpos Biotinizados anti - p24
	QUIMIO – O	Antígeno p24 do HIV-1 e Anticorpos. do HIV-1 (inclusive subtipo O) e do HIV-2
<b>WESTERN BLOT</b>	WB – A	Antígeno viral lisado do HIV – 1 e proteína de envelope específica de HIV – 2 e um soro controle. (gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p39, p31, p24, p17, HIV-2)
	WB – B	Proteínas antigenicas parcialmente purificadas e inativadas do HIV – 1. (gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17)
	WB – C	Proteínas do vírus HIV-1 e um controle interno anti-IgG. (gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17).

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.5 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DO HIV

#### 3.5.1 Ensaio Imunoenzimático (EIA)

As análises foram realizadas respeitando e seguindo rigorosamente os critérios estabelecidos pelos fabricantes na instrução de uso, para execução, validação do ensaio e cálculo do ponto de corte (*cut-off*).

Para homogeneização de resultados obtidos nos diferentes ensaios imunoenzimáticos, a reatividade foi determinada pela razão dos valores de densidade ótica (D.O.) entre os plasmas avaliados e o “*cut-off*” do teste (ponto de corte) denominado de *Racio*.

$$\frac{D.O. da amostra}{Cut - off (Ponto de Corte)} = Racio$$

As unidades de plasma que apresentaram valores de *racio* superiores ou iguais a 1,0 foram consideradas Reativas e valores inferiores a 1,0 Não Reativas.

#### 3.5.2 Ensaio de Quimioluminescência

Os valores de *racio* na técnica de quimioluminescência assim como os critérios de positividade foram obtidos segundo instruções do fabricante do conjunto de diagnóstico, pela razão entre a Unidade Relativa de Luminescência (RLU) obtida em cada amostra de plasma, sobre o *cut-off* do teste.

### 3.5.3 Testes Imunocromatográficos (Testes Rápidos)

Os testes rápidos utilizados na detecção de anticorpos anti-HIV1/2 foram interpretados como reagentes ou não reagentes segundo instruções dos diferentes conjuntos de diagnóstico empregados na análise, pela análise visual do operador.

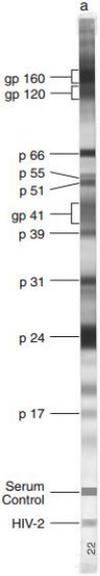
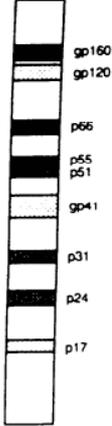
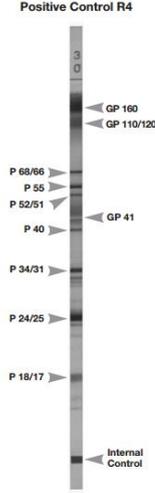
### 3.5.4 *Western Blot*

Os ensaios de *Western Blot* foram realizados em todas as amostras reativas nos ensaios supracitados. Para interpretação do WB, utilizamos os critérios estabelecidos pelo fabricante dos conjuntos de diagnósticos utilizados e mostrado no QUADRO 4.

## 3.6 CÓDIGO DE BARRAS

A inserção da identificação por código de barras foi realizada em Computador, utilizando o programa *Microsoft Excel* (2010) e fonte EAN-1 Regular disponível na rede. Onde na primeira coluna foram inseridos os números das amostras para identificação técnica e na segunda coluna foram inseridos os códigos de barras com a transcrição do escrito para formatação EAN-1 Regular.

Quadro 4: Interpretação das tiras de *Western Blot* conforme fabricante.

PADRÃO	INTERPRETAÇÃO	TESTE
	<p>Nenhuma banda específica presente. – <b>NEGATIVO</b></p> <p>Deteção de anticorpos p17 somente. – <b>NEGATIVO</b></p> <p>Deteção de 2 ENV (gp160 / gp120 gp41) e GAG (p17 , p24 , p55 ) ou POL ( p31 , p51 , p66). – <b>HIV - 1 POSITIVO</b></p> <p>Deteção de 2 ENV (gp160 / gp41 e gp120 ) e com GAG (p17, p24 , p55 ) ou POL (p31 , p51 , p66 ) e HIV - 2 específico – <b>HIV - 1 POSITIVO com HIV-2 INDICADO</b></p> <p>Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para POSITIVO. –<b>INDETERMINADO</b></p> <p>Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão não satisfaz os critérios para banda específica positiva, mas HIV-2 é visível. – <b>INDETERMINADO com HIV-2 INDICADO</b></p>	<p><b>WB – A</b></p>
	<p>Sem apresentar bandas .. – <b>NEGATIVO</b></p> <p>Padrão de quaisquer bandas presentes, mas não satisfaz os critérios para POSITIVO – <b>INDETERMINADO</b></p> <p>Quaisquer dois ou mais das seguintes gamas : presentes p24, gp41e gp120 / 160 . Comumente , a banda a gp41 ou gp160 é difusa . Outras bandas virais podem ou não estar presente – <b>POSITIVO</b></p>	<p><b>WB – B</b></p>
	<p>Nenhuma tira evidenciada. – <b>NEGATIVO</b></p> <p>Presença de GAG + POL ou apenas GAG ou apenas POL ou apenas ENV – <b>INDETERMINADO</b></p> <p>Presença de 1 ENV + (1 GAG ou 1 POL) – <b>POSITIVO</b></p>	<p><b>WB – C</b></p>

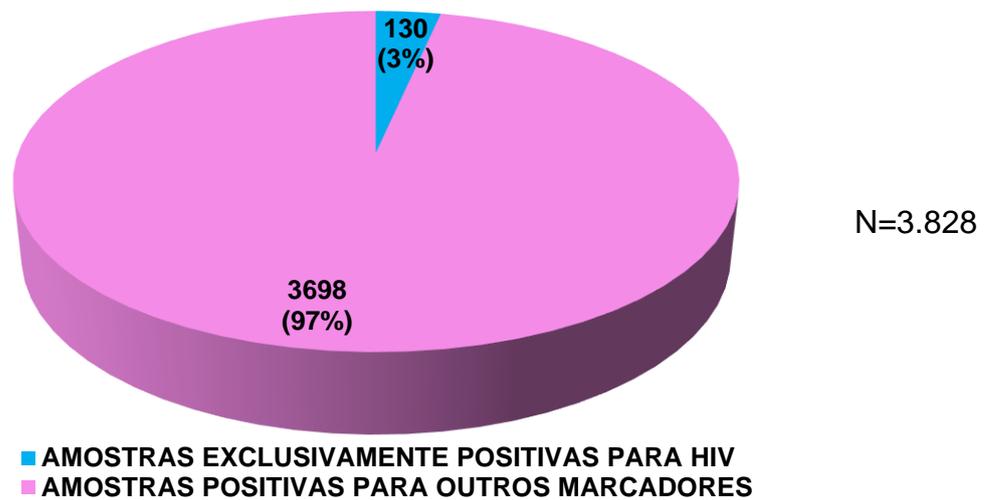
Fonte: Elaborada pela autora.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 NÚMERO DE UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS

No período de 2001 a 2013, foram recebidas, no laboratório, 3.828 unidades de plasma, doravante denominadas amostras, descartadas por sorologia reativas para diferentes patologias em serviços Hemoterápicos das diferentes regiões do país. Dessas, 130 amostras (3%) foram identificadas por apresentarem sorologia positiva para HIV, exclusivamente, conforme GRÁFICO 1.

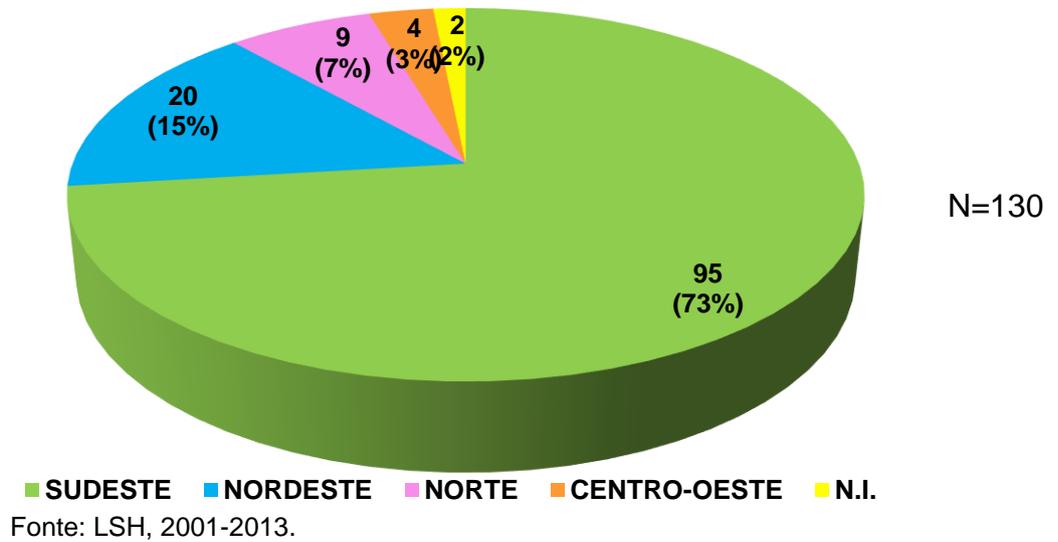
Gráfico 1- Quantitativo total de amostras recebidas



### 4.2 ORIGEM DAS UNIDADES DE PLASMA

Das 130 unidades de plasma recebidas, neste período, 20 (15%) foram provenientes da região Nordeste, 04 (3%) da região Centro-Oeste, 09 (7%) da região Norte, 95 (73%) da região sudeste, 02 (2%) não estavam legíveis para leitura, conforme ilustrado no GRÁFICO 2.

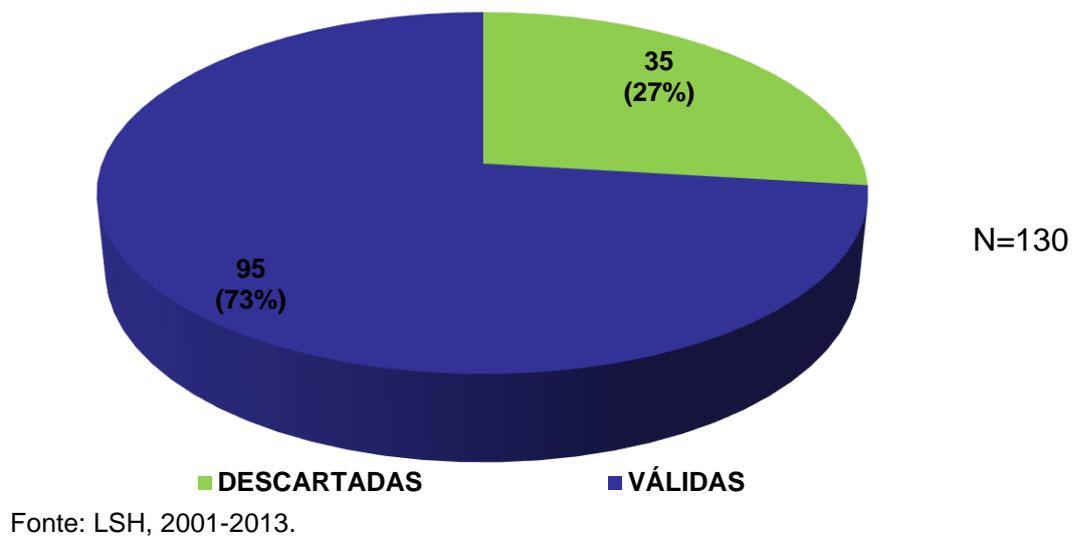
Gráfico 2: Origem das unidades de plasmas recebidas



#### 4.1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O VOLUME

Das 130 amostras analisadas 35 (27%) foram descartadas por possuírem menos de 200 mL, ou seja, volume insuficiente para realização dos testes e posterior utilização. Descartadas conforme protocolo do laboratório. Sendo assim, 95 (73%) amostras seguiram para análise sorológica, GRÁFICO 3.

Gráfico 3: Seleção das amostras de acordo com o volume.



#### 4.4 RESULTADOS OBTIDOS PELA METODOLOGIA DE ELISA

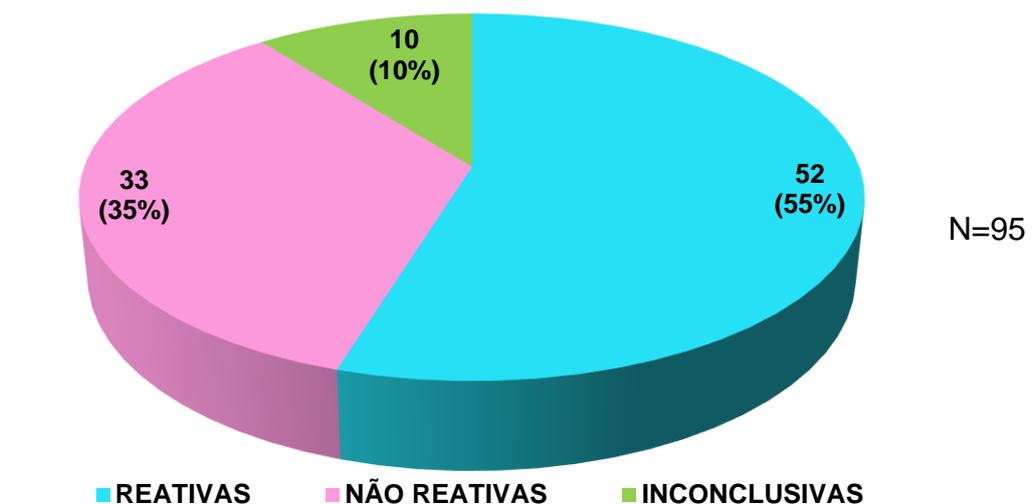
Na metodologia de ELISA foram utilizados produtos para detecção de antígeno, anticorpo e antígeno/anticorpo combinados.

##### 4.4.1 ELISA- Detecção de anticorpos do HIV

Das 95 amostras seleccionadas foram analisadas frente a dois ELISA para detecção de Anticorpos (ELISA I e II- que variam entre ELISA – A até ELISA – J); com diferentes composições antigênicas, conforme QUADRO 3.

Assim, 52 (55%) amostras obtiveram resultados REAGENTES em pelo menos dois testes executados, 33 (35%) obtiveram resultado NÃO REAGENTE em ambos os testes e 10 (10%) amostras obtiveram resultados DISCORDANTES (Inconclusivos), ou seja, Reagente em um teste e Não Reagente para o outro, conforme GRÁFICO 4.

Gráfico 4: Resultados dos Elisa para detecção de anticorpos.

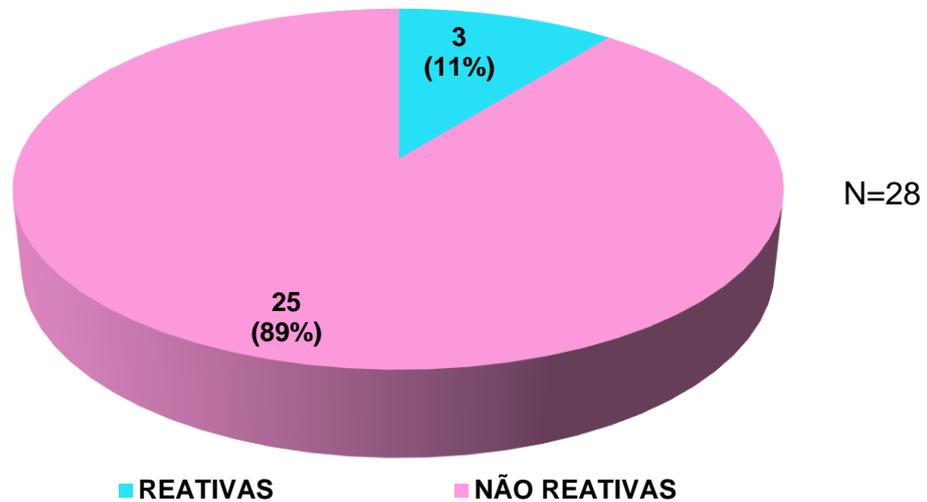


Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.4.2 ELISA- Detecção de antígenos do HIV

Além dos ELISA para detecção de anticorpos, a caracterização das amostras verdadeiro positivas, foi complementada por mais um teste – ELISA para detecção de antígenos do HIV, sendo assim, foram utilizados em 28 amostras no ELISA para detecção de antígeno (ELISA III – Elisa J), obtendo os seguintes resultados: 03 (11%) foram REAGENTES e 25 (89%) NÃO REAGENTES, conforme GRÁFICO 5.

Gráfico 5: Resultados dos Elisa para detecção de antígenos do HIV

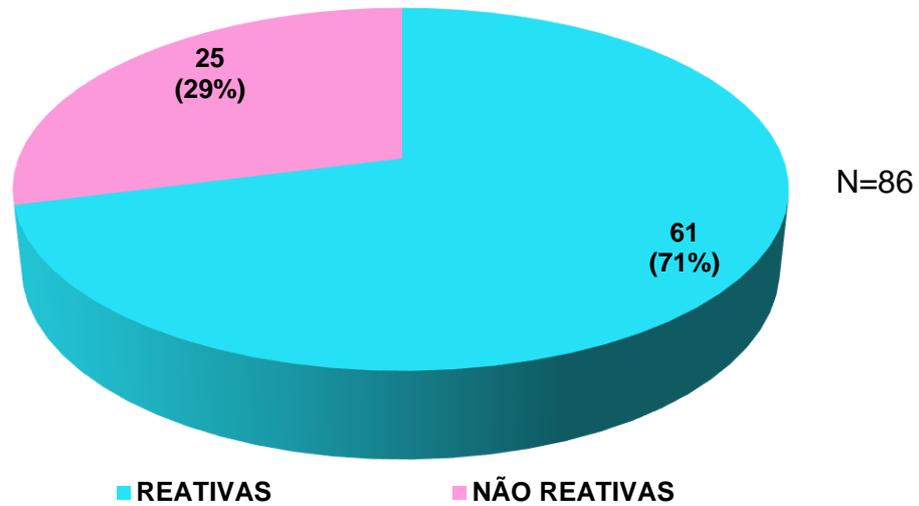


Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.4.3 ELISA- Detecção de antígenos e anticorpos do HIV

Na sequência de testes para caracterizar as amostras como verdadeiro positivas foram utilizados ELISA para detecção simultânea de antígenos e anticorpos (ELISA IV – ELISA – L até ELISA – P) das 86 amostras analisadas, 61 (71%) obtiveram resultados REAGENTES e 25 (71%) NÃO REAGENTES, GRÁFICO 6.

Gráfico 6: Resultados dos Elisa para detecção de antígenos e anticorpos

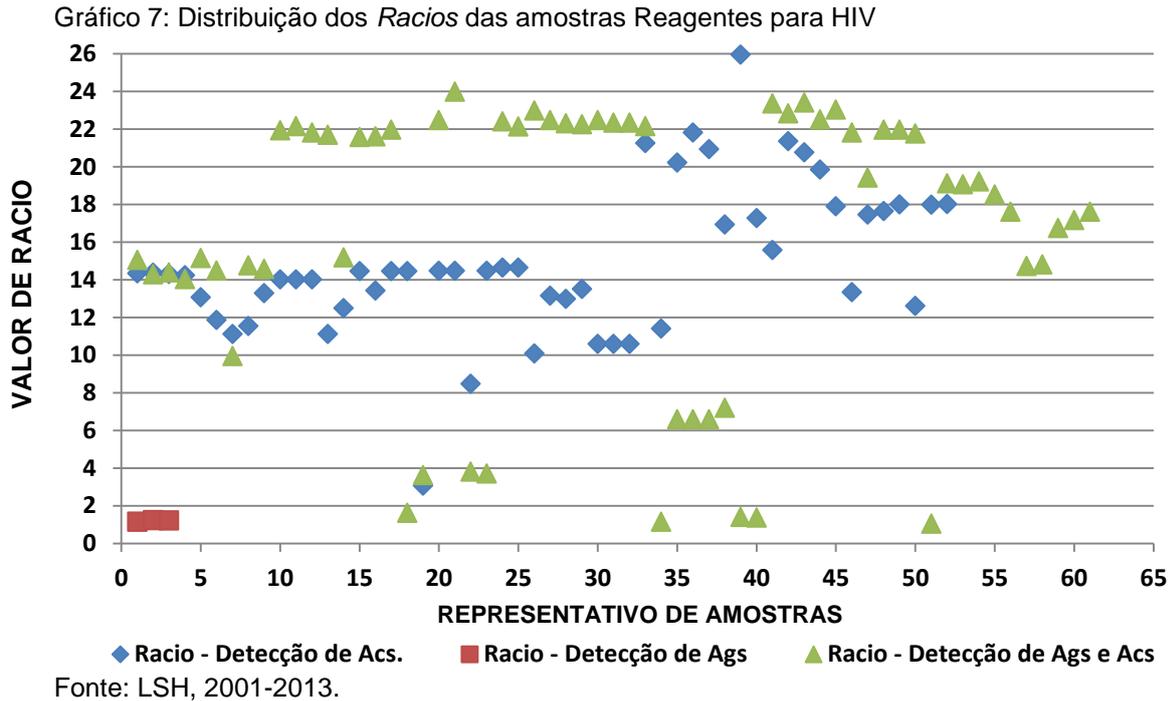


Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.4.4 *Racio* dos resultados obtidos

A média dos valores individuais de *racio* nas amostras reagentes variou de 3,07 a 25,5 nos testes para detecção de anticorpos, 1,15 a 1,21 nos testes para detecção de Antígenos e 1,05 a 23,99 nos testes para detecção de antígenos e anticorpos simultaneamente, conforme GRÁFICO 7.

Para fins de interpretação, vale ressaltar que valores de *racio* entre 1,0 e 2,5 são considerados de baixa reatividade, entre 2,6 e 4,5 são considerados de média reatividade, e valores superiores a 4,5 são considerados de alta reatividade.

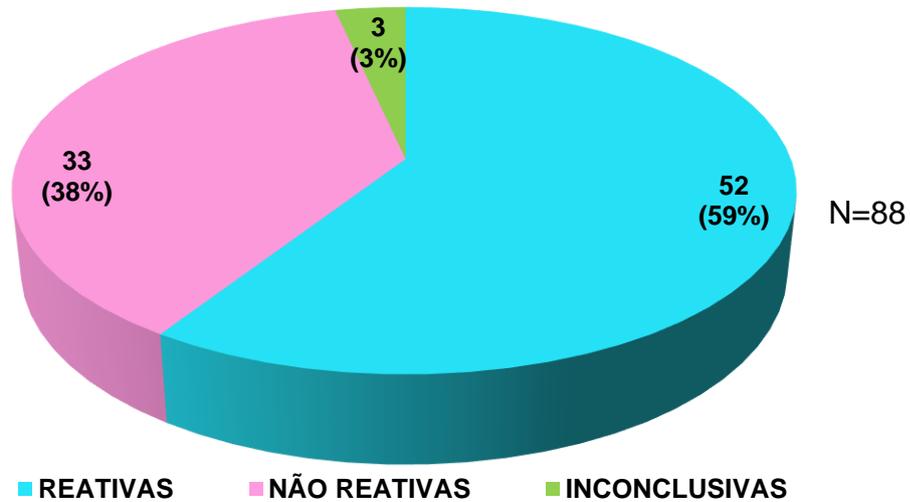


#### 4.8 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO – TESTE RÁPIDO

##### 4.5.1 Teste Rápido- Detecção de anticorpos

Foram analisadas 88 amostras frente a dois Testes Rápidos para Detecção de Anticorpos (TR – A até TR – C), destes, 52 (59%) amostras foram REAGENTES para este marcador, 33 (38%) NÃO REAGENTES e 03(3%) consideradas INCONCLUSIVAS, ou seja, reagente para um teste e Não Reagente para o outro, GRÁFICO 8.

Gráfico 8: Resultados dos Testes Rápidos para detecção de anticorpos

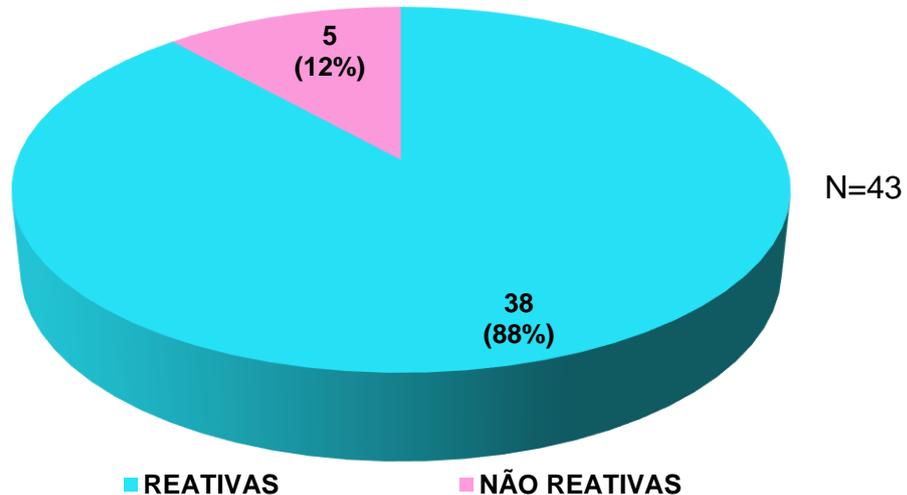


Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.5.2 Teste Rápido- Detecção de antígeno e anticorpos

Quanto à análise com Teste Rápido para Detecção de antígeno e anticorpos simultaneamente (TR – D até TR – H), foram analisadas 43 amostras, obtendo os seguintes resultados, 38 (88%) REAGENTES e 05 (12%) NÃO REAGENTES, GRÁFICO 9.

Gráfico 9: Resultados dos Testes Rápidos para detecção de antígeno e anticorpos



Fonte: LSH, 2001-2013.

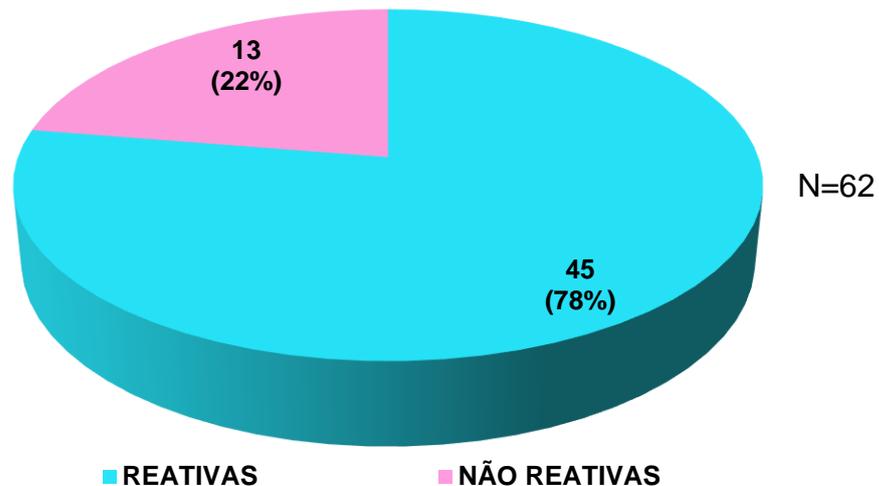
## 4.9 ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Na metodologia de quimioluminescência foram utilizados produtos para detecção de antígeno, anticorpo e antígeno/anticorpo combinados.

### 4.6.1 Ensaio de Quimioluminescência- Detecção de anticorpos

Para detecção de anticorpo nesta metodologia foram analisadas 62 amostras, onde 45 (78%) obtiveram resultado REAGENTE e 13 (22%) com resultado NÃO REAGENTE, conforme GRÁFICO 10.

Gráfico 10: Resultados da Quimioluminescência para detecção de anticorpos

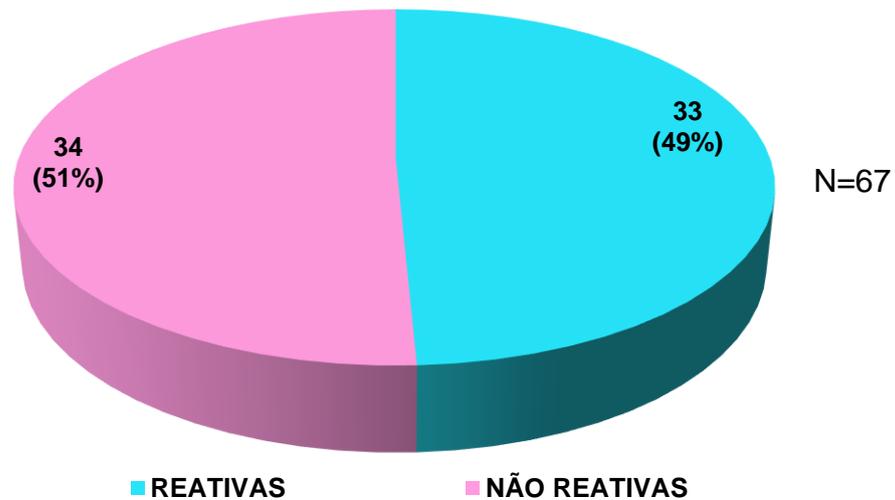


Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.6.2 Ensaio de Quimioluminescência- Detecção de antígeno

Para detecção de antígeno, foram utilizadas 67 amostras, 33 (49%) foram REAGENTES e 34 (51%) NÃO REAGENTES, conforme GRÁFICO 11.

Gráfico 11: Resultados da Quimioluminescência para detecção de antígeno

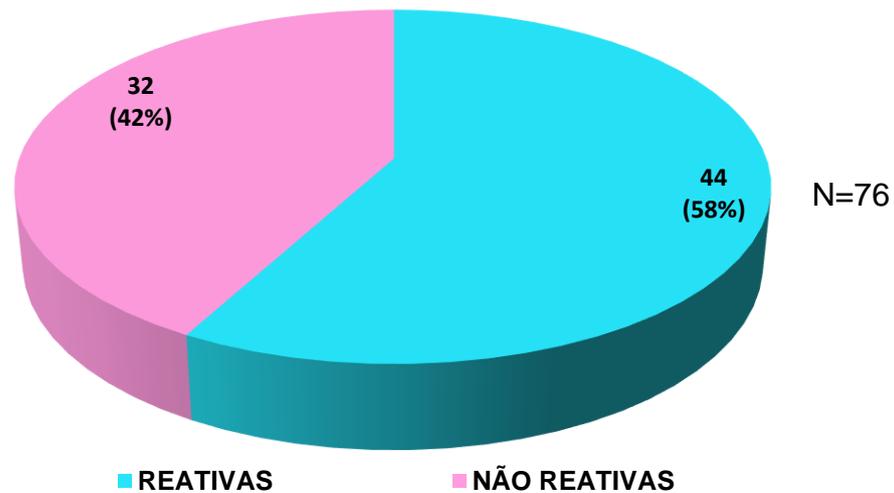


Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.6.3 Ensaio Quimioluminescência- Detecção de antígeno e anticorpos

Para detecção simultânea de antígenos e anticorpos, foram analisadas 76 amostras, no qual 44 (58%) obtiveram resultado REAGENTE e 32 (42%) NÃO REAGENTES para este marcador, conforme o GRÁFICO 12.

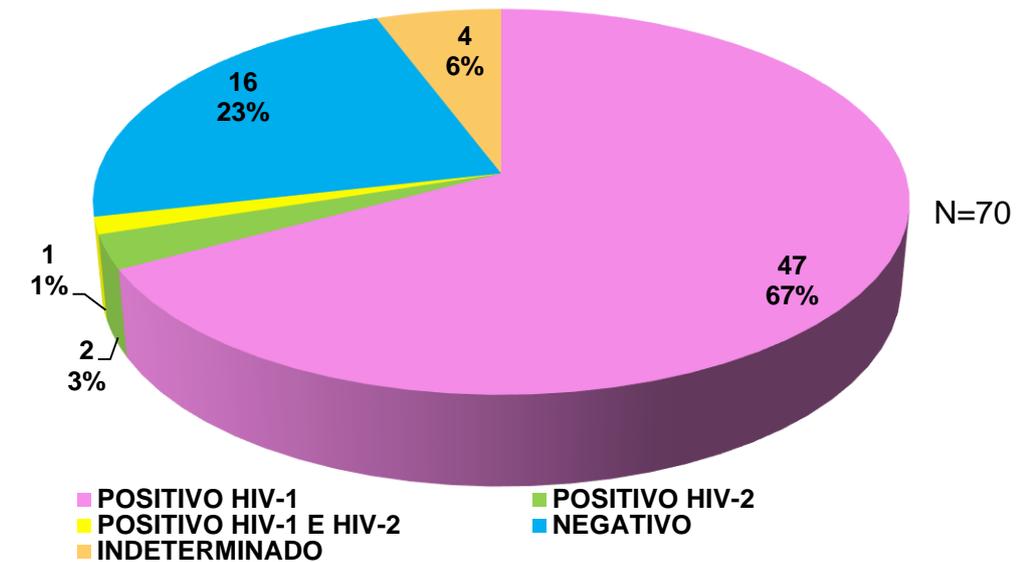
Gráfico 12: Resultados da Quimioluminescência para detecção de antígenos e anticorpos



Fonte: LSH, 2001-2013.

#### 4.7 WESTERN BLOT

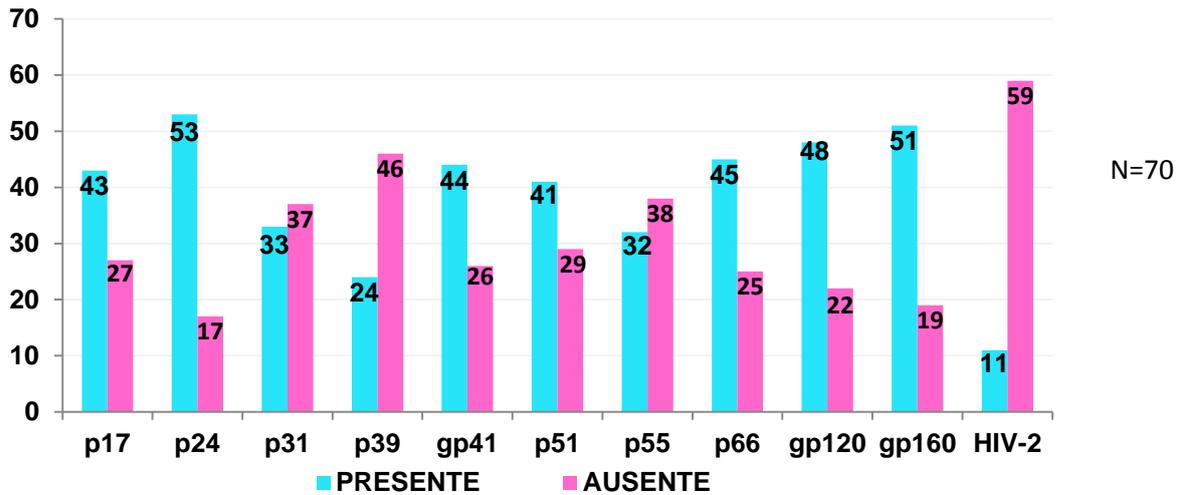
Foram selecionadas 70 amostras, todas com pelo menos um resultado REAGENTE para os testes supracitados. Depois de submetidas à análise constatou-se que embora todas tivessem pelo menos um resultado positivo, apenas 50 confirmaram ser VERDADEIRO POSITIVAS com a presença das bandas ENV, GAG e POL. Destas, 47 (67%) obtiveram resultado POSITIVO apenas para HIV-1; 01 (1%) amostra POSITIVA para HIV-2 e 02 (3%) para ambos os tipos virais, ou seja, HIV- 1 e 2. Cabe ainda destacar que 04 (6%) foram consideradas INDETERMINADAS de acordo com o resultado preconizado pelo fabricante, conforme o GRÁFICO 13.

Gráfico 13: Resultados obtidos no Teste de *Western Blot*

#### 4.7.1 *Western Blot* - presença das bandas ENV, GAG e POL

A distribuição da frequência de aparecimento das bandas nas diferentes unidades de plasma analisadas deu-se de forma homogênea. A banda mais frequentemente reconhecida foi a p24 (53/70), seguida da gp160 (51/70), gp120 (48/70), p66 (45/70), gp41(44/70), p17(43/70), p51 (41/70), p31 (33/70), p55 (32/70), p39 (24/70) e HIV-2 (11/70). Observou-se que quatro unidades de plasma foram consideradas indeterminadas, por apresentar apenas as bandas gp 160 (1/70) e p24 (3/70) e 20 amostras não apresentaram nenhum tipo de banda específica (Figura 14).

Figura 14 – Distribuição e frequência das bandas da teste de Western Blot.



Fonte: LSH 2001-2013

#### 4.8 QUANTITATIVO DE AMOSTRAS VERDADEIRO POSITIVAS PARA HIV

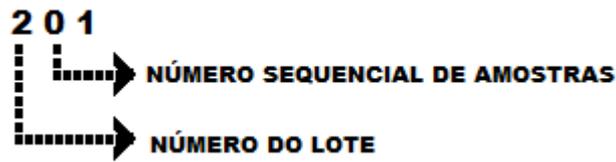
Após a análise rigorosa dos resultados foi possível caracterizar 50 amostras com verdadeiro positivas, conforme GRÁFICO 15. Estas irão compor o novo lote de amostras positivas para HIV e possibilitarão a ampliação da capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados no controle da qualidade de conjuntos para diagnóstico sorológico do HIV.

#### 4.9 CODIFICAÇÃO E INSERÇÃO DO NOVO LOTE

Após caracterização e confirmação sorológica das 50 amostras verdadeiro positivas para HIV, estas foram incluídas ao novo lote do PAINEL POSITIVO PARA HIV do Laboratório de Sangue e Hemoderivados.

Como estas amostras irão compor o segundo lote do Painel Sorológico, deverão ter uma nova codificação, a começar com o dígito 2 tendo em vista que o primeiro lote foi iniciado com o dígito 1, portanto, o novo lote começará a partir do número 201, conforme demonstrado na FIGURA 11.

Figura 10: Estrutura sequencial na nova codificação do lote amostral do Painel Sorológico para HIV



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.10 CÓDIGO DE BARRAS

As 50 amostras receberão o código de barras, que é uma representação gráfica de dados que irá permitir rápida captação de dados, precisão nas informações e atualização em tempo real e isso implica maior controle, logo diminuirá erros e reduzir tempo de análise.

Após inserção dos dados no *software* obtém-se códigos conforme a FIGURA 11.

Figura 11: Modelo do Código de Barras



Fonte: Elaborado pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 NÚMERO DE UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS

Objetivando a implementação do painel sorológico positivo para HIV empregado na avaliação de conjuntos diagnósticos, unidades de plasma positivas para diferentes marcadores, foram encaminhadas solicitações para Serviços de Hemoterapia de diferentes regiões do país no período de janeiro de 2001 a junho de 2013. Foram recebidas um total de 3.828 unidades de plasma reativas, onde 130 obtiveram resultados positivos apenas para HIV e foi dada prosseguimento às análises.

### 5.2 ORIGEM DAS UNIDADES DE PLASMA

Embora todos os serviços tenham sido notificados para envio das bolsas, apenas 9 serviços de hemoterapia contribuíram com unidades de plasma.

A maioria das unidades de plasma foi proveniente da região sudeste procedido da região Norte este fato pode estar relacionado com os dados epidemiológicos encontrados para estas regiões.

### 5.3 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O VOLUME

Dentre as amostras selecionadas, 35 foram descartadas por possuírem menos de 200 mL, ou seja, volume insuficiente. Estas não foram processadas em nenhum dos testes avaliados.

Estas 35 unidades de plasma foram descartadas inicialmente por possuírem sorologia positiva. Mesmo que a sorologia não tivesse sido positiva, estas seriam descartadas, pois não atenderiam os requisitos preconizados pela legislação vigente com relação ao volume, segundo estabelecido na RDC 34/2014.

#### 5.4 RESULTADOS OBTIDOS- METODOLOGIA: ELISA

Das 95 unidades de plasma caracterizadas na sua origem como reagentes para HIV e que possuíam volume satisfatório para análise, foram analisadas frente a ELISA para detecção de anticorpos, onde apenas 62/95 possuíam anticorpos anti-HIV. Ou seja, 33/95 amostras não possuíam anticorpos para este marcador. Para detecção de antígeno 03/28 possuíam vírus HIV e 25/28 não possuíam, além disso, para detecção simultânea de antígenos e anticorpos 61/86 possuíam antígeno e/ou anticorpo em sua composição e 25/86 não possuíam nenhum dos marcadores testados.

As unidades de plasma selecionadas apresentaram rácio que variaram de 3,07 a 25,5 nos testes para detecção de anticorpos, 1,15 a 1,21 nos testes para detecção de Antígenos e 1,05 a 23,99 nos testes para detecção de antígenos e anticorpos simultaneamente, ou seja, englobam amostras de baixa, média e alta reatividade.

#### 5.5 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO – TESTE RÁPIDO

Com relação à análise através de testes rápidos para Detecção de Anticorpos, 52/88 amostras possuíam anticorpos anti-HIV, 33/88 não possuíam e 03/88 foram consideradas indeterminadas pois obtiveram resultados divergentes. Quanto à detecção de antígeno e anticorpos simultaneamente 38/43 possuíam anticorpos e/ou antígenos virais e 05/43 não possuíam nenhum dos marcadores.

## 5.6 ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Frente a Quimioluminescência as amostras foram analisadas para detecção de antígeno, anticorpo e antígeno/anticorpo combinados. Onde 45 /62 possuíam anticorpos anti-HIV e 13/62 não possuíam. Na análise de antígeno, 33/67 foram positivos para presença de HIV ou partículas virais e 34/67 foram negativas. Para análise de ambos os marcadores 44 / 76 obtiveram anticorpos e/ou antígenos ou partículas virais e 32 não possuíam ambos.

Estes resultados identificam que as amostras não são comutáveis, ou seja, não apresentam resultados esperados em todos os produtos. Tendo em vista que não possuem resultados homogêneos em todos os testes.

## 5.7 WESTERN BLOT

Para confirmação dos resultados, todas as amostras positivas em pelo menos um teste (70 amostras) foram submetidas ao teste de *Western Blot*. Destas apenas 50 confirmaram ser VERDADEIRO POSITIVAS com a presença das bandas ENV, GAG e POL, 4 foram indeterminadas e as outras 16 amostras foram detectadas como falso-positivas sendo assim desconsideradas na composição do painel.

As unidades de plasma selecionadas como verdadeiro positivas e que compõe o novo painel anti-HIV, apresentaram resultados dentro dos padrões internacionais para o *Western Blot*, ou seja, presença de no mínimo 02 (duas) bandas referentes às proteínas do gene *env* (gp 160, gp 120 e gp41) 01 (uma) banda referente às proteínas do gene *gag* (p17, p24, p55) e 01(uma) banda referente às proteínas do gene *pol* (p31, p51e p66).

## 5.8 QUANTITATIVO DE AMOSTRAS VERDADEIRO POSITIVAS PARA HIV

Com relação aos subtipos do HIV podemos concluir que 47 apresentaram anticorpos apenas anti-HIV1; 01 apresentou anticorpos apenas anti-HIV2 e 02 apresentaram anticorpos para ambos os subtipos.

Além disso, foi possível analisar que 4 amostras foram caracterizadas como indeterminadas, destas 1 possuía presença da banda referente à proteína do gene *env* (gp 160) e as outras 3 com bandas referentes à proteína do gene *gag* (p24), estas, foram desconsideradas quanto a composição do painel com a possibilidade de ser uma amostra em fase de soroconversão.

Das 16 unidades de plasma consideradas impróprias para uso terapêutico por apresentar sorologia reagente e, quando foram testadas no LSH, apresentaram resultados divergentes, não indicam erro durante a triagem sorológica no Serviço de Hemoterapia de origem. Isto pode ocorrer, pois há uma maior precaução adotada pelos Serviços de Hemoterapia buscando desta forma, melhorar a qualidade e a aumentar segurança transfusional.

## 6 CONCLUSÃO

Foram caracterizadas 50 unidades de plasma verdadeiramente positivas para HIV. Assim, estas amostras constituem uma ferramenta de uso potencial na ampliação da capacidade analítica do Laboratório, no controle de qualidade dos conjuntos para diagnóstico do HIV. Conjuntos estes que são utilizados não só em laboratórios clínicos, como apoio ao diagnóstico da infecção pelo HIV e como também em Serviços de Hemoterapia, na triagem sorológica dos doadores de sangue.

A identificação das amostras acrescidas por código de barras irá permitir a captação de dados rápida, precisão nas informações e atualização de resultados em tempo real, implicando em maior controle, diminuição de erros e redução do tempo de análise.

## **7 PERSPECTIVA**

Empregar o painel confeccionado na rotina do Laboratório de Sangue e Hemoderivados – INCQS, a fim de avaliar a qualidade dos conjuntos para diagnóstico sorológico de HIV existentes no mercado.

Futuramente dar continuidade ao trabalho desenvolvido com ingresso no Mestrado Acadêmico.

## REFERÊNCIAS

ALDOVINE A.; WALKER B.D. **Techniques in HIV Research**. United States and Canada: Stockton Press, 1990.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 34 de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 30 ago. 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 30 ago. 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 153 de 14 de junho de 2004 . Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, a placenta e da medula óssea. . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, [on line] Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) Acesso em: 23 dez. 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 206 de 17 de novembro de 2006. Estabelece Regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento. . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, [on line]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3befe8004a4ae9f28e0b8efd6bc124d9/RDC+36-15+-+Cadastro++Registro+IVD.PDF?MOD=AJPERES>. Acesso em: 02 jun. 2015.

BRASIL. Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos saneantes e outros produtos, e dá outras providências. . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, [on line] Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 02 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2712 de 12 de novembro de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 nov. 2013. Seção 1, pág. 106.

CASTEJÓN, M.J; YAMASHIRO, R.; OLIVEIRA,C.A.F.; CAMPOS, A.R.; SARTORATO, M.C.; CABRAL,G.B.; UEDA, M. **Implementação de controle de qualidade interno (CQI) nos ensaios sorológicos antiHIV. Produção e distribuição de painéis de soro pelo Instituto Adolfo Lutz Central.** São Paulo, 2009.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMNUNOBOLÓGICOS. **O que são painéis sorológicos?.** Rio de Janeiro, 2014. [on line] Disponível em <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/perguntas-frequentes/70-perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-reativos/228-o-que-sao-paineis-sorologicos>> Acesso em: 02 jan. 2016.

LAJOLO, C.P.; JUNIOR, D.M.L.; JÚNIOR, J.F.C.M. **HIV – ELISA negativo com NAT positivo: uma realidade em Hemoterapia.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2008.

LAZZAROTTO, A. R.; DERESZ, L.F.; SPRINZ, E. **HIV/AIDS e treinamento concorrente: a revisão sistemática.** Revista Brasileira Med. Esporte, 2010.

LEITE, O. D.; OLIVEIRA, G. G.; JANEGITZ, B. C.; BATISTÃO, M. B.; SALAMI, F. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n7/14.pdf>>. Acesso em: 29 fev. 2016.

LIMA, A. C. M. A. C. C.; COSTA, C. C.; TELES, L. M. R.; DAMASCENO, A. K. C. ORIÁ, M. O. B. **Avaliação epidemiológica da prevenção da transmissão vertical do HIV.** Ceará, 2014.

LOPES, A.C. Tratado de Clínica Médica. 3 Ed. São Paulo: ROCA, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. Brasil , 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV. Brasil, 2013.

MELLO, A.L, MUSSOI, A.S, GOMES, C, PAZ, E.P, LIMA, L.F.M, MOURA, M.L. **Vigilância Sanitária de Medicamentos e Correlatos.** Rio de Janeiro: Qualitymark Ed., 1993.

NEUBERT, J.; LAWS, H.J.; ADAMS, O.; ET AL. **HIV-1 seroreversion following antirretroviral therapy in an HIV-infected child initially presenting with acquired immunodeficiency syndrome. AIDS.** 2010.

RIBEIRO,A.S.; BORGES, H.C.B.G. **Confecção de Painel Sorológico para Controle da Qualidade de Conjuntos de Diagnósticos para Detecção do Anti – Hiv.** Rio de Janeiro, 2006.

SAID, D.M.P. **Registro Sanitário de Medicamentos: uma Experiência de Revisão.** Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. 2004. 156p. Dissertação (Mestrado) – Instituto nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana** . 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SOUSA. A.M. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos.** Rio de Janeiro: INCQS, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **HIV - Assays Laboratory performance and other operacional characteristics – Report 18.** Switzerland, 76p, 2015.