

AValiação de um Imunoensaio Cromatográfico Rápido na Detecção de Anticorpos Contra o Vírus da Imunodeficiência Humana

EVALUATION OF A RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

SUZANE PRETTI FIGUEIREDO NEVES *, ANDRÉ BASTOS, **, MARÍLIA TROPIA BARROS**, VÂNIA LINO**

RESUMO

Visando atender situações de urgência para o diagnóstico da infecção pelo HIV (ex: acidentes de trabalho) foram criados os chamados “testes rápidos”. Objetivando avaliar o desempenho do teste rápido Determine HIV 1/2 – Abbott, comparou-se este imunoensaio cromatográfico qualitativo, de execução simples, rápida e de leitura visual, com uma combinação de testes sorológicos padronizada pelo Ministério da Saúde (dois testes de triagem seguidos por teste confirmatório – *Immunoblot* ou Imunofluorescência Indireta – nas amostras positivas ou duvidosas). Utilizamos dois imunoensaios seguidos por Western Blot/Line Immunoassay. Foram analisadas 105 amostras de soro humano, das quais 50 se apresentaram positivas, 54 negativas e 01 indeterminada – as custas de uma banda não viral – para a presença de anticorpos anti-HIV quando analisadas pela combinação de testes acima citada. A técnica proposta foi 100% concordante com a padronização do Ministério da Saúde para os resultados positivos e negativos (sensibilidade e especificidade de 100%), mostrando-se, assim, útil e confiável no diagnóstico da infecção pelo HIV em situações nas quais o indivíduo pode beneficiar-se da terapêutica anti-retroviral imediata.

Palavras-chave: HIV; Imunoensaios; Testes rápidos

O vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV 1 e HIV 2), inicialmente isolado em 1983, é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), uma doença que provoca o comprometimento progressivo da habilidade do sistema imune em controlar infecções e algumas desordens malignas proliferativas.¹ Embora as origens da doença permaneçam obscuras, sabe-se que o HIV já ocorria como casos isolados desde os anos cinquenta. O vírus disseminou-se na década de setenta e, devido ao seu longo tempo de incubação, os primeiros sinais da AIDS, como epidemia, tornaram-se evidentes apenas no início da década de oitenta. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 afeta hoje, no mundo, mais de 40 milhões de pessoas.²

Testes para a identificação de anticorpos anti-HIV vêm sendo utilizados largamente na identificação de portadores do vírus que podem atualmente, ser beneficiados pelo tratamento anti-retroviral precoce, na identificação daqueles não portadores do vírus que necessitam aconselhamento, para a monitorização epidemiológica e para o planejamento de ações de saúde pública. O diagnóstico da infecção é realizado utilizando-se testes sensíveis para

triagem, sendo as amostras positivas então submetidas a um teste confirmatório.³

No Brasil, o Ministério da Saúde padroniza a triagem com dois imunoensaios de princípios e/ou preparações antigênicas diferentes e a confirmação daqueles positivos, por meio da técnica de imunofluorescência indireta e/ou *immunoblotting*.⁴ Os testes de triagem, como os imunoensaios enzimáticos, e os testes confirmatórios, como o teste de Western-Blot, são procedimentos relativamente lentos, trabalhosos e dependentes de laboratórios bem equipados e profissionais treinados. Testes rápidos para detecção de anticorpos anti-HIV podem ser realizados em uma média de 10 minutos. São, portanto, de grande valor em situações nas quais os profissionais de saúde necessitam tomar decisões e condutas imediatas, tais como o início de quimioprofilaxia para HIV (por exemplo, em casos de exposição ocupacional a sangue e fluidos corpóreos e para parturientes que não fizeram pré-natal) e para definição sorológica de doadores de órgãos para transplantes.⁵⁻¹⁴ Mediante tal utilidade e diante da necessidade de validação destes ensaios, decidimos avaliar o desempenho do teste rápido Determine™ HIV1/2, no intuito de adotá-lo no Setor de Urgências do Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para uso 24 horas por dia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 105 amostras de soro humano pela combinação de testes adotada para detecção de anticorpos anti-HIV no Setor de Soro-Imunologia do Serviço de Medicina Laboratorial do HC - UFMG. Estas amostras pertenciam ao banco de soros do setor – soroteca – onde são mantidos a – 20°C todos os soros dos pacientes que

* Doutora em Ciências pela Fundação Oswaldo Cruz, Professora adjunta do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG/ Coordenadora do Setor de Soro-Imunologia do Serviço de Medicina Laboratorial-Hospital das Clínicas da UFMG - Belo Horizonte, MG

** Residentes de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UFMG - Belo Horizonte, MG.

Endereço para correspondência:
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Propedêutica Complementar
Av. Prof. Alfredo Balena, 190
Santa Efigênia - Belo Horizonte, MG
CEP: 30 130 - 100
Tel.: (31) 3248 9769

se submetem a testes anti-HIV no complexo do Hospital das Clínicas. Para realização dos exames os pacientes forneceram consentimento por escrito. A rotina sorológica para HIV incluiu a etapa de triagem, na qual utilizamos dois imunoensaios enzimáticos – um imunoensaio enzimático em micropartículas/MEIA (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany) e um ELISA indireto (Ortho®, Ortho Diagnostic System, Raritan, USA), seguidos por Western Blot (Cambridge Biotech – Rockville, USA) ou Line Immunoassay (Lia-Tek HIV 3rd, Organon Teknika para Innogenetics, Gent, Belgique) nas amostras positivas ou duvidosas. A Tabela 1 relaciona os antígenos e princípios utilizados nos kits. Para a interpretação do teste de Western Blot e Line Immunoassay foram observados os seguintes critérios adotados pelo Ministério da Saúde:

- Amostra não-reagente: ausência de quaisquer bandas
- Amostra reagente: presença de, no mínimo, duas bandas dentre as gp120/160, gp41 e p24
- Amostra indeterminada: qualquer outro padrão de bandas diferente dos descritos anteriormente

Os resultados foram liberados segundo as normas da Portaria 488/98 do Ministério da Saúde. A partir deste momento, as amostras foram então analisadas pelo teste rápido Determine™ HIV1/2 (Abbott Laboratories, Tokyo, Japan), um imunoensaio cromatográfico qualitativo, de execução simples, rápido e de fácil leitura visual, no qual anticorpos presentes no sangue reagem com o antígeno fixado em colóide-selênio e com o antígeno fixado na fase sólida formando uma linha vermelha. Nesta etapa, os executantes dos testes não tinham conhecimento dos resultados liberados e os soros a serem ensaiados foram identificados por números. Todo o procedimento foi realizado seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

Tabela 1 - Especificações dos imunoensaios para anticorpos anti-HIV

KIT	Tipo de imunoensaio	Preparação antigênica
AXSYM HIV_gO	Imunoensaio enzimático em micropartículas - MEIA	Ag. recombinantes HIV-1 envelope, HIV-1 core e HIV-2 envelope e HIV-1 grupo O
ORTHO HIV-1 HIV-2 Ab-capture	ELISA	Ag. recombinantes HIV-1 envelope (2), HIV-1 core, HIV-2 envelope
DETERMINE HIV 1/2	Imunocromatografia	Ag. recombinantes e peptídeo sintético
Cambridge-Biotech HIV Blot	Western Blot	Lisado viral de HIV
Lia-Tek HIV 3rd	Line-Immunoassay	Ag. recombinantes HIV-1 core, envelope e gag, HIV-2 envelope e HIV-1 grupo O

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa EPI-INFO, versão 6.04 (CDC Atlanta, GA). Para o cálculo da amostra, trabalhamos com percentagem

esperada de positivos e negativos igual a 98%, precisão de aproximadamente 4% e nível de confiança de 95% (IC 95% calculado pelo método de Fleiss Quadrático). Assim, a amostra necessária para o estudo seria de 47 indivíduos HIV positivos e 47 HIV negativos.

RESULTADOS

Das 50 amostras positivas na combinação ELISA/Western Blot, todas elas se mostraram positivas no Determine™ HIV1/2 e as 54 negativas nos dois testes de ELISA foram também negativas no Determine™ HIV1/2. Uma amostra de resultado indeterminado (MEIA negativo, ELISA positivo em baixas concentrações e Western Blot indeterminado apresentando uma banda inespecífica, não viral) mostrou-se negativa no Determine™ HIV1/2. O teste rápido foi 100% concordante com a combinação de testes utilizada como padrão-ouro para os resultados positivos e negativos, evidenciando sensibilidade e especificidade de 100% (IC 95% 91,1 a 100% e 91,7 a 100% respectivamente) na população estudada. Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre os resultados dos ensaios ELISA-BLOT (padrão-ouro) e teste rápido para HIV

Combinação ELISA-WESTERN-BLOT				
DETERMINE	Positivo	Negativo	Indeterminado	Total
Positivo	50	0	0	50
Negativo	0	54	1*	55
Indeterminado	0	0	0	0
Total	50	54	1*	105

Triagem realizada com 2 imunoensaios de princípios diferentes.
* Presença de uma banda não viral e MEIA negativo

DISCUSSÃO

O método padrão de triagem para detecção de anticorpos anti-HIV é o imunoensaio enzimático³, dentre os quais encontram-se as reações de ELISA. A sensibilidade relatada para os testes licenciados, sob condições experimentais ótimas é superior a 99% e a especificidade de um teste de ELISA repetidamente reativo é de aproximadamente 99%.¹ Entretanto, as técnicas de ELISA requerem até cerca de 3 horas para sua realização e as técnicas confirmatórias como Western Blot podem requerer um mínimo de 24 horas para a obtenção do resultado, dependendo do kit utilizado. Em resposta à necessidade de ensaios de triagem rápidos, simples, exatos e que não necessitam de máquinas para sua execução, foram desenvolvidos os chamados “testes rápidos”.

O ensaio avaliado no nosso estudo – Determine™ HIV1/2 – atende as necessidades acima citadas, sendo todo o procedimento e leitura (visual) realizados em um

mínimo de 15 a 20 minutos, não requerendo aparelhagem ou técnicos treinados, o que o torna um teste extremamente valioso em Serviços de Urgências.

Os resultados obtidos com o Determine[®] HIV1/2 apresentaram-se plenamente concordantes com os dados da literatura, que mostram sensibilidade e especificidade entre 99% e 100% para os testes rápidos anti-HIV.^{7,11-14} Em nosso estudo, o Determine[™] HIV1/2 apresentou uma concordância de 100% quando comparado com a combinação de testes ELISA/Blot, evidenciando sua acurácia. Uma amostra, entretanto, negativa pelo teste rápido, foi indeterminada ao Western Blot, apresentando uma banda inespecífica não viral. Esta mesma amostra apresentou-se negativa ao MEIA e positiva próxima ao *cut off* ao ELISA. Sabe-se que resultados falso-positivos geralmente apresentam baixa reatividade. Dependendo do rigor da definição aplicada, postula-se que um resultado negativo de Western Blot seja aquele no qual não se visualizem quaisquer bandas^{4,5} ou um resultado no qual não sejam detectadas bandas que correspondam a pesos moleculares de proteínas virais conhecidas.¹ A presença de bandas em localizações que não correspondem a antígenos virais conhecidos é um achado razoavelmente comum e presume-se que reflita contaminantes na preparação aos quais algum grau de ligação a anticorpos ocorra.¹⁵ Se avaliada segundo o último critério, a amostra de resultado indeterminado seria, na verdade, negativa e, portanto, concordante com o Determine HIV1/2. Atualmente, alguns testes confirmatórios têm utilizado apenas antígenos virais recombinantes, minimizando estas reações inespecíficas.¹⁶⁻¹⁹

O Determine HIV1/2 se mostra, portanto, útil e confiável em situações nas quais uma conduta emergencial depende do conhecimento do estado sorológico do paciente como, por exemplo, nos acidentes com material biológico, em que torna-se essencial também o conhecimento da sorologia da fonte contaminadora. Em casos de exposição ocupacional a sangue e fluidos corpóreos, um estudo caso-controle evidenciou uma associação entre o uso de quimioprofilaxia com zidovudina (AZT), preferencialmente dentro das duas primeiras horas pós-exposição, e a redução de 81% do risco de soroconversão após exposição ocupacional.⁶ Por outro lado, alguns autores relataram redução efetiva no custo de medicação profilática em casos de acidentes de trabalho em que o teste rápido foi negativo, enfatizando a redução da ansiedade no indivíduo acidentado e a não exposição do mesmo aos efeitos colaterais da medicação anti-retroviral.¹⁴ A relevância deste dado reflete-se no custo de um teste rápido, aproximadamente U\$5,00. Além disso, o uso do AZT para mulheres HIV-positivas, no momento do parto, reduz o risco de transmissão

materno-fetal de aproximadamente 35% para 8%²⁰, evidenciando a importância desta abordagem na gestante com sorologia desconhecida.

Acredita-se que a adoção rotineira de testes rápidos potencialmente aumenta a efetividade dos programas de teste e aconselhamento. Tais práticas visam a prevenção e redução de novas infecções, bem como a abordagem terapêutica adequada do indivíduo infectado. Dados do CDC de 1995 mostram que 25% das pessoas que tiveram testes positivos para HIV e 33% das pessoas que tiveram testes negativos em serviços públicos não retornaram para receber seus resultados.⁵ Tais dados são concordantes com nossa realidade, na qual podemos observar que muitos dos resultados de sorologia convencional para o HIV realizados para o Serviço de Pronto Atendimento – P.A. – não encontram seu destinatário (dados não mostrados). De acordo com o CDC, um teste rápido negativo, devido à alta sensibilidade, não exige confirmação, enquanto resultados positivos devem ser suplementados por testes convencionais. Testes rápidos possibilitariam, assim, a orientação e intervenção necessárias pelos profissionais destas instituições em tempo adequado e a custo razoável.

SUMMARY

The HIV rapid tests were created to facilitate the diagnosis of HIV infection in cases of emergency (exposure to a potentially contaminated infected biological source, transplantation, labour when the serological status of the mother is unknown). In order to evaluate the performance of the rapid test Determine - Abbott, we compared this rapid immunochromatographic assay, simple to manage, fast and easy to read by simple visual inspection, with a combination of serological tests as established by the Ministry of Health, Brazil (two different screening tests followed by a confirmatory one whenever reactivity was detected). We analyzed 105 samples of human serum by two different enzyme immunoassays and performed the Western Blot/Line-Immunoassay on those reactive. We observed 50 positive, 54 negative and one indeterminate sample (with a non-viral band). Then, we analyzed these samples with the Determine rapid test. The results showed an agreement of 100% if compared with the combination of tests as proposed by the Ministry of Health. Our results show that this test is an useful and accurate tool for the diagnosis of HIV in individuals who may benefit from immediate therapeutic intervention

Keywords: HIV; Immunoassays; Rapid tests

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Professor Fernando Proietti, do Departamento de Medicina Preventiva e Social, pelo estudo estatístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's: principles and practices of infectious diseases. 5th.ed. Philadelphia: Churchill and Livingstone; 2000.
- 2- World Health Organization. Who Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. Human immunodeficiency virus and Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV/AIDS). Genebra; 2000.
- 3- Roland M, Fine R, Volberding P. HIV antibody testing: indications and interpretations. HIV. San Francisco, California: University of California; 1998.
- 4- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Fluxograma para o diagnóstico sorológico do HIV. Portaria nº 488 de 17 de junho de 1998. Brasília: 1998.
- 5- Center for Disease Control and Prevention. Division of HIV/AIDS Prevention. Rapid HIV tests: issues for laboratorians. Washington; 1998.
- 6- MMWR. Case-control study of HIV seroconversion in health-care workers after percutaneous exposure to HIV-infected blood. France, United Kingdom, and United States, January 1998- August 1994. Morb Mortal Wkly Rep 1995; 44:929-33.
- 7- Ng KP, Saw TL, Baki A, He J, Singh N, Lyles CM. Evaluation of a rapid test for the detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 and 2. Int J STD AIDS 1999; 10(6):401-4.
- 8- Irwin K, Olivo N, Schable CA, Weber JT, Janssen R, Ernst J et al. Performance characteristics of a rapid HIV antibody assay in a hospital with a high prevalence of HIV infection. Ann Int Med 1996; 125 (6):471-5.
- 9- MMWR Update: HIV counseling and testing using rapid tests –United States 1995. Morb Mortal Wkly Rep. 1998 Mar 27; 47(11):211-5
- 10- Spielberg F, Kassler WJ. Rapid testing for HIV antibody: a technology whose time has come. Ann Int Med 1996; 125(6):509-11.
- 11- Green TD, Sedmak DD, Grose MP, Featheringham NC, Neff JC. Evaluation of a rapid peptide-based anti-human immunodeficiency virus-1 antibody immunoassay. Am J Clin Pathol 1992; 97 (6):854-7.
- 12- Phillips S, Granade TC, Pau CP, Candal D, Hu DJ, Parekh BS. Diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection with different subtypes using rapid tests. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(4):698-9.
- 13- Aidoo S, Ampofo WK, Brandful JA et al. Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. J Clin Microbiol 2001; 39 (7):2572-5.
- 14- Machado AA, Martinez R, Haikal AA, Rodrigues da Silva MC. Advantages of the rapid HIV-1 test in occupational accidents with potentially contaminated material among health workers. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2001; 43(4):199-201.
- 15- DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention. 4th ed. New York: Lippincott-Raven; 1997.
- 16- Mingle JA. Differentiation of dual-seropositivity to HIV-1 and HIV-2 in Ghanaian sera using line immunoassay (INNOLIA). West Afr J Med 1997; 16(2):71-4.
- 17- Portincasa P, Conti G, Visalli S, Talarico E, Chezzi C. The use of radioimmune western blotting to evaluate indeterminate western blotting results in blood donor HIV serodiagnosis. New Microbiol 1997; 20(3):277-81.
- 18- Urassa W, Godoy K, Killewo J. The accuracy of an alternative confirmatory strategy for detection of antibodies to HIV-1: experience from a regional laboratory in Kagera, Tanzania. J Clin Virol 1999; 14(1):25-9.
- 19- Mylonakis E, Paliou M, Lally M, Flanigan TP, Rich JD. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. Am J Med 2000; 109(7):568-76.
20. World Health Organization. Report on Global Surveillance of Epidemic. Geneva: UNAIDS/WHO; 1998.