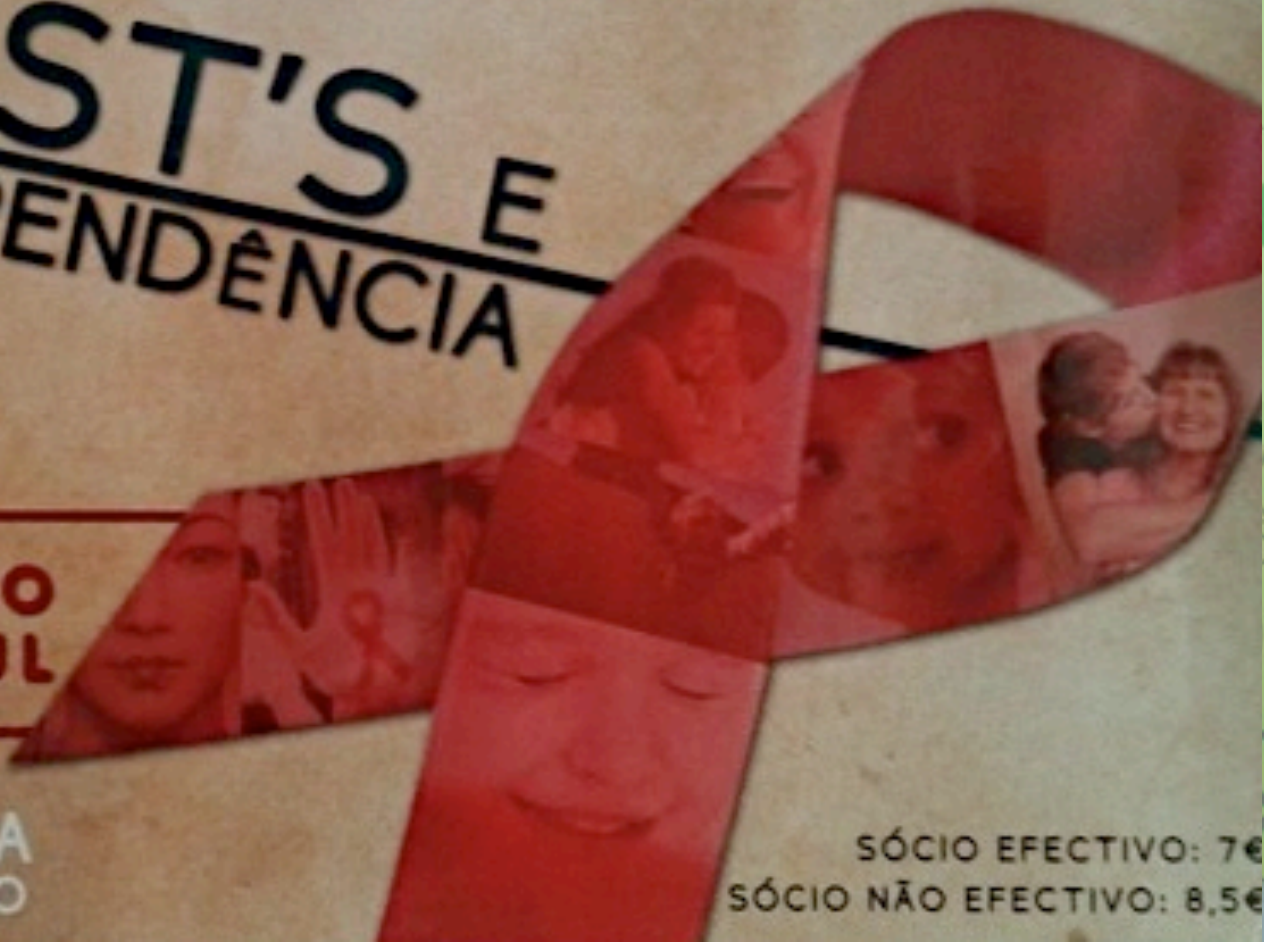
BIOHAZAR

XVII CURSO DE FORMAÇÃO DE MEDIADORES PARA A EDUCAÇÃO NA SAÚDE EM

SIDA, IST'S E TOXICODEPENDÊNCIA



26 A 30 NOVEMBRO
AUDITÓRIO FFUL

CAMPANHA DE RUA
DIA 1 - EST. BAIXA-CHIADO

SÓCIO EFECTIVO: 7€
SÓCIO NÃO EFECTIVO: 8,5€

Quirina dos Santos-Costa

Pharm D, PhD Student

Assistant Lecturer

Unidade dos Retrovírus e Infecções Associadas - Centro de Patogénese Molecular

Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa

quirina.c@ff.ul.pt

http://www.ff.ul.pt/~santoscostaq/

III Painel

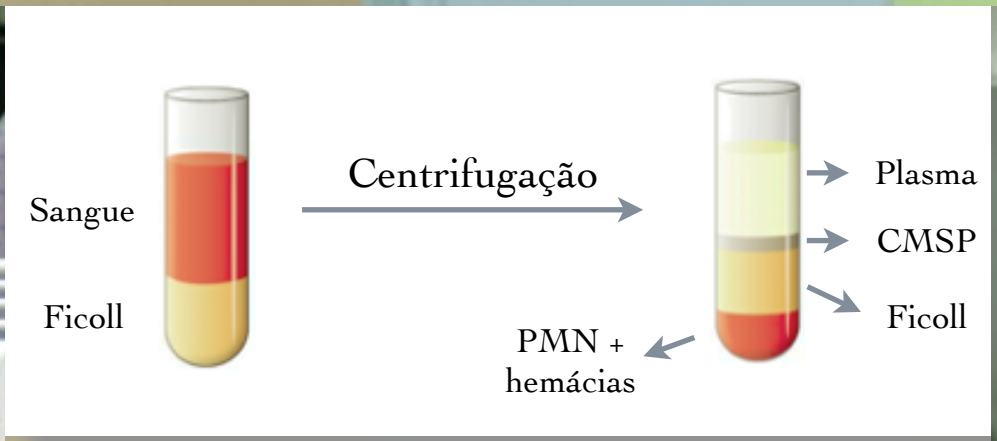
XVII Curso de Formação de Mediadores para a Educação na Saúde em SIDA, IST´s e Toxicodependência - GIPES 2012

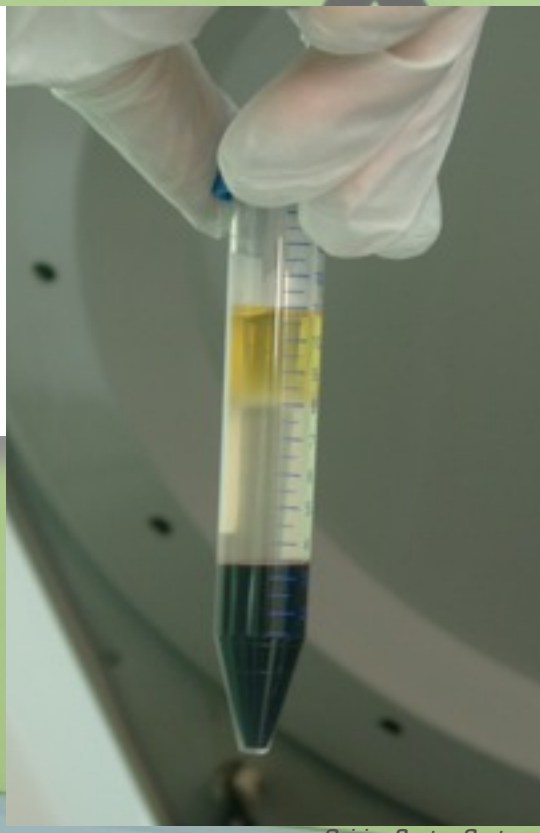
Infecção VIH-SIDA

Diagnóstico

Directo e Indirecto

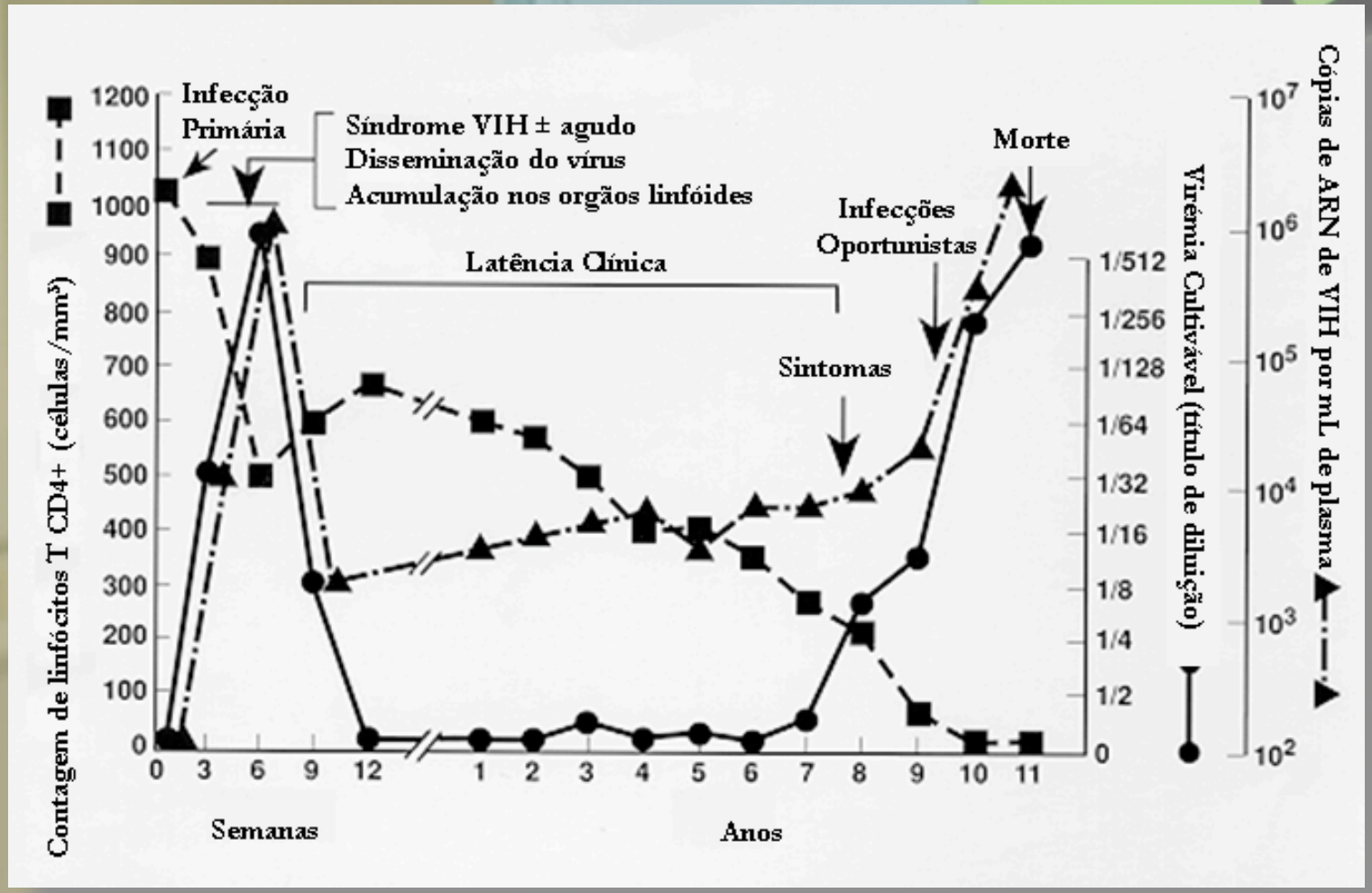
Amostra biológica Sangue: Colher o sangue em tubo com anticoagulante (heparina/ EDTA-5%PBS). Isolar, por migração diferencial em gradiente de Ficoll-Hipaque (Metrizoato de sódio), o plasma, as células mononucleadas (linfócitos + monócitos) e os polimorfonucleares. Inocular em células susceptíveis.





Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Patogénese da infecção



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

VIH - Patogénese da Infecção

- **Infecção primária**:
  - Replicação vírica elevada
  - Nível de anticorpos específicos anti-VIH baixos
  - Sintomatologia pouco específica
  - Marcadores: cultura vírica +; PCR +; Ag p24 +; AC -
- **Fase assintomática**:
  - Replicação vírica controlada
  - Nível de anticorpos específicos elevado
  - Ausência de sintomatologia
  - Marcadores: cultura vírica +/-; PCR +; Ag p24 -; AC +
- **Fase sintomática (SIDA)**:
  - Replicação vírica aumenta
  - Imunodeficiência
  - Infecções oportunistas - sintomas evidentes
  - Marcadores: cultura vírica +; PCR +; Ag p24 +; AC +

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Diagnóstico Virológico da infecção pelo VIH

Métodos Indirectos

- Detecção de anticorpos anti-VIH no soro ou plasma (rastreio e confirmação).

Métodos Directos

- Detecção de partículas virais (cultura viral) no sangue (CMSP);
- Detecção de antigénio viral Agp24 no soro ou plasma;
- Detecção do DNA proviral nas CMSP.

Determinação da Carga Viral

- Prognóstico da infecção e monitorização da terapêutica (plasma).

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Diagnóstico Virológico da infecção pelo VIH

Características dos testes de diagnóstico:

Métodos Indirectos

- **Testes serológicos de rastreio**
  - sensibilidade elevada
  - especificidade < 100%
  - exigem confirmação
- **Teste serológico de confirmação**
  - especificidade elevada
  - exigem critérios de classificação

Métodos Directos

- **PCR**
  - especificidade e sensibilidade elevadas
- **Cultura**
  - especificidade elevada
  - sensibilidade variável conforme a fase da infecção
- **Ag p24**
  - especificidade elevada
  - sensibilidade variável

Diagnóstico Virológico da infecção pelo VIH

"Dogma" da infecção

Indivíduo que tenha anticorpos anti-VIH é sinónimo de indivíduo infectado.

Excepto em crianças de idade inferior a 18 meses e indivíduo na fase de janela imunológica

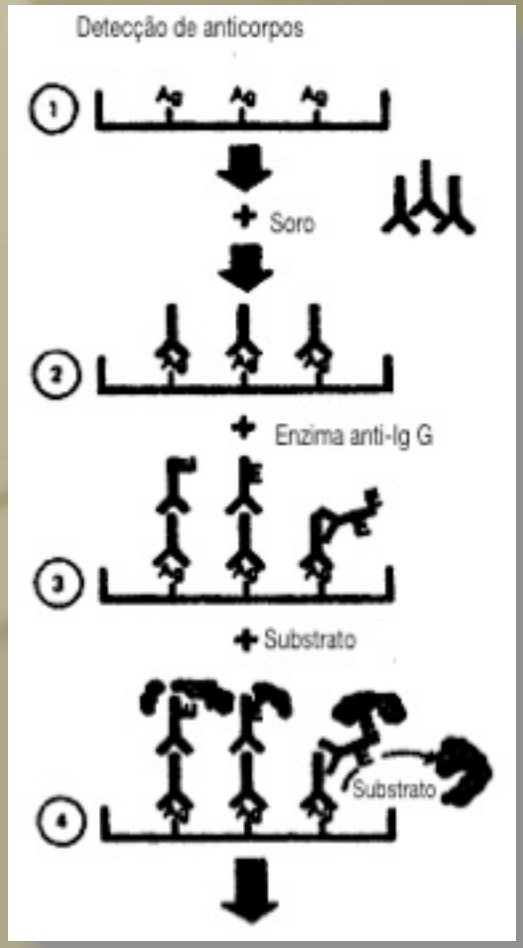
É um diagnóstico serológico baseado na pesquisa de anticorpos circulantes anti-VIH.

- método imunoenzimático (ELISA): os antigénios fixos ao suporte sólido podem ser proteínas recombinantes ou péptidos sintéticos;
- os mais recentes (4G) incluem Ag de todos os subtipos de HIV1, nomeadamente o subtipo O, Ag do HIV2 e um anticorpo monoclonal para o Agp24 do HIV1;
- Requerem confirmação por WB dos resultados positivos.

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Diagnóstico da infecção

Testes de rastreio (Imunoenzimáticos)



Produto corado

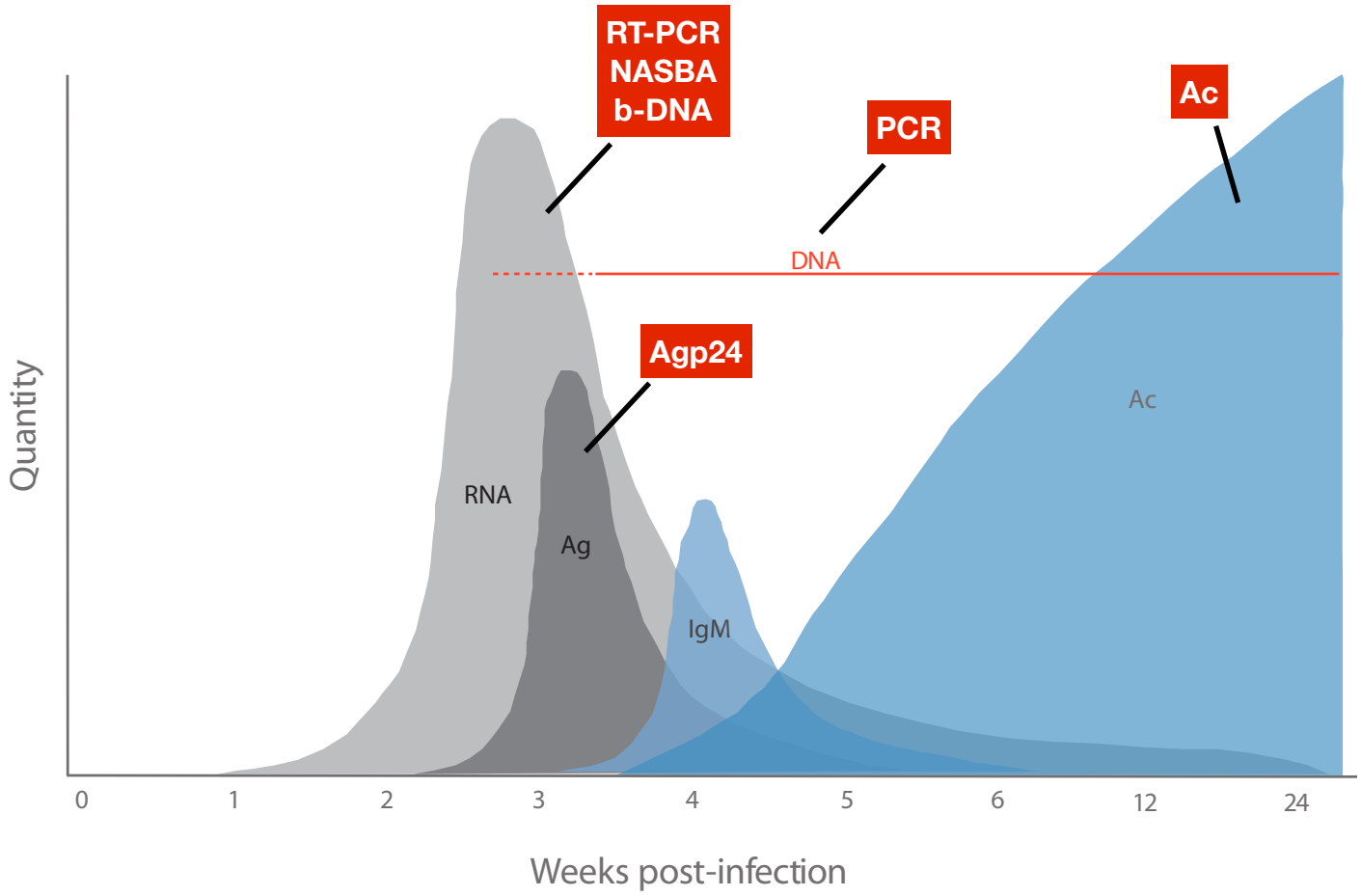
Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Diagnóstico da infecção

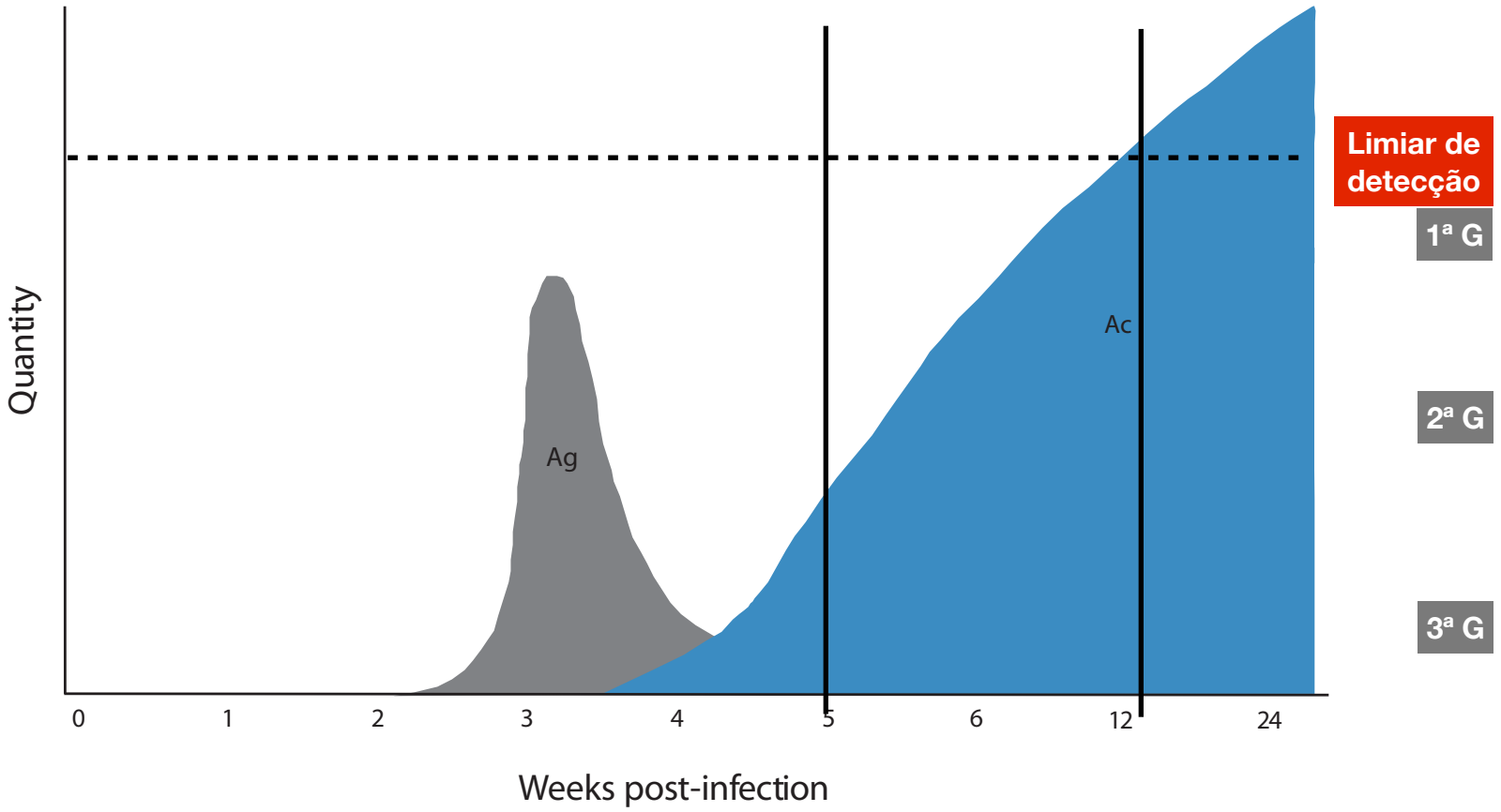
Testes de rastreio (Imunoenzimáticos)
4ª geração

- Combinam a detecção de anticorpos e de Agp24 numa única reacção
- Reduzem o tempo após a infecção inicial durante o qual não há resultados reactivos

Marcadores da infecção



Testes de rastreio de 4ª geração



O Pepti-Lav...

Não é teste de confirmação
É um teste de "reencaminhamento"

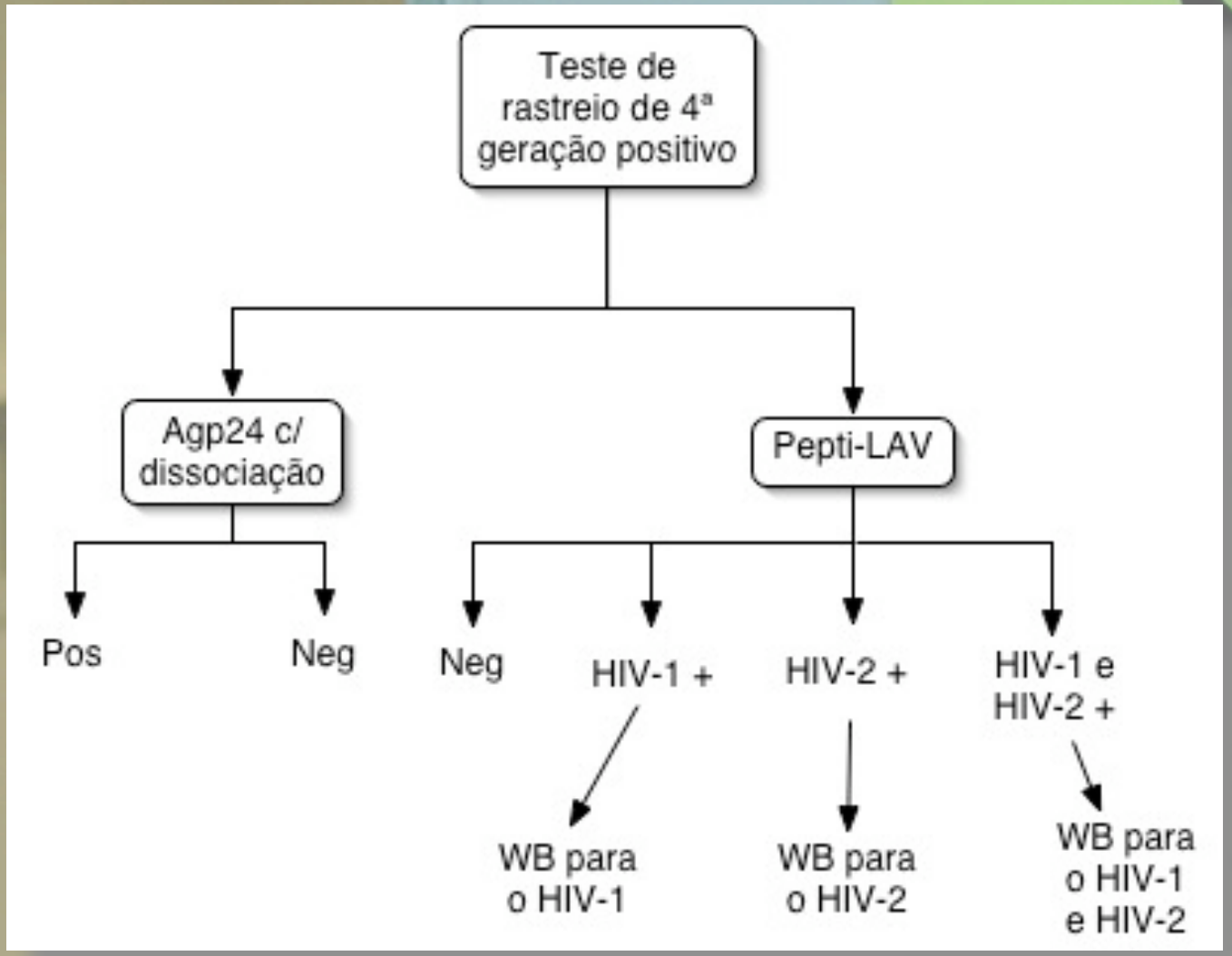
Controlo

HIV-2 - gp36

HIV-1 - gp41

Pepti-Lav

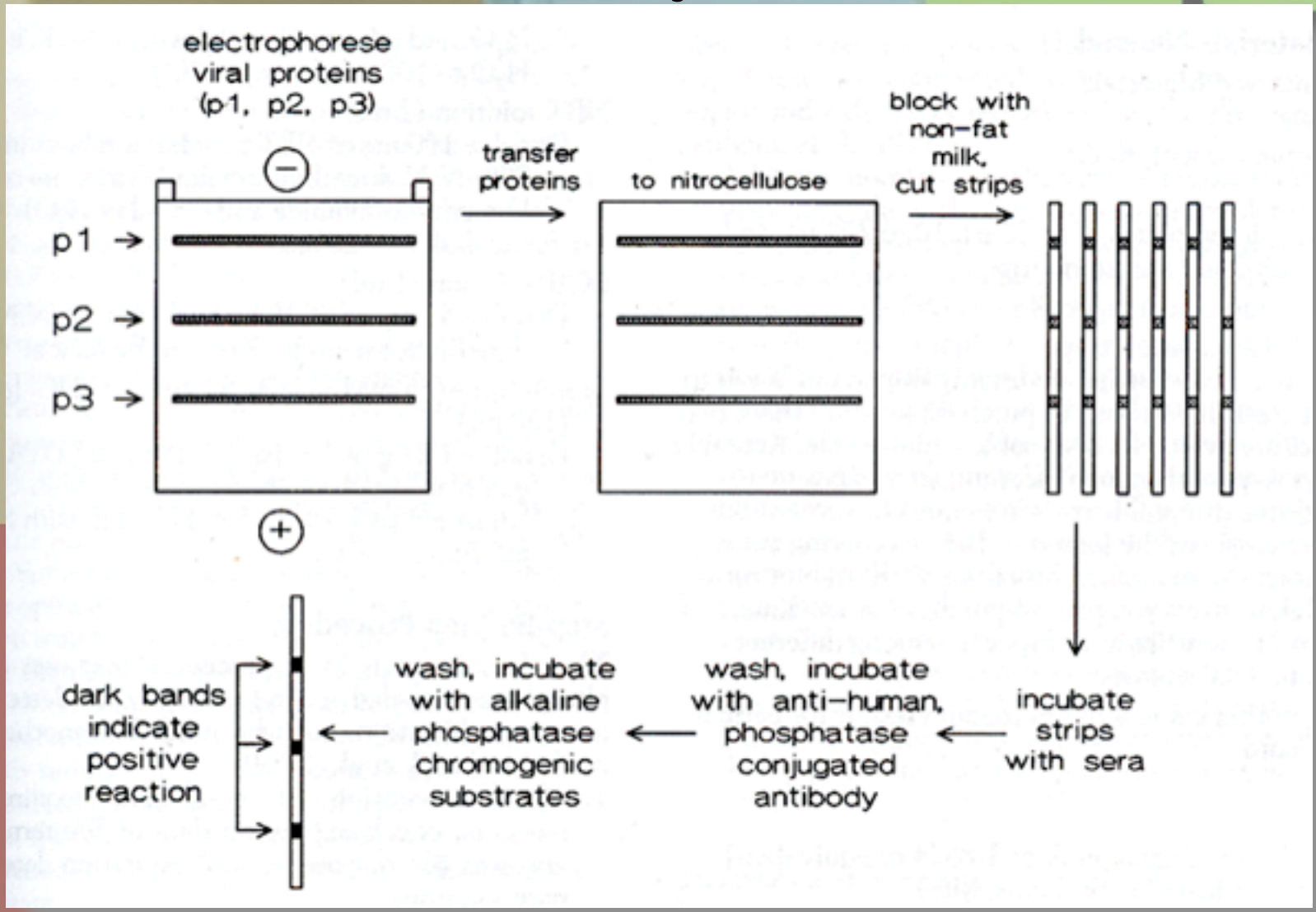
Pepti-Lav: utilidade



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

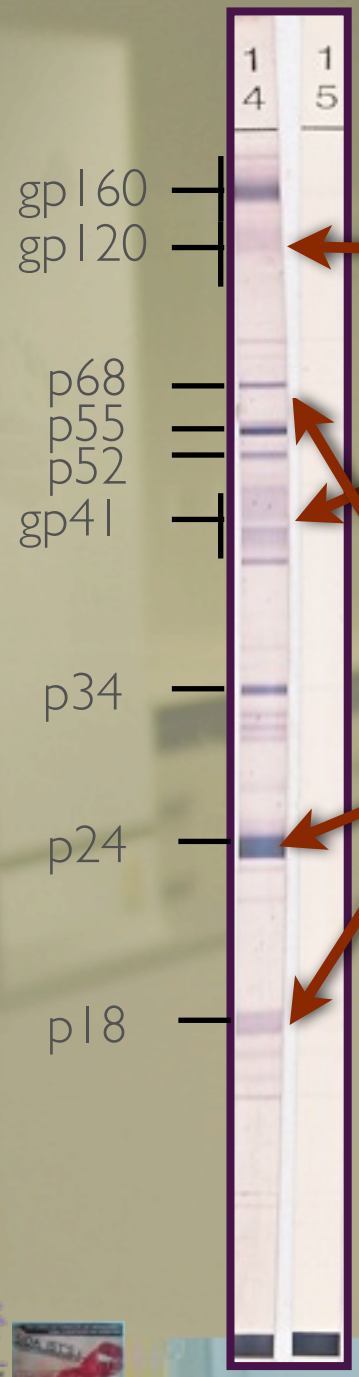
Diagnóstico da infecção

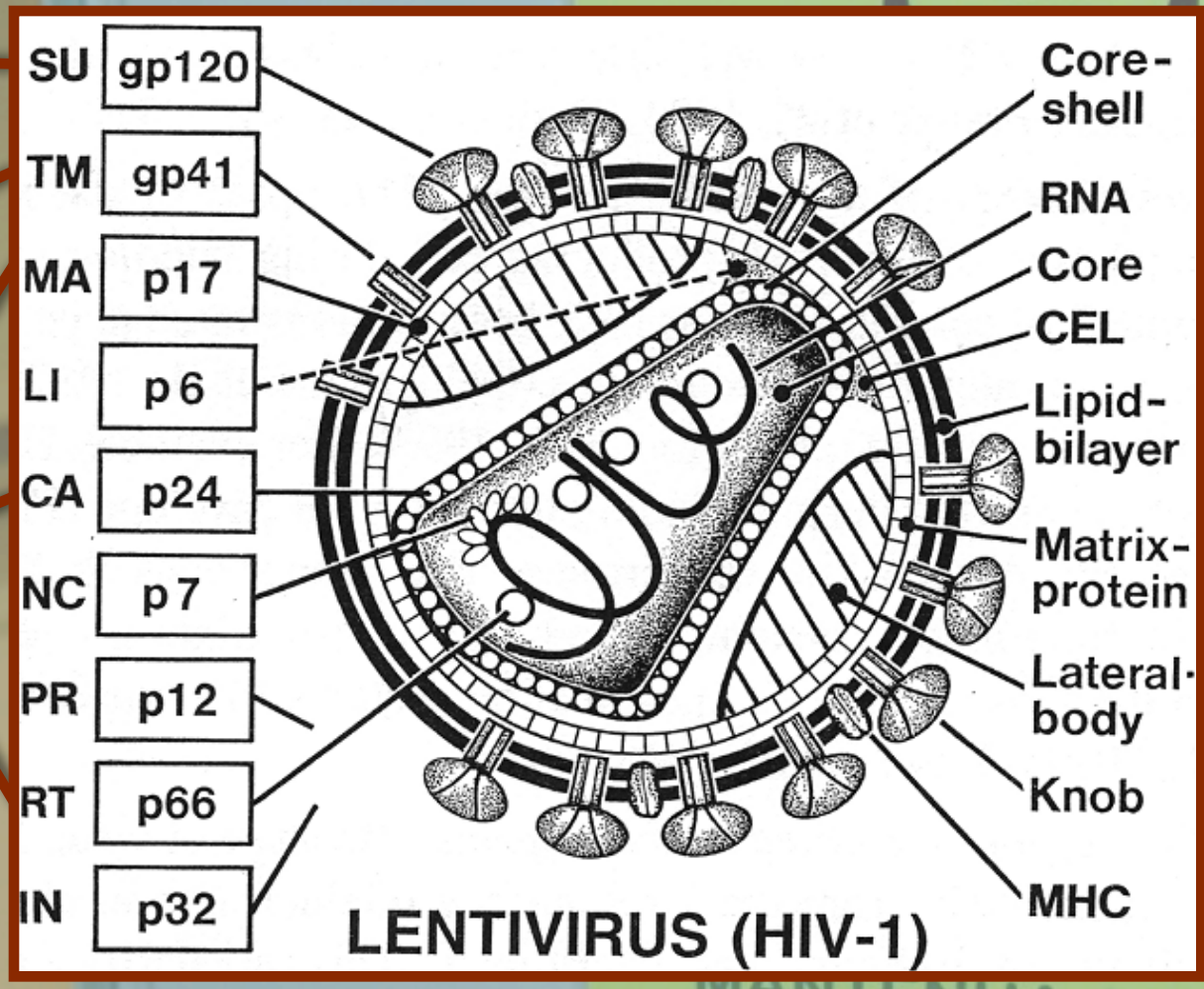
Testes de Confirmação: Western-blot



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

W.B. HIV-1


1 4
1 5
gp160
gp120
p68
p55
p52
gp41
p34
p24
p18


SU gp120
TM gp41
MA p17
LI p6
CA p24
NC p7
PR p12
RT p66
IN p32
Core-shell
RNA
Core
CEL
Lipid-bilayer
Matrix-protein
Lateral-body
Knob
MHC
LENTIVIRUS (HIV-1)

Diagnóstico da infecção

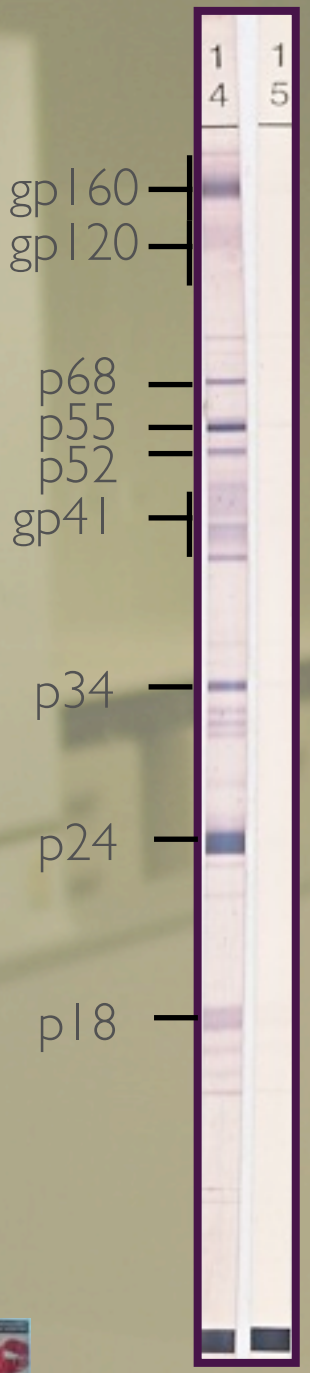
Critérios de classificação do teste de Confirmação: WB

Positivo: anticorpos para, pelo menos, dois dos antigénios codificados pelo gene *env* (gp160, gp120. gp41; gp140, gp105, gp36)

Negativo: ausência de anticorpos para qualquer dos antigénios virais

Indeterminado: anticorpos para os antigénios virais, excepto os codificados pelo gene *env*

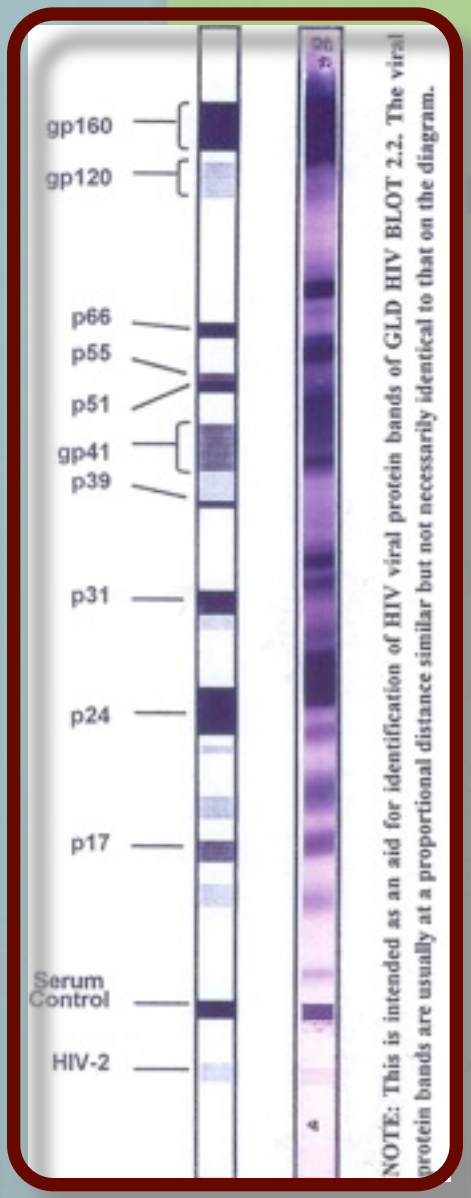
W.B. HIV-1



gp160

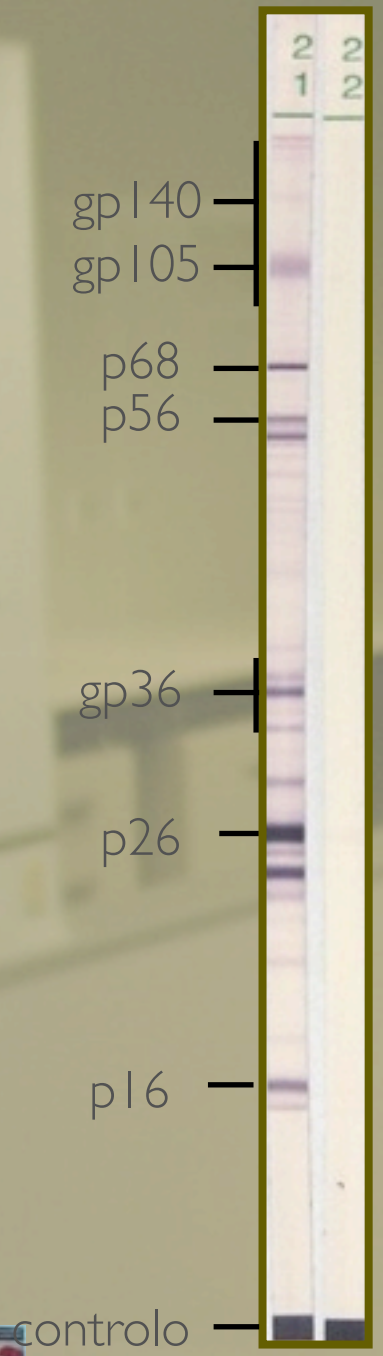
p24

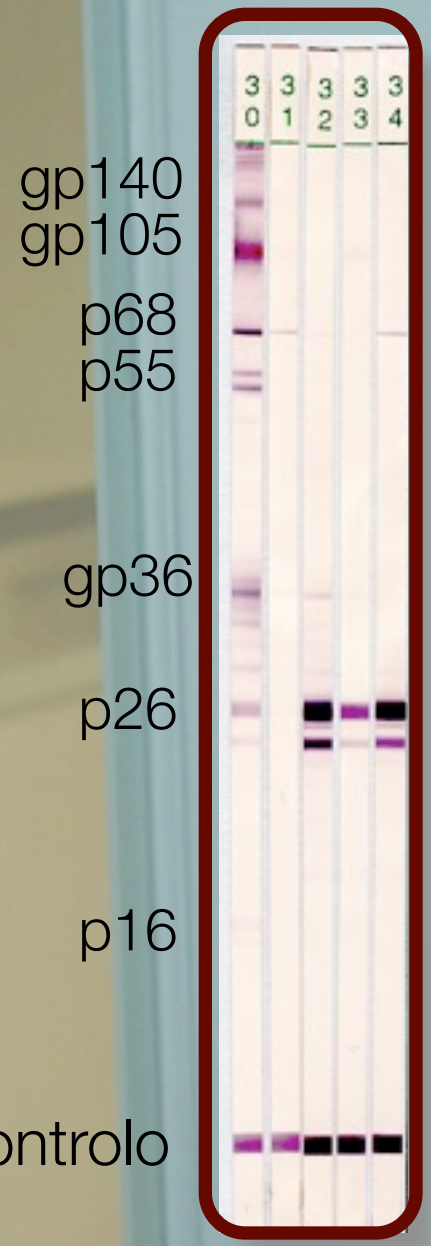
Controlo

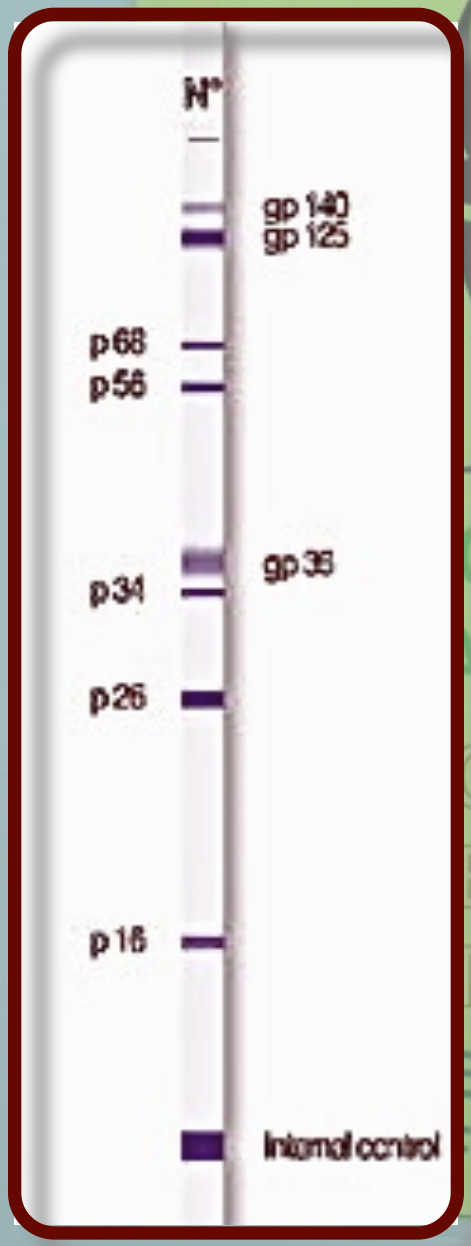


Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

W.B. HIV-2







Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Porque surgem "Problemas" no diagnóstico da Infecção pelo HIV

- **Inúmeros subtipos do HIV-1**
- **Falsos positivos** (EIA+ com WB - ou persistentemente indeterminado):

Leucemias	Gravidez
Infecções virais agudas	Multi-transfusionados
Auto-anticorpos	Hemodialisados
Doenças auto-imunes	Recém-vacinados
Hiperbilirrubinémia	Gamopatias

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Porque surgem "Problemas" no diagnóstico da Infecção pelo HIV

- **Falsos negativos**:

  Recém-infectados (janela imunológica)

  Infectados por subtipo exótico

  Seroconversão tardia (HIV2)

  Hipogamaglobulinémia

  Disfunções das células B

  Quimioterapia

- **Recém-nascidos de mães seropositivas**

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Seroconversão numa infecção pelo HIV-1

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Porque surgem "Problemas" no diagnóstico da Infecção pelo HIV

Serologia indeterminada

WB - ou persistentemente indeterminado:

- Reacções cruzadas
- Seroconversão

HIV1 p24

HIV2 p26

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Problemas no diagnóstico da Infecção pelo HIV

Causas para WB indeterminado
Reacções cruzadas

- Anticorpos para alguns antigénios leucocitários (HLA) que surgem após transfusões de sangue ou durante a gravidez
- Auto-anticorpos que se desenvolvem em algumas doenças reumatológicas
- Gamopatias
- Hiperbilirrubinémia
- Administração de gama-globulinas

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

MMWR 2003; vol. 52, nº 15

Advancing HIV Prevention: New Strategies for a Changing Epidemic

Quatro prioridades:

- Tornar o teste do HIV uma rotina
- Implementar novas formas de diagnóstico da infecção pelo HIV
- Prevenir novas infecções
- Diminuir a transmissão perinatal do HIV

http://www.cdc.gov/hiv/topics/prev_prog/AHP/AHP-Overview.htm

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

UNAIDS video “Believe it. Do it.” promotes plan to eliminate new HIV infections among children by 2015

01 July 2011

The public service announcement “Believe it. Do it.”, which was shown at the 2011 UN High Level Meeting on AIDS, helped launch a Global Plan that will make significant strides towards eliminating new HIV infections among children by 2015 and keeping their mothers alive.

Testes rápidos

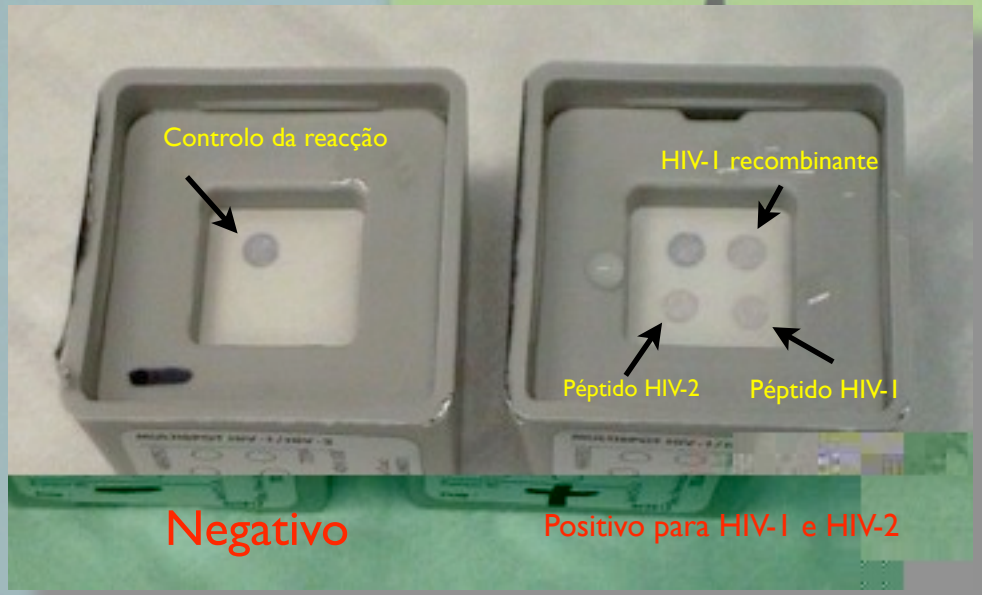
- Interesse prático:
- Rapidez na execução = Resultado conhecido na altura sem necessidade de uma nova visita/ consulta
- Maior acessibilidade ao teste = Detecção de maior número de indivíduos infectados

EUA: 30% dos indivíduos submetidos ao teste não vêm levantar as análises

Estimativa de indivíduos que o desconhecem: 180 000-280 000

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Exemplos de Testes rápidos



- OraQuick® Advance Rapid HIV-1/2 Antibody Test
- Reveal™ G-2 Rapid HIV-1 Antibody Test
- Uni-Gold Recombigen HIV® Test
- Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test

(99,9% sensibilidade e especificidade)

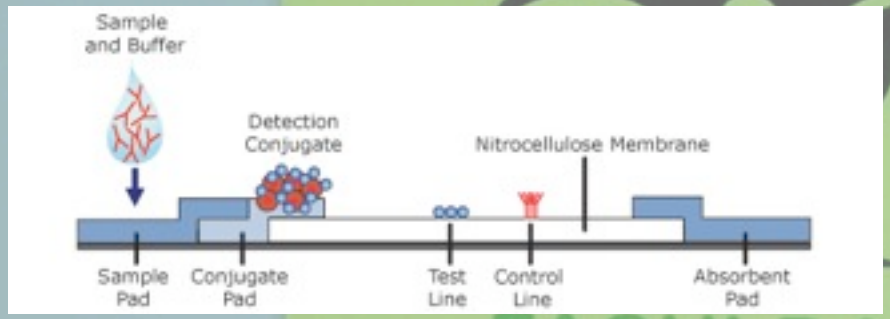
Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

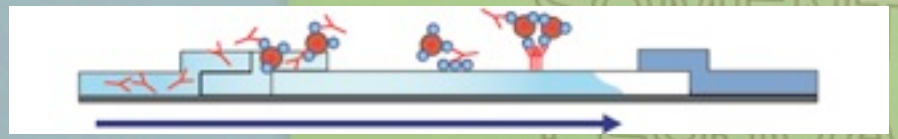
Execução de um método detecção de anticorpos anti-HIV *VIKIA*ª *HIV 1/2* (bioMèrieux - teste rápido)

- Teste imunocromatográfico: membrana de nitrocelulose impreganada com o conjugado (pétidos de síntese específicos: gp41 dos grupos M e O, do HIV1 e, gp36 do HIV2 ligdos a microesferas de poliestileno de cor azul) e uma linha de controlo;

- Migração dos complexos Ag-Ac por capilaridade ao longo da membrana e, a posterior fixação destes aos péptidos sintéticos fixos à membrana, formam a linha azul;

- A linha controlo da reacção deverá passar de azul a vermelho/rosa.



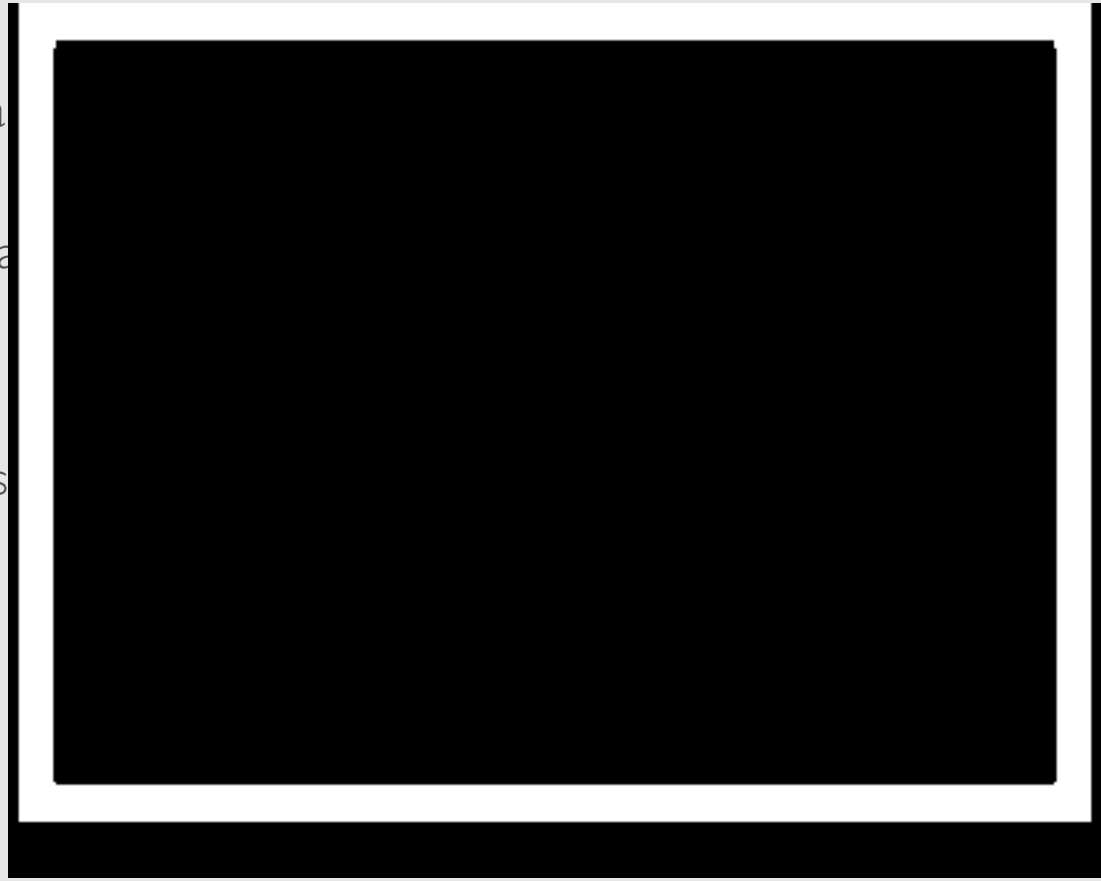


Fundamento

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Execução de um método detecção de anticorpos *HIV 1/2* - teste rápido , por um indivíduo seropositivo

- Material: retirar o dispositivo da saqueta usar extemporaneamente;
- colocar o dispositivo em superfície plana limpa; retirar a lanceta e desinfectar o dedo a ser picado;
- 3 gotas de sangue total para o poço-amostra, evitando a formaçao de bolhas de ar;
- leitura após/até 30 minutos;
- apontar o resultado;
- arrumar a bancada e retirar as luvas.



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Testes rápidos

Conclusões

Prós

- Sensibilidade e especificidade semelhantes aos testes imunoenzimáticos
- Rapidez na obtenção do resultado
- Facilidade de execução

Contras

- Possibilidade de existir resultados falsamente positivos antes de confirmação
- Nem todos detectam anticorpos para o HIV-2

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Diagnóstico da infecção: Algoritmo proposto

Sangue total
Testes de Rastreio
(plasma/soro)

+

Testes de Confirmação
W.B.

\+
critérios de positividade CDC:
Ac para 2 das glicoproteínas do gene <u>env</u>

\–
repetir ELISA

Diag. Directo
(plasma) (CMSP)

Agp24 cultura viral PCR

co-cultura:
CMSP de dadores sãos

–

Diag. Directo
(plasma) (CMSP)

Agp24 cultura viral PCR

co-cultura:
CMSP de dadores sãos

Indeterminado

Segunda Amostra
3 a 4 semans depois

Diag. Directo
(plasma) (CMSP)

Agp24 cultura viral PCR

co-cultura:
CMSP de dadores sãos

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Testes rápidos

Onde realizar os testes de Dectecção precoce do VIH (rastreio)

CONTACTOS 800 225 115

- Sobre a SIDA
- Sobre nós
- Boletim e newsletter
- Multimédia
- Como Ajudar
- Notícias
- Galeria Abraço
- Links

Apoios

CAD – Centros de Aconselhamento e Detecção

« voltar

Rede CAD
Os Centros de Aconselhamento e Detecção Precoce do VIH são centros de diagnóstico que permitem o acesso voluntário, confidencial e gratuito ao teste do VIH, possibilitando a detecção precoce da infecção VIH.

Se tem dúvidas sobre a possibilidade de estar infectado, diriga-se ao seu médico assistente ou a um Centro de Aconselhamento e Detecção do VIH da Rede Nacional de CAD.

Só há uma maneira de saber. Faça o Teste! www.sida.pt

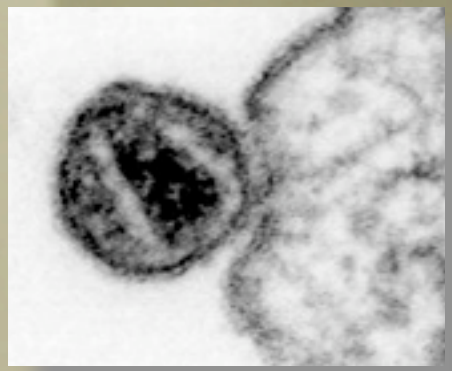
Métodos Directos: Detecção do Agp24

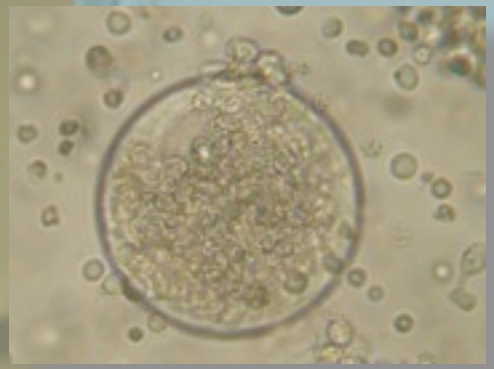
- Reacção imunoenzimática com leitura final colorimétrica ou fluorimétrica
- Quantificação da concentração
- Sensibilidade variável consoante a fase da infecção
- Útil nas infecções recentes e nas crianças filhas de mães seropositivas para o HIV

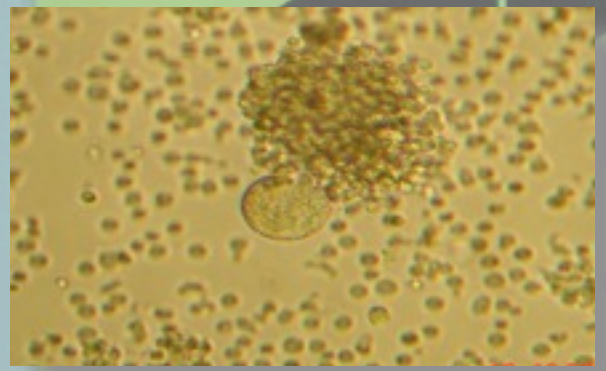
(dissociação dos imunocomplexos Ag-Ac com tampão Glicina pH=3)

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Métodos Directos: Isolamento do VIH







- Técnica de co-cultura das CMSP do doente com CMSP de um dador não infectado (1:3);
- Estimulação prévia com PhA (fitohemaglutinina - agente mitogénico);
- A co-cultura segue em meio completo contendo IL-2, durante cerca de 4 semanas;
- Sensibilidade variável ao longo da infecção.

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Métodos de diagnóstico/ monitorização do HIV usando técnicas de BM

- **PCR** (polymerase chain reaction): detecta (quantifica...) a presença de DNA proviral
- **RT-PCR**: detecta e quantifica a presença de RNA viral (associado à partícula viral)
- **NASBA**: detecta e quantifica a presença de RNA viral (associado à partícula viral)
- **b-DNA**: detecta e quantifica a presença de RNA viral (associado à partícula viral
- **Genotipagem**: epidemiologia molecular; sensibilidade dos métodos de diagnóstico/monitorização
- Identificação de estirpes resistentes: mutações associadas à não susceptibilidade aos fármacos anti-HIV

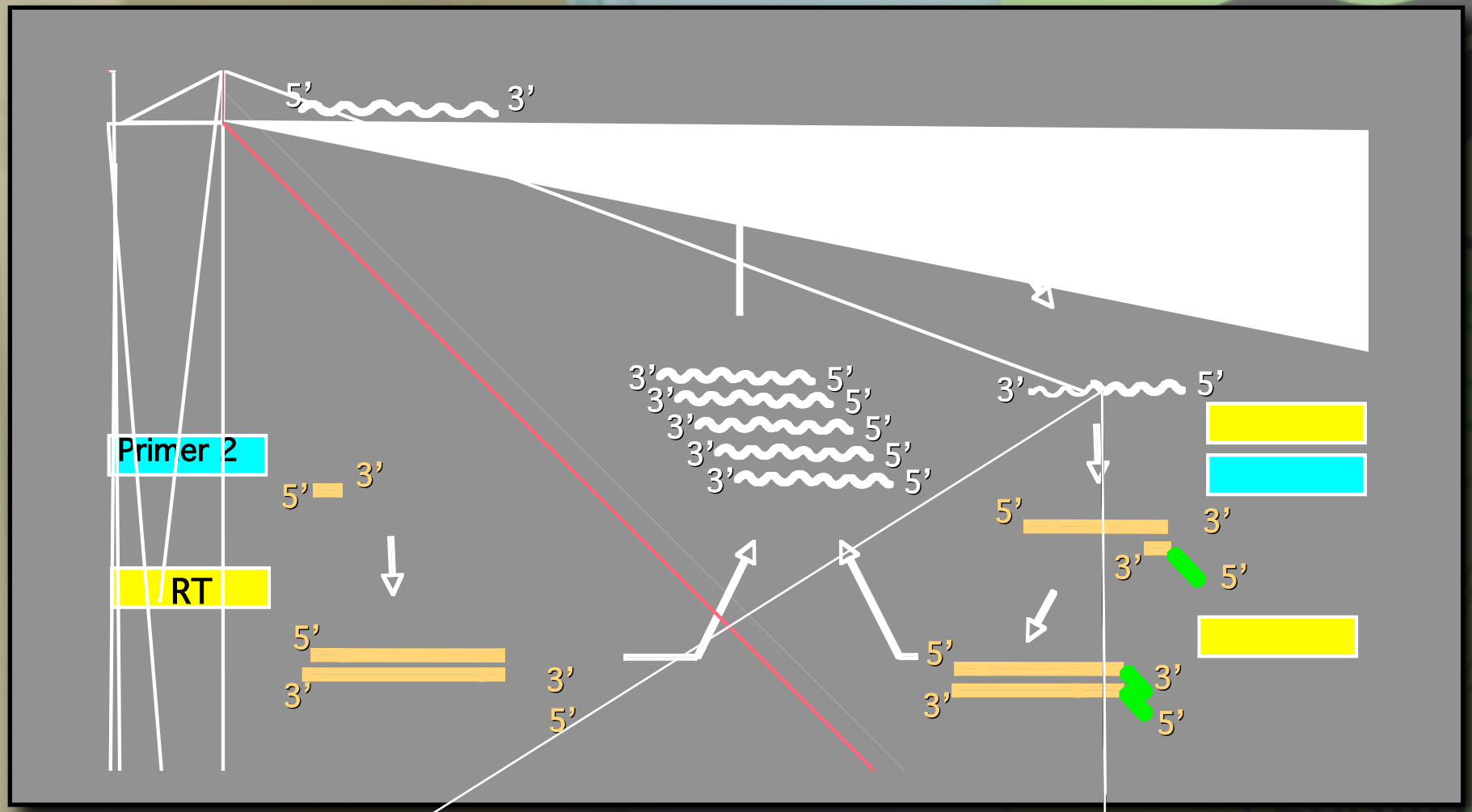
Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Quantificação do RNA viral

- Realizado no plasma; dá-nos a concentração de vírus no plasma
- Resultado em numero de cópias de RNA/mL de plasma
- Métodos:
- RT-PCR (ciclos de desnaturação, hibridação dos primers e elongamento)
- NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)
- bDNA (branched DNA)
  - Utilidade:
    - Na monitorização da eficiência da terapêutica e da evolução virológica da infecção (entrada em terapêutica)
    - Nas infecções primárias
    - Na transmissibilidade

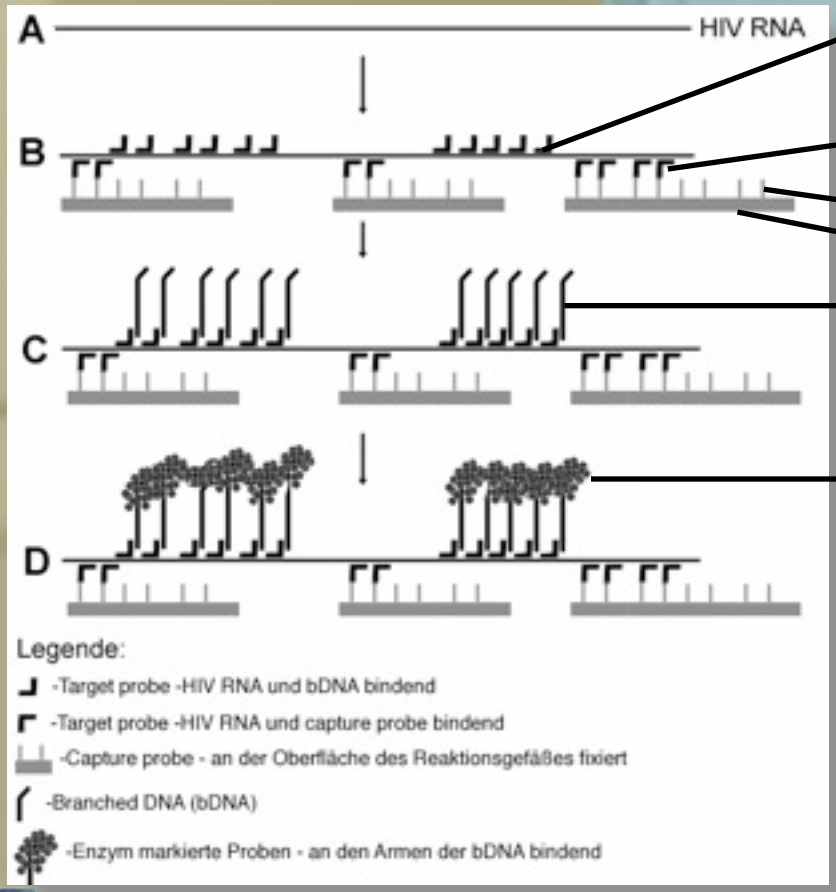
Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

NASBA



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

BRANCHED-DNA (B-DNA)



Sonda do RNA-alvo e do b-DNA

Sonda do RNA-alvo e da "sonda de captura"

Sonda de captura

b-DNA

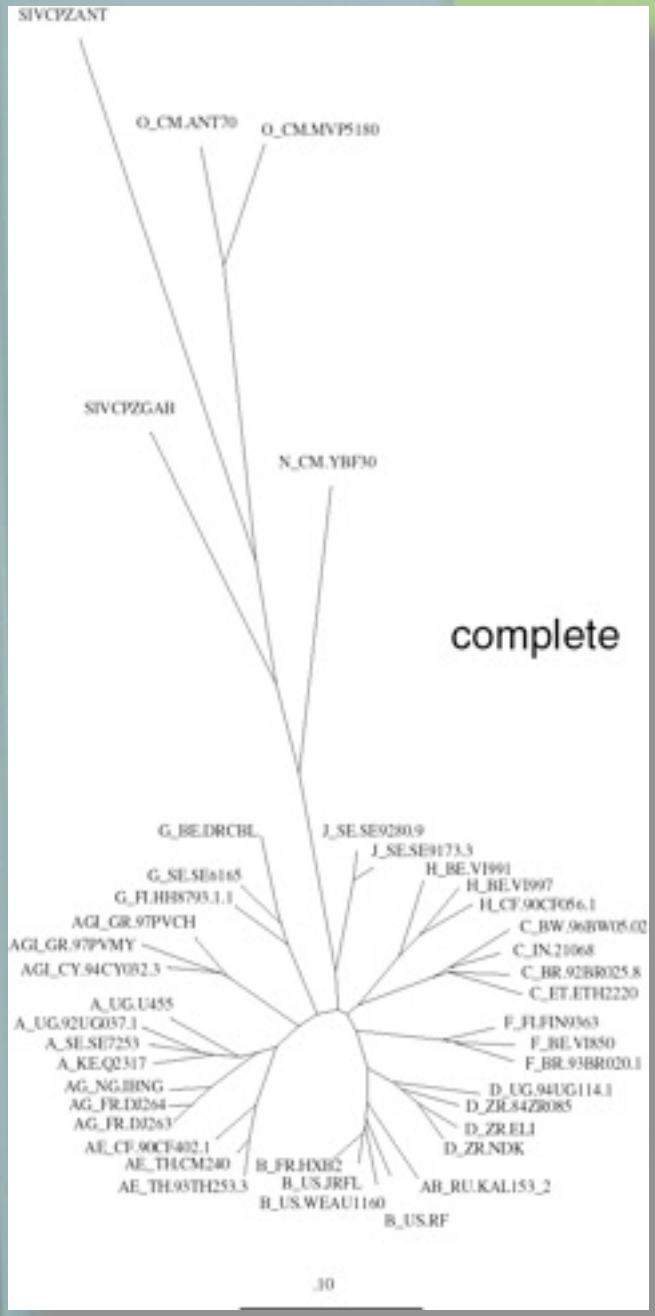
Fase sólida

Sonda do b-DNA marcada com enzima (fosfatase alcalina)

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

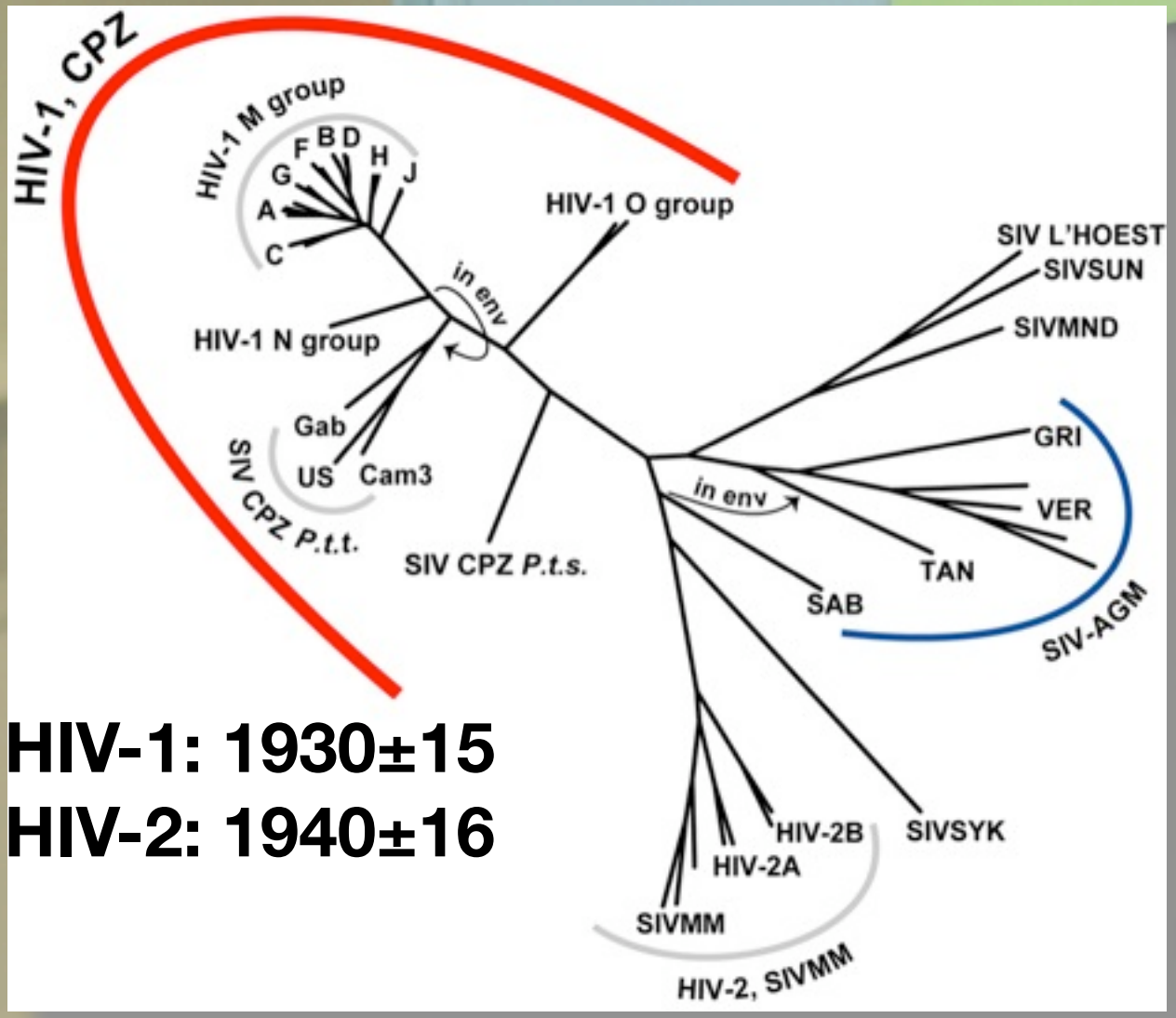
Genotipagem

Fonte: HIV
Sequence Database



Genotipagem

Aplicações da genotipagem



HIV-1: 1930±15

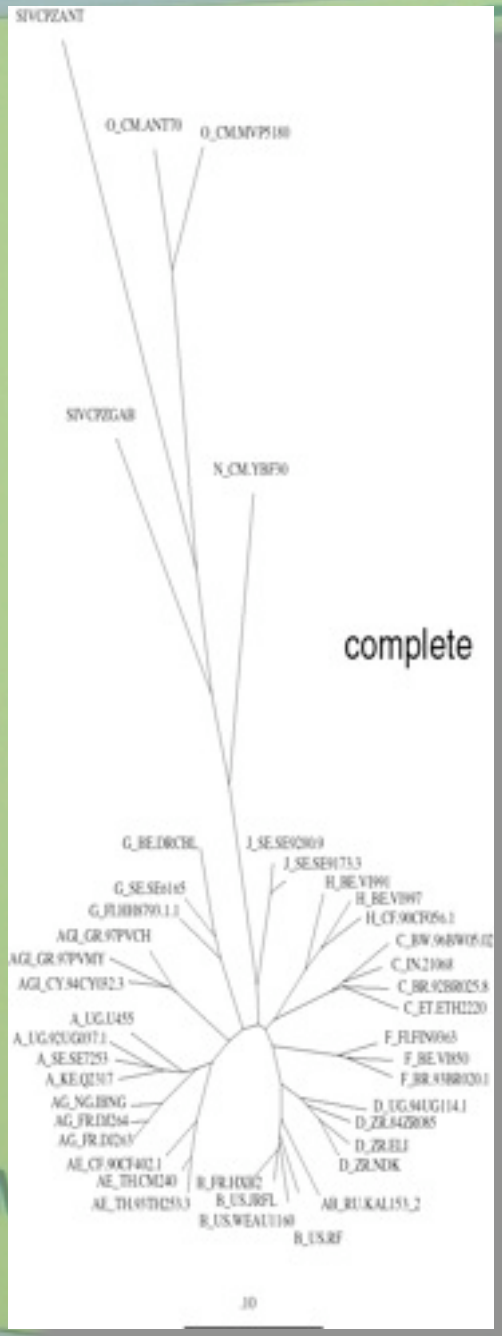
HIV-2: 1940±16

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Genotipagem

Aplicações da genotipagem

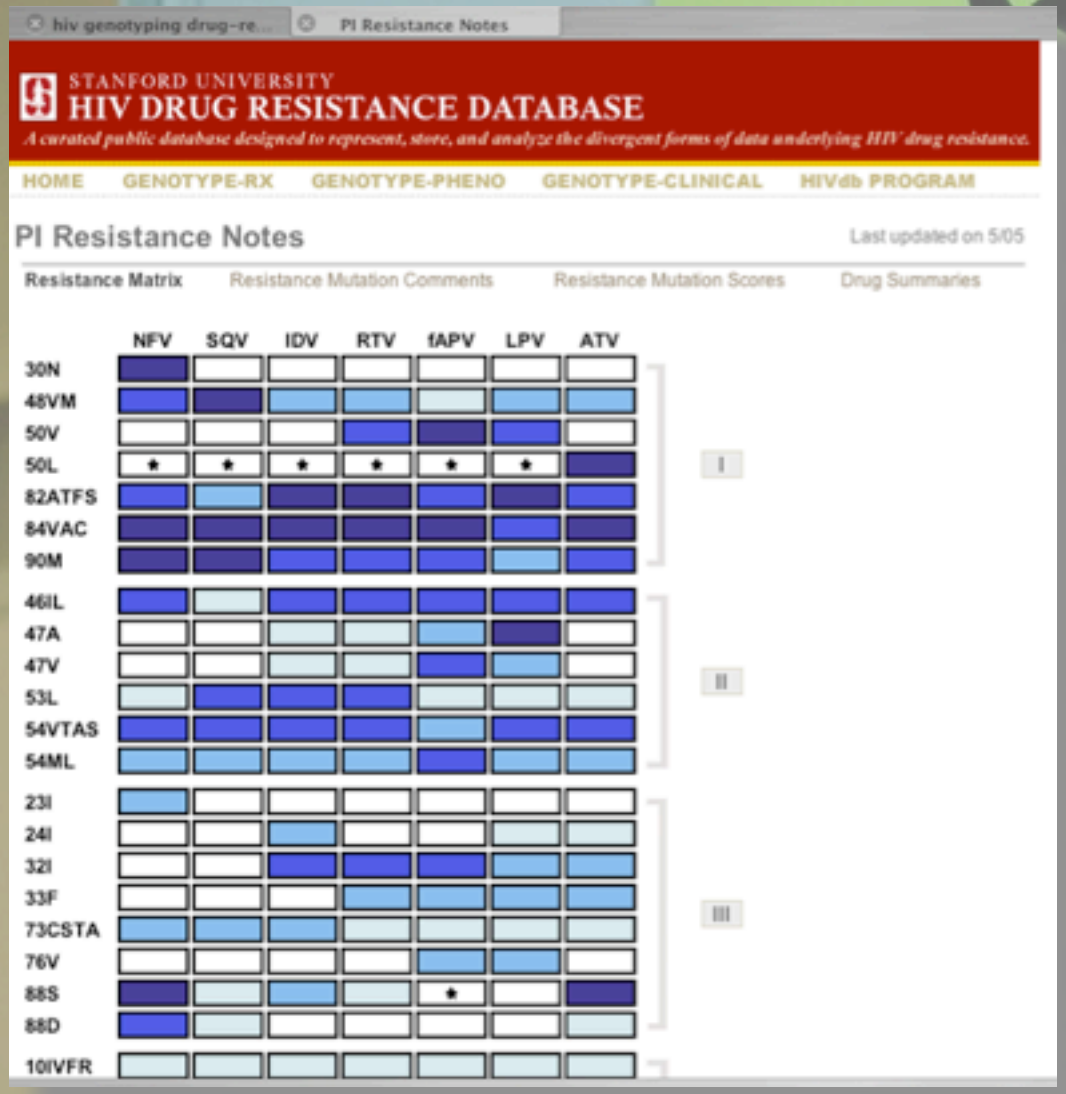
- Estudos de epidemiologia molecular
- Distribuição geográfica dos genótipos
- Sensibilidade de testes de rastreio ou de monitorização
- Sensibilidade aos fármacos anti-virais



Fonte: HIV Sequence Database

Genotipagem

Estirpes resistentes: ensaios genotípicos

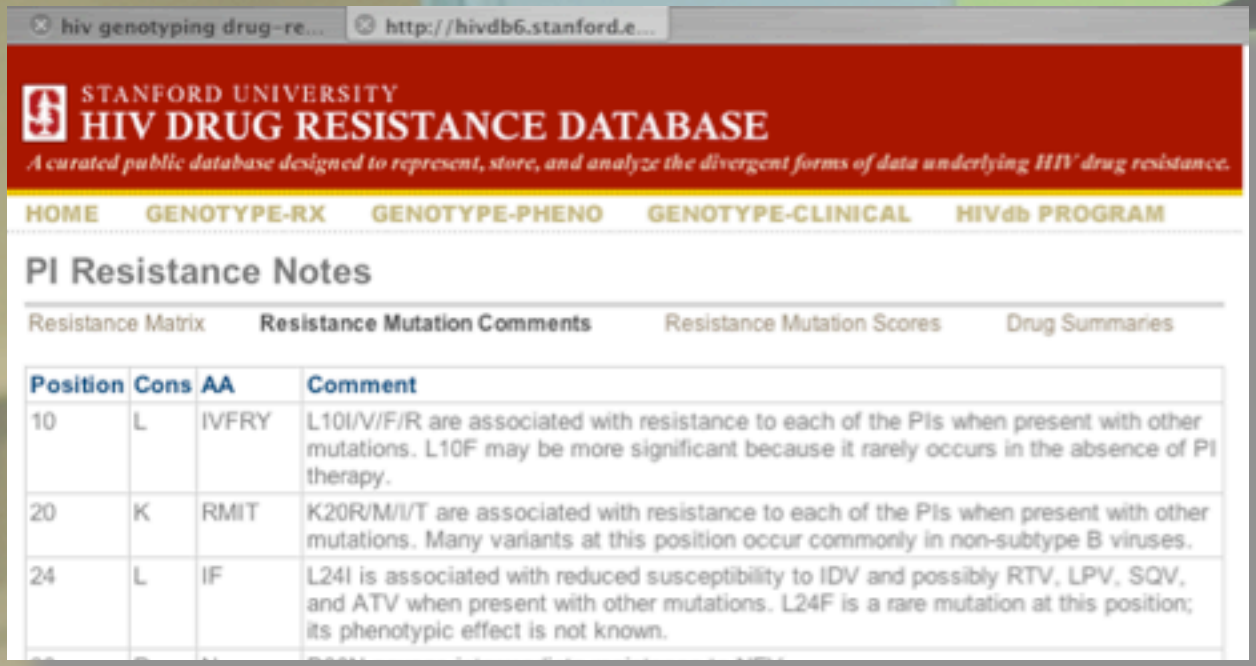


Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Genotipagem

Estirpes resistentes: ensaios genotípicos

http://hivdb.stanford.edu/pages/FAQ/FAQ.html



Position	Cons	AA	Comment
10	L	IVFRY	L10I/V/F/R are associated with resistance to each of the PIs when present with other mutations. L10F may be more significant because it rarely occurs in the absence of PI therapy.
20	K	RMIT	K20R/M/I/T are associated with resistance to each of the PIs when present with other mutations. Many variants at this position occur commonly in non-subtype B viruses.
24	L	IF	L24I is associated with reduced susceptibility to IDV and possibly RTV, LPV, SQV, and ATV when present with other mutations. L24F is a rare mutation at this position; its phenotypic effect is not known.

How does HIVDB indicate mutations?

Mutations are indicated by a shorthand consisting of the consensus B amino acid followed by the amino acid position followed by the amino acid detected in a sequence. For example, the **RT** mutation **T215Y indicates that the consensus amino acid is T (Thr; threonine) but that the mutation found in the sequence of interest is Y (Tyr; tyrosine).** The expression T215TY indicates that there is a mixture of viruses with the wildtype T and the mutation Y in the same sequence. Mixtures consisting of two amino acids at the same position in a sequence are common and generally represent true mixtures rather than sequence artifact (Shafer et al. 2001; Wang et al. 2007).

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Fenotipagem

Estirpes resistentes: ensaios Fenotípicos (antivirograma e tropismo)

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Fenotipagem

Determinação do Fenótipo Viral

- Capacidade de Formação de Sincícios
- Capacidade Replicativa
- Uso de diferentes correceptores - tropismo celular, transmissibilidade, patogénese, terapêutica (antagonistas do CoR CCR5)

O fenotipo viral correlaciona-se com a fase clínica!

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

O Laboratório de Virologia vs Clínica

Diagnóstico da Infecção

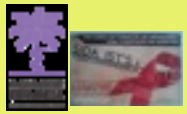
1. **Métodos de Diagnóstico**
   - Directos (Agp24, PCR e cultura)
   - Indirectos (serologia)
2. **Carga Viral**

Prognóstico da Evolução da Infecção

1. **Determinação do Fenótipo Viral**
   - Capacidade de formação de sincícios
   - Capacidade replicativa
   - Tropismo
2. **Carga Viral**

Evolução da Eficácia da Terapêutica

1. **Carga Viral**
2. **Aparecimento de Mutantes Resistentes**



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Algumas perguntas e espaço aberto a questões particulares.

1. *E se uma criança vos perguntar...*

    1. *"O bicho da sida" de Rui Zink e António João Gonçalves, com posfácio do Professor Kamal Mansinho, HEM.*

2. O que significa HIV/SIDA?

3. Quais as vias de transmissão do HIV?

4. Como não se transmite o HIV?

5. Um indivíduo seropositivo para HIV, pode ter relações sexuais não protegidas com a (o) sua (seu) parceira(o)?

6. Porquê?

7. Onde realizar o teste de detecção precoce?

8. Caso o teste de rastreio dê positivo, o que vazer?

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

Take care...

Take care

Take care

Take care

Take care

Tem coragem e sê grande:

"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim como em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."

Ricardo Reis (1887 - 1935?)

Take care

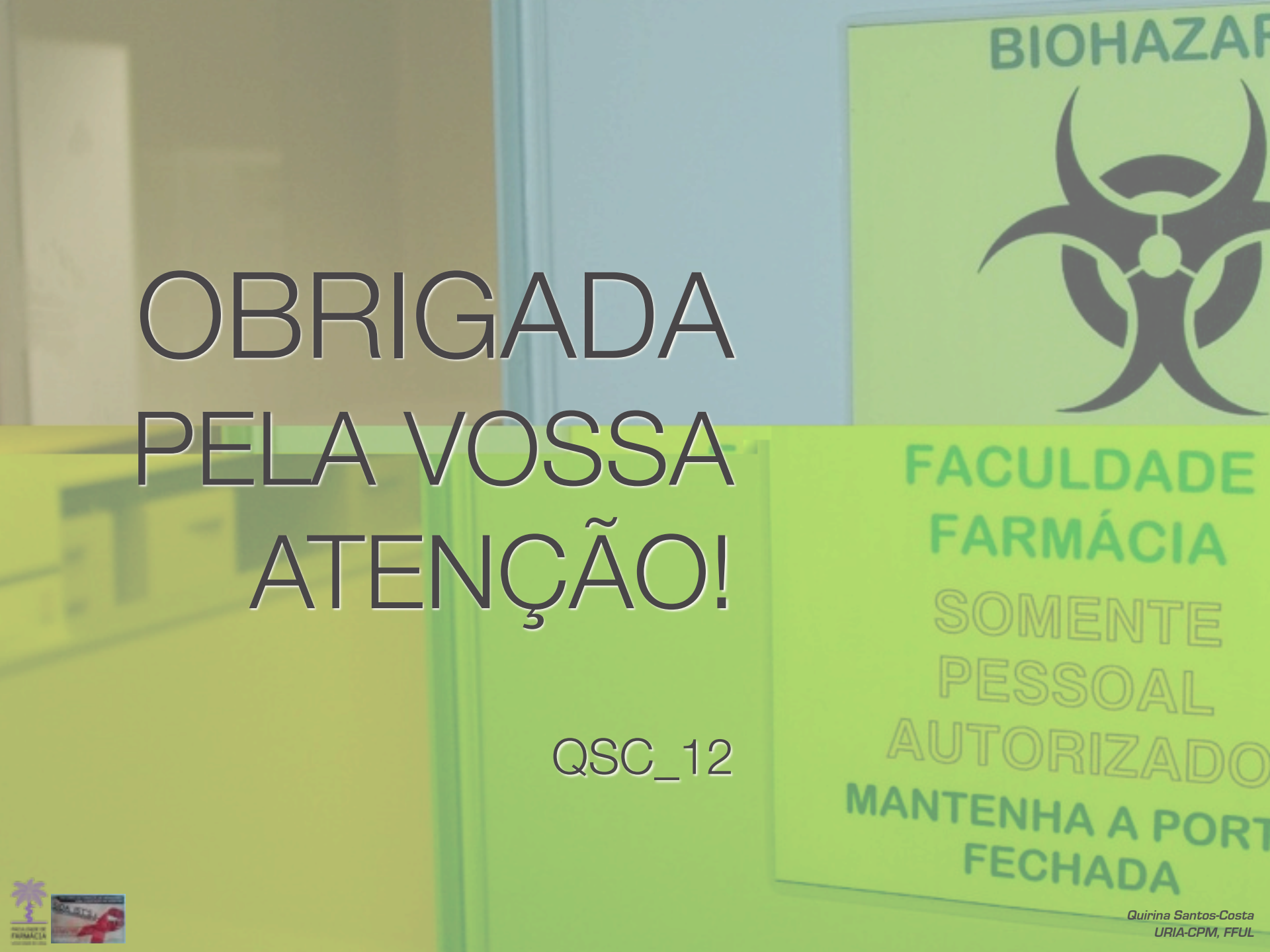
Take care

Take care, it's a jungle out there!

Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL

OBRIGADA PELA VOSSA ATENÇÃO!

QSC_12



Quirina Santos-Costa
URIA-CPM, FFUL