

**Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

Évelyn Helena Ascendino da Mata

**DESEMPENHO DE MÉTODOS UTILIZADOS NO
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV**

São Paulo

2019

Évelyn Helena Ascendino da Mata

**DESEMPENHO DE MÉTODOS UTILIZADOS NO
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz - Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientador: Me. Márcia Jorge Castejon

**São Paulo
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mata, Évelyn Helena Ascendino da
Desempenho de métodos utilizados no diagnóstico da
infecção pelo HIV/ Évelyn Helena Ascendino da Mata– São Paulo,
2019.

43 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância
Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São
Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Imunologia e Biologia Molecular
Aplicadas a Doenças de Saúde Pública
Orientação: Profa. Me. Márcia Jorge Castejon

1-HIV; 2-Sorodiagnóstico da AIDS; 3- Sorologia;
4-Teste Rápido; 5-População Vulnerável.

SES/CEFOR/IAL-30/2019

À minha mãe, Marise, que nunca me deixou desistir e sempre dedicou a vida pela felicidade de suas filhas. Ao meu pai, Paulo, que acordou de madrugada todos os dias para me levar até a estação de trem, “faça chuva ou faça sol”. À minha irmã, Ágatha, pela paciência e compreensão por todos os meus momentos de ausência. Ao meu noivo, Henrique, por ser meu porto seguro e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar e abençoar a minha vida todos os dias, e por me dar forças e discernimento nesta jornada, colocando momentos e pessoas maravilhosas em meu caminho;

À Marise, minha mãe, que luta todos os dias pela minha educação, chora as minhas lágrimas e sorri com as minhas alegrias. Obrigada mãe, essa vitória é nossa;

À minha irmã Ágatha e meu pai Paulo, pelo amor, carinho, paciência e ensinamentos que permeiam e estruturam a minha formação pessoal e profissional;

Ao Henrique, meu noivo, que esteve presente me incentivando em todos os momentos de conquistas e dificuldades da minha formação, por comemorar cada pequeno passo que eu dou, e por ser o meu melhor revisor científico, sempre me auxiliando com muito amor de todas as maneiras possíveis e impossíveis;

À Sassie (*in memorian*), minha filha de quatro patas, por me mostrar um amor incondicional de tamanha intensidade que possibilitou que ele se eternizasse dentro de mim, me dando forças para iniciar este curso;

Aos meus avós, Celso, Joaquina e Fausto (*in memorian*), que embora não tivessem conhecimento disto (do TCC) iluminaram meus pensamentos de maneira única. Em especial à minha avó, pelo orgulho que pude observar em seus olhos todas as vezes em que ela me observava colocar o meu jaleco;

À família do meu noivo por me acolherem de braços abertos e partilharem tantos momentos maravilhosos ao meu lado;

À minha orientadora, Márcia, por contribuir com minha trajetória acadêmica, fornecendo todo o suporte no pouco tempo que lhe coube, compartilhando seus conhecimentos e experiências de forma excepcional;

À Rosemeire, pesquisadora do Laboratório de HIV/Aids - IAL, que sempre acreditou em mim, por sua incrível sensibilidade, sempre contribuindo com os meus estudos e com meus sonhos;

Ao André, do Laboratório de HIV/Aids - IAL, por todos os ensinamentos passados, espero um dia chegar ao seu nível de sabedoria e humildade;

Ao Luís Brígido, Norberto e Gisele, do Centro de Virologia do IAL, pelo suporte técnico para a realização deste trabalho;

Aos membros do Projeto de Pesquisa “Epidemiologia Global do HIV e Pesquisa de Prevenção para Travestis e Mulheres Transexuais – Coorte Transnacional”, coordenado pela Dra. Maria Amélia de Sousa Mascena Veras da Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

À Adriana Vicentini, do Centro de Imunologia do IAL, por me ajudar nos momentos difíceis tornando-se uma verdadeira mãe para mim dentro do Instituto, cujos doces caseiros foram fonte de energia para o desenvolvimento deste estudo;

Ao professor Carlos Menck, da Universidade de São Paulo, pela presença marcante em minha vida acadêmica, a quem eu agradeço pelas lições de humildade e amor ao próximo que me motivaram na minha caminhada profissional;

À Cristiane, Elaine, Leyva e Gisele, pela admirável coordenação/supervisão humanizada deste Programa, sempre abertas para ouvir, aconselhar e respeitar as opiniões dos estudantes;

Às amigas de curso, Marina, Mayrine, Maysa, Viviane, Verônica e Angélica, por compartilharem risadas, lágrimas e momentos de descontração nesta etapa tão desafiadora de nossas vidas. Agradeço também a Thamires (*in memoriam*), pessoa com o melhor coração que já conheci, cujos ensinamentos e conversas ficarão guardados para sempre em meu coração.

“Não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A realização de testes diagnósticos de HIV consiste no primeiro passo para identificar indivíduos infectados para a assistência e cuidados, sendo sua acurácia elemento chave neste processo de Vigilância em Saúde. A identificação laboratorial da infecção pelo HIV baseia-se principalmente na detecção de anticorpos específicos em amostras biológicas coletadas de pacientes e/ou de indivíduos com comportamento de risco em adquirir esta infecção. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a comparabilidade do resultado de testes rápidos (TR) utilizados para o diagnóstico de HIV em relação a testes laboratoriais convencionais em amostras de sangue de população de travestis e mulheres transexuais da cidade de São Paulo, provenientes de um estudo de coorte transnacional entre Brasil e Estados Unidos. No Centro de Referência e Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis/Aids, 1.141 amostras de sangue foram avaliadas nos TR, e, posteriormente, foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) para a realização dos testes laboratoriais convencionais (ensaio de quimioluminescência, imunoblot rápido e teste molecular), no período de setembro a dezembro de 2018. As 230 amostras com resultado reagente no TR HIV apresentaram-se também positivas nos ensaios laboratoriais convencionais. No entanto, das 911 amostras com resultado de TR não reagente, três (0,3%) apresentaram-se reagentes nos testes convencionais para HIV. Dessa forma, o estudo mostrou elevada concordância entre testes rápidos e convencionais, apresentando algumas limitações do método único do TR, em função de falha técnica ou humana.

Palavras-chave: HIV, sorodiagnóstico da AIDS, sorologia, população vulnerável, teste rápido

ABSTRACT

Performing HIV diagnostic testing is the first step to identifying infected persons for assistance and care, become the accuracy a key element in this process of Health Surveillance. Identification of HIV infection by laboratory tests is based mainly on detection of specific antibodies in biological samples collected from patients and/or individuals with behavior that put them at risk of acquiring this infection. The main objective of this study is to evaluate the comparability of the results with Rapid Tests (RT) used for HIV diagnosis in relation to conventional laboratorial tests in blood samples from a population of transvestites and transgender women of São Paulo city, from a cross-national cohort study between Brazil and the United States. At the Centro de Referência e Tratamento de DST/Aids, 1,141 blood samples evaluated in the RT were submitted to Instituto Adolfo Lutz (IAL) for evaluation by conventional laboratory tests (chemiluminescent immunoassay, rapid immunoblot assay and molecular test), from September to December 2018. In 230 samples with HIV reactive results in RT, all samples also showed reactivity in conventional laboratory tests. However, of the 911 samples with non-reactive results in RT, three (0.3%) were HIV positive in the conventional laboratory tests. Therefore, the study showed high agreement of the results of the rapid test for HIV with those established in laboratories, indicating some limitations of the RT single-step method, due to technical or human failures.

Keywords: AIDS Serodiagnosis, serology, HIV, rapid test, vulnerable population

LISTA DE FIGURAS

- Quadro** – Genes do HIV e suas respectivas proteínas codificadas.....pág 18
- Figura 1** – Representação esquemática do HIV-1 com suas principais proteínas.....pág 18
- Figura 2** – Progressão da infecção pelo HIV.....pág 20
- Figura 3** – Marcadores da infecção pelo HIV na corrente sanguínea e seu período de acordo com as semanas de infecção.....pág 21
- Figura 4** – Fluxograma 6 para a testagem da infecção pelo HIV.....pág 29
- Figura 5** – Resultados das amostras obtidos nos ensaios TR, CHIV, IBR e CV para HIV....pág 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conclusão do diagnóstico laboratorial da infecção por HIV/Aids por meio de TR e de testes convencionais.....pág 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHIV	Ensaio HIV Ag/Ab Combinado
CIM-IAL	Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz
CLIA	Ensaio Imunológico Quimioluminescente
CQI	Controle de Qualidade Interno
CRT DST/ Aids	Centro de Referência e Tratamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis/Aids
CV	Carga Viral
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPP	Plataforma de Duplo Percurso
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> /Ensaio Imunoenzimático
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homens que fazem Sexo com Homens
HTLV	Vírus Linfotrópico de células T Humanas
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IB	<i>Imunoblot</i>
IBR	<i>Imunoblot</i> Rápido
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
κ	Índice <i>Kappa</i>
MS	Ministério da Saúde
RDS	<i>Respondent Driven Sampling</i> /Amostragem dirigida pelo participante
RNA	Ácido Ribonucléico
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
TM	Teste Molecular
TARV	Terapia Antirretroviral
TR	Teste Rápido (<i>Point of care</i>)
UDI	Usuários de Drogas Injetáveis
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
WB	<i>Western blot</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Histórico	15
3.2 Estrutura viral	17
3.3 Transmissão e Patogênese.....	18
3.4 Diagnóstico	20
3.4.1 Testes de Triagem	22
3.4.2 Testes Confirmatórios.....	23
3.5 Controle de Qualidade	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 Casuística.....	25
4.1.1 <i>Respondent Driven Sampling</i> (RDS)	25
4.1.2 Critério de inclusão utilizado no Estudo Transnacional	26
4.2 Obtenção das amostras	26
4.2.1 Confidencialidade.....	27
4.3 Diagnóstico da Infecção pelo HIV.....	27
4.3.1 Fluxograma 1 - CRT DST/Aids.....	27
4.3.2 Fluxograma 6 - Laboratório de HIV/Aids CIM-IAL.....	28
4.4 Análise estatística dos resultados.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Mesmo após 30 anos do início da epidemia da aids, a infecção pelo HIV permanece crescente em algumas regiões do mundo. Em 2017, dados obtidos do Programa das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) mostram que 36,9 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo HIV, das quais 1,8 milhões foram infectadas apenas no último ano (2017). No Brasil foram registrados 860.000 casos de pessoas vivendo com HIV e 48.000 (35.000 - 63.000) novos casos de infecção (indivíduos recém-infectados)¹.

Neste cenário, pode-se notar que a epidemia de HIV/aids continua sendo um importante problema de saúde pública, apesar dos recentes avanços alcançados em diferentes países, sobretudo em relação às estratégias de prevenção e tratamento. Estima-se a prevalência da infecção pelo HIV no Brasil entre 0,4 e 0,5% na população adulta; a epidemia é predominantemente de transmissão sexual e está concentrada em populações vulneráveis com alto risco de exposição ao HIV (populações-chave), incluindo usuários de drogas injetáveis (UDI), trabalhadoras do sexo e, principalmente, HSH (prevalência estimada: 15,4%) e transexuais^{2, 3,4}.

Estudos indicam que mulheres transexuais possuem 49 vezes mais chances de serem infectadas se comparadas com a população em geral, demonstrando, dessa forma, uma probabilidade maior do que para qualquer outra população de risco^{3,5}. No Brasil, dados de vigilância são coletados com o auxílio de sistemas de informação em saúde, porém dados para mulheres transexuais são combinados com travestis e HSH⁶. Essa generalização impede o conhecimento sobre o verdadeiro risco de adquirir HIV enfrentado por esse grupo, prejudicando, dessa forma a implementação de ações pelas diferentes esferas do governo.

Especificamente para populações de risco, o diagnóstico precoce é a principal ferramenta para a adequada cascata de cuidados aos indivíduos infectados, além de contribuir com a prevenção de novas transmissões correlacionadas no tempo e no espaço⁷. Para a realização do diagnóstico laboratorial, os ensaios sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo HIV devem ser realizados em conformidade com as recomendações do Ministério da Saúde (MS), por meio da Portaria N° 29, de 17 de dezembro de 2013, que aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV^{8,9}. O manual estabelece uma padronização na sequência dos ensaios utilizados para o diagnóstico do HIV, criando assim diferentes fluxogramas que devem ser

seguidos de acordo com a realidade local dos serviços de saúde, podendo ser laboratórios (métodos laboratoriais convencionais) ou locais onde a infraestrutura laboratorial não está acessível, utilizando, nestes casos, testes rápidos (*point of care*) para HIV. Estes últimos possuem destaque por permitirem a detecção de anticorpos anti-HIV em menos de 30 minutos, serem de fácil execução e utilizarem pequeno volume de amostra¹⁰.

Estudos realizados com populações-chave revelam que estes indivíduos preferem a testagem rápida se comparada à sorologia convencional, por ser mais conveniente, confortável e menos estressante. Quando os testes rápidos (TR) estão disponíveis, os indivíduos são avaliados com maior frequência, constituindo uma ferramenta importante na ampliação do acesso ao diagnóstico e no acompanhamento sorológico dos indivíduos, impactando diretamente na mortalidade e transmissão da doença^{11,12}.

Em contrapartida, alguns pesquisadores destacam a baixa sensibilidade de alguns TR frente a infecções recentes, podendo levar a resultados falso-negativos que colocam em risco a saúde do indivíduo e levam ao aumento da transmissão do HIV, trazendo prejuízos à saúde pública¹³. Dessa forma, é importante que os algoritmos de testagem para o HIV, baseados na detecção de anticorpos específicos, sejam constantemente avaliados quanto ao seu desempenho, tendo em vista que a qualidade dos resultados pode ser influenciada por diferentes fatores, entre estes: erros sistemáticos e aleatórios intrínsecos aos ensaios¹⁴, e/ou fatores biológicos do hospedeiro e do agente, como a diversidade viral e as terapias antirretrovirais (TARV)^{9,15}.

À vista disso, esta pesquisa buscou avaliar e comparar o desempenho analítico das metodologias propostas pelo MS por meio de fluxogramas para o diagnóstico da infecção por HIV/aids em amostras de população de alto risco. Conseqüentemente, verificou-se a qualidade dos kits de reagentes diagnósticos empregados no Projeto de Pesquisa CTC 41-K/2018, como também, os utilizados na rotina laboratorial do Laboratório de HIV/Aids do Centro de Imunologia do IAL (CIM-IAL).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho de metodologias rápida e convencional utilizadas no diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV em amostras de sangue de população de alto risco (travestis e mulheres transexuais) na cidade de São Paulo, provenientes do “Estudo de Coorte Transnacional - Epidemiologia global do HIV e pesquisa de prevenção para travestis e mulheres transexuais”.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaios laboratoriais convencionais (imunoensaio quimioluminescente e ensaio de imunoblot rápido para HIV) em amostras de soro encaminhadas ao IAL com resultados reagente e não reagente no TR;
- Buscar elucidação dos casos interpretados na sorologia convencional como "indeterminados para HIV" solicitando a realização de teste molecular;
- Verificar a concordância entre os resultados laboratoriais convencionais e os resultados provenientes dos TR;
- Verificar a qualidade dos kits de reagentes diagnósticos utilizados no estudo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Histórico

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids), é responsável por uma epidemia que perdura por mais de 30 anos. Estima-se que as primeiras infecções ocorreram em seres humanos por volta de 1931 (1915-1941), sendo o HIV originário do vírus da imunodeficiência símia (SIV)¹⁶. Apenas na década de 1980 a epidemia passou a adquirir importância, a partir da identificação de um número crescente de infecções incomuns observadas em pacientes homossexuais do sexo masculino (como pneumonia por *Pneumocystis carinii*, sarcoma de *Kaposi* entre outras), com o comprometimento do sistema imune. Concluiu-se, na época, que se tratava de uma nova doença transmissível de origem desconhecida e infecciosa¹⁷.

Em 1983, o HIV foi isolado pela primeira vez pelo grupo de pesquisadores liderados por Luc Montaigner do Instituto Pasteur, na França, onde recebeu a denominação de LAV (vírus associado à linfadenopatia) por ter sido obtido de um paciente com quadro de linfadenopatia crônica¹⁸. Neste mesmo período, a identificação do vírus foi confirmada pela equipe do Dr. Robert Gallo, no Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, que o isolou de um paciente com sinais característicos de aids, identificando-o como HTLV-III (vírus linfotrópico de células T Humanas - III), devido ao vírus apresentar alguns aspectos semelhantes ao HTLV, como o tropismo por linfócitos T¹⁹.

Em 1985 estudos de sequenciamento realizados pelo grupo de pesquisa de Robert Gallo permitiram concluir que ambos os vírus se tratavam de variantes da mesma espécie, contribuindo para que o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus eliminasse a multiplicidade de nomes e adotasse “HIV” para o então agente causador da aids^{17,20,21}.

No mesmo ano foi desenvolvido o primeiro teste diagnóstico para a detecção de anticorpos anti-HIV, baseado na captura de IgG (imunoglobulina G) humana de pacientes infectados por meio de ensaio imunoenzimático *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que utilizava lisado viral de HIV-1 como fonte de antígenos (ensaios de primeira geração). Estes ensaios foram utilizados como triagem diagnóstica, inicialmente, nos serviços de hemoterapia e, posteriormente, aplicados como método diagnóstico laboratorial para indivíduos de alto risco para infecção do HIV-1. A janela diagnóstica deste tipo de ensaio era de aproximadamente doze

semanas após o contato viral, porém problemas relacionados à alta sensibilidade dos testes levaram a um grande número de resultados falso-positivos, sendo necessária a aplicação de testes confirmatórios mais específicos, como a técnica de *Western blot* (WB) e o ensaio de Imunofluorescência indireta²².

Em 1986, na África Ocidental, ocorreu o isolamento do HIV-2, vírus este que não foi detectado pelos ensaios de primeira geração por apresentar glicoproteínas de envelope diferentes do HIV-1, sendo necessário o desenvolvimento de novos testes que possibilitassem revelar a presença de ambos os tipos de vírus^{17,22}. Dessa forma, em 1987, foram desenvolvidos os ensaios de segunda geração, empregando-se antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos do HIV, melhorando a especificidade do teste, o valor preditivo positivo e diminuindo o período de janela diagnóstica de quatro a seis semanas após a infecção. A possibilidade de adicionar antígenos do HIV-2, juntamente com os de HIV-1, permitiu a detecção de anticorpos para ambos os tipos de vírus, tornando necessário, a partir desta época, o uso de testes confirmatórios também para o HIV-2^{9,22,23}.

No começo dos anos 90, foram desenvolvidos os ensaios de terceira geração. Estes, além de utilizarem antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos como fonte de antígenos, detectavam anticorpos das classes IgM (imunoglobulina M) e IgG. Desse modo, a sensibilidade do teste foi aumentada enquanto a especificidade foi mantida, levando à uma notável diminuição da janela diagnóstica para três semanas após a infecção^{22,23}.

No final da década de 90, a evolução tecnológica permitiu o desenvolvimento de ensaios de quarta geração, que detectavam, simultaneamente, a presença do antígeno viral p24 e de anticorpos anti-HIV, aumentando, dessa forma, a sensibilidade dos testes, e levando à diminuição da janela diagnóstica para apenas duas semanas após a infecção. Com isso, possibilitou-se à detecção de todas as classes de anticorpos e a fonte de antígenos permaneceu como peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes. Embora haja diminuição da janela diagnóstica, este tipo de ensaio não diferencia se a positividade detectada é em função da presença de antígenos p24 ou de anticorpos anti-HIV, impossibilitando, dessa maneira, determinar a fase da infecção em que o indivíduo se encontra^{9,22}.

3.2 Estrutura viral

Análises filogenéticas indicam que o surgimento do HIV ocorreu a partir de variações genéticas do SIV, que infecta macacos. Assim como SIV, o HIV é um vírus RNA (ácido ribonucléico) que possui um longo período de incubação, pertencendo à família Retroviridae, gênero Lentivirus, compreendendo os tipos HIV-1 e HIV-2²⁴.

O genoma do HIV é composto por duas fitas simples de RNA, responsáveis por codificar 16 proteínas essenciais para o ciclo de vida viral. Os três genes principais, *gag*, *pol* e *env*, codificam proteínas estruturais, enzimas e proteínas de envelope, com importantes aplicações no diagnóstico, enquanto as proteínas regulatórias e as acessórias são codificadas por outros genes menores (Quadro)²³. O genoma viral é encapsulado por uma camada proteica (capsídeo), seguido de um envelope externo estruturado em uma bicamada fosfolipídica, medindo de 100 a 120nm de diâmetro (Figura 1)^{9,24,25}. O HIV-1 e o HIV-2 compartilham muitas semelhanças, incluindo a disposição básica de genes (morfologicamente indistinguíveis), modos de transmissão, mecanismos de replicação intracelular e consequências clínicas - aids. Cerca de 30% da variabilidade genética, localizada majoritariamente em genes de envelope, separam os dois vírus, possivelmente em função de suas diferentes origens filogenéticas^{24,26,27}.

Ainda, em função da alta taxa de erros no momento da replicação, HIV-2 é classificado em oito grupos: A, B, C, D, E, F, G, H²⁸; enquanto HIV-1 é classificado em 4 grupos, variando geneticamente 15-20% entre si²⁶: M (Major), N (Nonmajor/ Nonoutlier), O (Outlier) e o novo grupo P (isolado em pacientes da África Central - Cameroon)²⁹. A maior parte das infecções ocorre pelo grupo M do HIV-1, em que as diferenças encontradas, principalmente nos genes *pol*, *gag* e *vif*, diferenciam-no ainda em nove subtipos (A-D, F-H e J-K), além de formas recombinantes (CRFs) desses subtipos também serem encontradas^{28,30,31}.

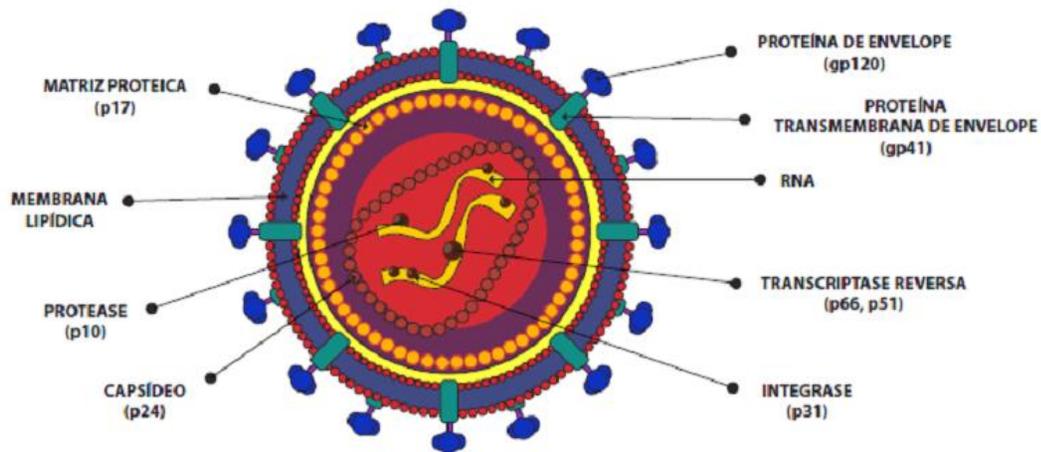
Quadro. Genes do HIV e suas respectivas proteínas codificadas

Gene	Proteína codificada	Peso molecular (kDa)
<i>gag</i>	Precursor Capsídeo Matriz	p55/ p56 p24/ p26 p17/p16
<i>Pol</i>	Transcriptase reversa Transcriptase reversa Integrase Protease	p66/ p68 p51/ p53 p31/p34 p10
<i>Env</i>	Precursor Glicoproteína externa Glicoproteína transmembranar	gp160/ gp140 gp120/ gp105/125 gp41/gp36
<i>Vif</i>	Fator de Infectividade viral	p23
<i>vpu</i>	Proteína viral “U”	p16
<i>vpx</i>	Proteína viral “X”	p16
<i>vpr</i>	Proteína viral “R”	p12/p10
<i>tat</i>	Ativador Transcricional	p16/p14
<i>rev</i>	Regulador da expressão viral	p19
<i>nef</i>	Fator de regulação negativa	p27/p35

Principais proteínas do HIV com importância diagnóstica.

Fonte: adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018⁹.

Figura 1. Representação esquemática do HIV-1 com suas principais proteínas



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018⁹.

3.3 Transmissão e Patogênese

As principais formas de infecção pelo HIV ocorrem por meio das mucosas do trato genital ou retal durante a relação sexual (secreções/fluidos). Os fluidos e secreções que podem conter o agente infeccioso são: sangue, sêmen, fluido pré-seminal, fluido retal ou fluido vaginal. Além da

transmissão sexual, outras formas de contágio do vírus podem ser descritas: sanguínea (compartilhamento de agulhas e seringas, transfusão de sangue e de hemocomponentes), vertical (passagem do vírus de mãe para filho durante a gestação/parto ou via aleitamento materno) e ocupacional (acidente de trabalho em profissionais da área da saúde)^{9,32}.

Uma vez no organismo, o HIV interage com células que expressam a molécula CD4 (*cluster of differentiation 4*) na sua superfície (como células T *helper*, macrófagos e células dendríticas) através da ligação à proteína gp120. Esta interação resulta em uma alteração conformacional que permite uma nova ligação da gp120 à moléculas conhecidas como correceptoras, importantes para classificar o vírus em três variantes de importância terapêutica: M-trópico (R5) quando se liga à molécula correceptora CCR5; T-trópico (X4) quando se liga à CXCR4, ou duplo-trópico (R5X4) quando usa ambos correceptores para permitir a entrada do seu capsídeo viral^{24,33}. Após o contato do vírus com a célula, ocorre fusão das membranas e liberação do conteúdo do capsídeo viral no citoplasma celular, onde ocorre a transcrição reversa do seu material genético (RNA) por intermédio da enzima transcriptase reversa. O novo DNA proviral recém sintetizado é inserido aleatoriamente no genoma, por ação da enzima integrase, permitindo que o vírus seja traduzido pelo maquinário celular e dê origem à novas partículas virais. O tempo da ligação ao CD4 até a liberação de novos vírus é de aproximadamente 24 horas²⁴.

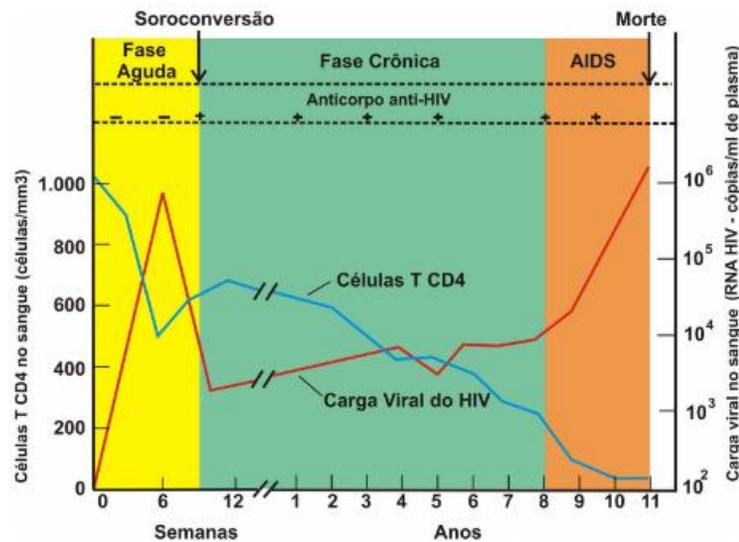
A amplificação da infecção é induzida pela resposta imunológica inata, que atrai maior quantidade de linfócitos T para o local de infecção e, através da recirculação linfocitária, contribui para a disseminação sistêmica do vírus, cooperando, dessa forma, para a alta viremia plasmática (período altamente infectante)^{9,34}. Clinicamente, esta primeira fase é conhecida como infecção aguda e pode durar até quatro semanas, quando começam a ser produzidos os primeiros anticorpos^{35,36}.

À fase de infecção aguda segue-se a fase de latência clínica. Nesse período, o número crescente de linfócitos T CD8⁺ exerce um controle parcial da infecção, permitindo que os pacientes permaneçam anos nesta fase, ou até mesmo décadas se fizerem o uso de TARV. Por outro lado, a falta de tratamento propicia o aumento da viremia plasmática (ou carga viral - CV) acompanhada da diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ no sangue, permitindo o reaparecimento de sintomas (fase sintomática) (Figura 2)^{9,35,36}.

A última fase clínica, definida como aids, é evidenciada com o surgimento de neoplasias e infecções oportunistas, indicando grave comprometimento do sistema imunológico. Nesta fase, a

contagem de linfócitos T CD4⁺ encontra-se abaixo de 350 células/mm³, ocorre o aumento da incidência de infecções oportunistas, causando impacto drástico na expectativa de vida do indivíduo^{35,36}.

Figura 2. Progressão da infecção pelo HIV



Fonte: Ribeiro, 2006⁶⁰.

3.4 Diagnóstico

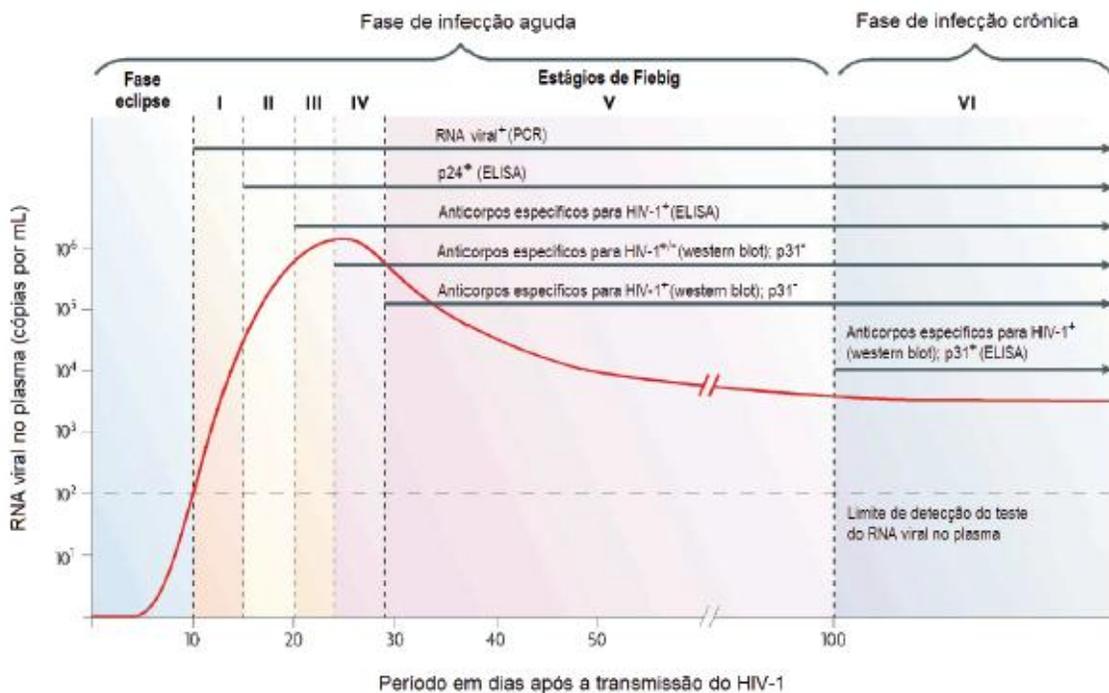
A compreensão da patogênese da infecção pelo HIV é de extrema importância para o estabelecimento de um diagnóstico eficaz. Vários marcadores imunológicos e virológicos podem ser monitorados durante o curso da infecção pelo HIV, sendo estes altamente consistentes entre os diferentes indivíduos⁹. Fiebig *et al* (2003)³⁷, estudando doadores de plasma, estabeleceram a dinâmica da viremia e dos anticorpos anti-HIV, criando um sistema de estadiamento laboratorial que permite classificar as fases da infecção com o objetivo de identificar os melhores métodos diagnósticos laboratoriais a serem utilizados (Figura 3). Em ordem cronológica, os estágios laboratoriais são:

- Estágio I: apenas ensaio de RNA positivo;
- Estágio II: ensaios de RNA e antígeno p24 de HIV-1 positivos. Ensaio de anticorpos anti-HIV não reagentes;
- Estágio III: ensaios de RNA, antígeno p24 e imunoensaio enzimático de terceira geração reagentes. Ensaio de Western blot não reagente para HIV-1;

- Estágio IV: : ensaios de RNA, antígeno p24, imunoenensaio enzimático de terceira geração reagentes e ensaio de Western blot indeterminado;
- Estágio V: ensaios de RNA, antígeno p24, imunoenensaio enzimático de terceira geração reagentes e ensaio de Western blot reagente com ausência de reatividade na banda gp31;
- Estágio VI: ensaios de RNA, antígeno p24, imunoenensaio enzimático de terceira geração e ensaio de Western blot reagentes (padrão completo de reatividade)³⁷.

Dessa forma, consideram-se marcadores da infecção pelo HIV o RNA viral, a proteína p24 e os anticorpos anti-HIV, e, como visto, ambos oscilam de acordo com o período da infecção em que o indivíduo se encontra⁹.

Figura 3. Sistema de estadiamento laboratorial (Fiebig) baseado nos marcadores da infecção pelo HIV e seus respectivos ensaios



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018⁹.

No Brasil, os testes diagnósticos para a detecção da infecção pelo HIV são empregados, principalmente, em serviços de hemoterapia, em estudos de vigilância epidemiológica e no diagnóstico propriamente dito dos indivíduos. Considerando a diversidade de testes disponíveis, os diferentes cenários presentes no país e os diferentes profissionais envolvidos na realização do diagnóstico, a padronização de testes em série tornou-se imprescindível para garantir a

confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados. Dessa forma, desde 1988 o MS tem padronizado algoritmos de testagem para o HIV, os quais são revisados à medida que evoluem as tecnologias disponíveis⁹.

No presente momento, está em vigor o Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças (Portaria SVS/MS N° 29, de 17 de dezembro de 2013), onde estão padronizados seis diferentes fluxogramas para o diagnóstico laboratorial em diferentes situações e condições de infraestrutura local, com ensaios baseados na resposta de anticorpos e na quantificação da carga viral do HIV^{8,9}. Nos diferentes cenários em que se realiza o diagnóstico do HIV é necessário que o fluxograma empregado cubra todas as necessidades de triagem e de confirmação da infecção³⁸.

3.4.1 Testes de Triagem

Testes de triagem são testes com alto grau de sensibilidade, desenvolvidos para detectar todos os indivíduos infectados, minimizando, dessa forma, os resultados falso-negativos³⁹.

Atualmente, uma grande variedade de métodos manuais, semiautomatizados e automatizados, baseados na reação antígeno-anticorpo, está disponível para o diagnóstico da infecção pelo HIV⁴⁰. Dessa maneira, o MS recomenda o uso dos seguintes testes nesta etapa de triagem: ensaio imunoenzimático ELISA (EIE/ELISA); ensaio imunoenzimático de micropartículas (MEIA); ensaio imunológico quimioluminescente (CLIA); ensaio imunológico com revelação eletroquimioluminescente (EQL); ensaio imunológico fluorescente ligado à enzima (ELFA); ensaio imunológico quimioluminescente magnético (CMIA); testes rápidos (TR) de imunocromatografia, de aglutinação de partículas de látex e de imunoconcentração⁴¹.

Estes testes divergem entre si, principalmente, em relação ao seu sistema de detecção, podendo ou não necessitar de um equipamento para a leitura da amostra, de acordo com o produto gerado (luz, cor, fluorescência entre outros). Entre as metodologias aplicadas na triagem do HIV está a CLIA, realizada no Laboratório de HIV/Aids do Centro de Imunologia do IAL (CIM-IAL), em que a partir de determinada reação química, obtém-se energia luminosa, podendo ser empregada para a detecção combinada de antígenos e anticorpos (ensaios de quarta geração)⁴², impactando diretamente no período de janela diagnóstica. Com isso, os avanços tecnológicos nos sistemas analíticos automatizados possibilitaram aos laboratórios a obtenção de resultados com rapidez, elevado grau de exatidão e reprodutibilidade.

Por outro lado, a realização do diagnóstico em localidades onde a infraestrutura laboratorial não está disponível, faz com que a utilização dos testes rápidos seja a melhor forma de atendimento à determinadas populações, uma vez que não requerem o uso de equipamentos para a obtenção de seus resultados. Estes testes são de simples execução e a reação é evidenciada em cerca de trinta (30) minutos; os mais frequentemente utilizados são os de imunocromatografia de fluxo lateral e de duplo percurso, que possuem antígenos virais fixados em um suporte sólido (por exemplo, membranas de nitrocelulose)^{9,10}.

3.4.2 Testes Confirmatórios

Testes confirmatórios são testes com alto grau de especificidade, desenvolvidos para identificar os indivíduos que não estão infectados, mas apresentaram-se como reagentes nos ensaios de triagem³⁹. Produzem, dessa forma, poucos resultados falso-positivos⁴³. O MS preconiza os seguintes testes na etapa confirmatória: WB; *imunoblot* (IB), *imunoblot rápido* (IBR) e TM em casos específicos (quantificação da carga viral), uma vez que os testes que detectam anticorpos não são considerados os mais adequados em um indivíduo com infecção aguda^{9,43}.

Ao Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL, o MS fornece o teste de IBR HIV1/2, que utiliza a metodologia DPP (plataforma de duplo percurso). Na fase sólida, estão presentes os antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos do HIV-1 e do HIV-2, imobilizados sobre uma membrana. Diferente do WB e IB, o IBR é de metodologia rápida, permitindo a detecção de anticorpos em menos de 30 (trinta) minutos⁹.

Em casos em que a confirmação não pode ser concluída pelos ensaios de WB ou IBR, por apresentarem resultados não reagentes ou indeterminados, o uso de TM auxiliam no esclarecimento dos resultados da infecção aguda pelo HIV⁹.

Os TM baseiam-se na detecção do RNA viral no plasma, importante marcador clínico. O número de partículas virais é elevado durante a infecção primária e reduzido na fase crônica assintomática. Existe uma relação direta entre a quantidade de vírus detectada e a rapidez com que a infecção irá progredir⁹.

3.5 Controle de Qualidade

Vale salientar que as metodologias podem gerar resultados falsos reagentes ou falso-não reagentes em função de particularidades da sensibilidade e especificidade de cada ensaio. Além disso, o armazenamento inadequado de amostras e reagentes e a falta de calibração dos equipamentos constituem também exemplos comuns de falhas no diagnóstico do HIV. Neste aspecto, a implantação de medidas de controle de qualidade são de extrema importância para a liberação de resultados fidedignos^{9,14}.

O controle de qualidade na área da saúde é um conjunto de medidas, melhorias e padronizações de processos com o objetivo de ampliar a segurança dos serviços prestados ao paciente. Esse conjunto de medidas nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, possibilitam o fornecimento de resultados válidos e confiáveis em tempo hábil, para auxiliar o diagnóstico e tratamento dos pacientes¹⁴. Neste aspecto, o controle de qualidade interno (CQI) é utilizado como um parâmetro adicional na fase analítica, com a finalidade de validar os ensaios e fornecer resultados mais confiáveis^{44,45}, possuindo excepcional importância não somente aos pacientes, mas à população como um todo, uma vez que podem impactar diretamente nos dados epidemiológicos da doença, tendo conseqüências nas medidas de vigilância em saúde empregadas³⁸.

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

Este estudo está vinculado ao Projeto de Pesquisa “Epidemiologia Global do HIV e pesquisa de prevenção para travestis e mulheres transexuais – Coorte Transnacional” (CONEP nº 1.880.217 28/12/2016; Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência e Treinamento - DST/AIDS nº 15.937.513 22/02/2017), que tem por objetivos principais medir a incidência de HIV, os eventos sociais e biomédicos de transição de gênero, os comportamentos de risco relacionados à afirmação de gênero e as múltiplas formas de estresse em todos os níveis ecológicos comportamentais de influência associados à aquisição do HIV. Trata-se de uma coorte que propôs a participação de 1.100 travestis e mulheres transexuais não infectados pelo HIV, dos quais 550 dos participantes são provenientes de São Francisco (EUA) e 550 de São Paulo (Brasil), com acompanhamento semestral para análise no período de dois anos, com base na metodologia *Respondent Driven Sampling* (RDS). Em São Paulo o estudo está sendo coordenado pela Dra. Maria Amélia de Sousa Mascena Veras da Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSC-SP).

A participação do IAL no Projeto acima citado refere-se à realização de ensaios laboratoriais convencionais para o diagnóstico da infecção pelo HIV e à avaliação da comparabilidade desses resultados em relação aos TR em amostras provenientes das voluntárias de São Paulo (projeto de pesquisa "Estudo de coorte transnacional - avaliação de desempenho de métodos utilizados no diagnóstico da infecção pelo HIV" Centro Técnico Científico do IAL CTC/IAL 41-K/2018).

4.1.1 *Respondent Driven Sampling* (RDS)

A técnica de RDS tem sido tipicamente utilizada com populações raras ou desconhecidas, difíceis de serem identificadas pelos pesquisadores por se tratarem de uma população em que, usualmente, o comportamento de seus membros envolve um tema sensível que faz com que estes não queiram se revelar (seja por envolver ilegalidade, seja por reprovação social)⁴⁶.

Assim, o RDS é um método de amostragem baseado no processo de recrutamento em cadeia conhecido como Bola de Neve, combinado com um modelo matemático. Em linhas gerais, este procedimento se inicia com a escolha não aleatória de um grupo de membros da população-

alvo; para cada membro é dado um número fixo de cupons que devem ser entregues para outros membros considerados elegíveis dentro de sua rede social, repetindo-se este processo até o tamanho amostral ser atingido. O fato da amostra ter sido coletada de uma maneira não-aleatória, a princípio, é compensada pelo modelo matemático utilizado no método (teoria de cadeias de Markov e teoria de redes viesadas)⁴⁷. Este método foi escolhido para o estudo por ser o mais apropriado entre as alternativas disponíveis de amostragem de pessoas de difícil acesso e por ser capaz de incluir as grandes redes sociais ocultas de populações-chave, uma vez que as próprias participantes são responsáveis por recrutar as demais voluntárias da coorte.

4.1.2 Critério de inclusão utilizado no Estudo Transnacional

- 1) Identificar-se como travesti, mulher, mulher transexual ou outra categoria que não seja o sexo masculino atribuído ao nascimento;
- 2) Ser HIV negativo no momento de inclusão no estudo (participantes sabidamente positivos ou que testaram positivo no momento de inclusão do estudo participaram apenas do inquérito de base sobre cuidados em relação ao HIV);
- 3) Ter 18 anos ou mais;
- 4) Residir na Grande São Paulo, com intenção de permanecer morando na área no decorrer do estudo;
- 5) Possuir cupom de encaminhamento fornecido por um par conhecido (na fase de recrutamento pelo RDS).

4.2 Obtenção das amostras

No Centro de Referência e Tratamento de DST Aids de São Paulo (CRT DST/Aids), as amostras de sangue das voluntárias foram obtidas por punção venosa, que após a entrevista e mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aceitaram realizar o teste para diagnóstico da infecção pelo HIV.

Das participantes que consentiram com a realização dos testes e o armazenamento do sangue, foram colhidos 8,5mL de sangue em tubo sem anticoagulante, com gel separador, para a obtenção de soro. Aos indivíduos que consentiram a testagem para HIV, mas não aceitaram o armazenamento de seu material biológico ou não permitiram colheita de sangue por punção venosa, foi efetuada a punção digital apenas para a realização de testes rápidos e se necessário, o

encaminhamento terapêutico, impossibilitando-os de participarem deste estudo de avaliação de desempenho.

Logo após a realização do TR, o tubo de sangue foi centrifugado e armazenado em freezer -20°C, para, posteriormente, ser encaminhado ao Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL.

No período de setembro a dezembro de 2018, os ensaios laboratoriais convencionais foram realizados em 1.141 amostras, provenientes de 765 voluntárias, sendo 230 amostras com resultados reagentes nos dois TR (TR1 e TR2) e 911 com resultados não reagentes no TR1.

Vale ressaltar que essas amostras foram provenientes de um inquérito epidemiológico para incidência de HIV, em que os indivíduos com resultado sorológico não reagente foram acompanhados com objetivo de identificar possíveis casos de soroconversão. Portanto, no estudo houve indivíduos que colheram até quatro amostras de sangue, em intervalos de aproximadamente seis meses entre cada uma delas.

4.2.1 Confidencialidade

A confidencialidade dos participantes foi assegurada pela remoção de identificadores pessoais de dados, e as amostras foram armazenadas de forma segura com código unívoco. Ao Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL foram encaminhados os tubos de sangue contendo somente a numeração do código de barras, sem qualquer identificação do participante do estudo.

4.3 Diagnóstico da Infecção pelo HIV

No CRT - DST/Aids o diagnóstico da infecção pelo HIV foi realizado com base no Fluxograma 1 do Manual técnico preconizado pela Portaria vigente⁸, enquanto no Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL as amostras foram avaliadas seguindo-se o Fluxograma 6.

4.3.1 Fluxograma 1 - CRT DST/Aids

Os TR foram realizados nas amostras de sangue das voluntárias pela equipe de profissionais do CRT - DST/Aids seguindo-se o Fluxograma 1 do Manual Técnico preconizado pela Portaria vigente, que estabelece o uso de dois testes rápidos, de fabricantes diferentes, realizados em sequência, quando a amostra apresenta-se reagente no primeiro TR (TR1). Para amostras não reagentes no TR1, o segundo TR (TR2) não é realizado⁹.

Dessa forma, na triagem sorológica do HIV empregou-se um ensaio imunocromatográfico inicial (TR1), de elevada sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos anti-HIV 1+2 [HIV TRI Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Brasil)], que, de acordo com o manual de instruções do fabricante, emprega-se os antígenos recombinantes gp41 (HIV-1) e gp36 (HIV-2). As amostras com resultados reagentes no TR1 foram submetidas a um segundo ensaio imunocromatográfico distinto do inicial (TR2) HIV Test Bioeasy (Standard Diagnostic, Inc, Yongin-Si, Korea), composto por antígenos recombinantes gp41 e p24 para HIV-1, e gp36 para HIV-2.

Os TR empregados na triagem foram adquiridos pelo MS do Brasil e, os profissionais do CRT - DST/Aids tiveram treinamento prévio para a sua execução em condições consideradas satisfatórias e de acordo com o protocolo padronizado na pesquisa.

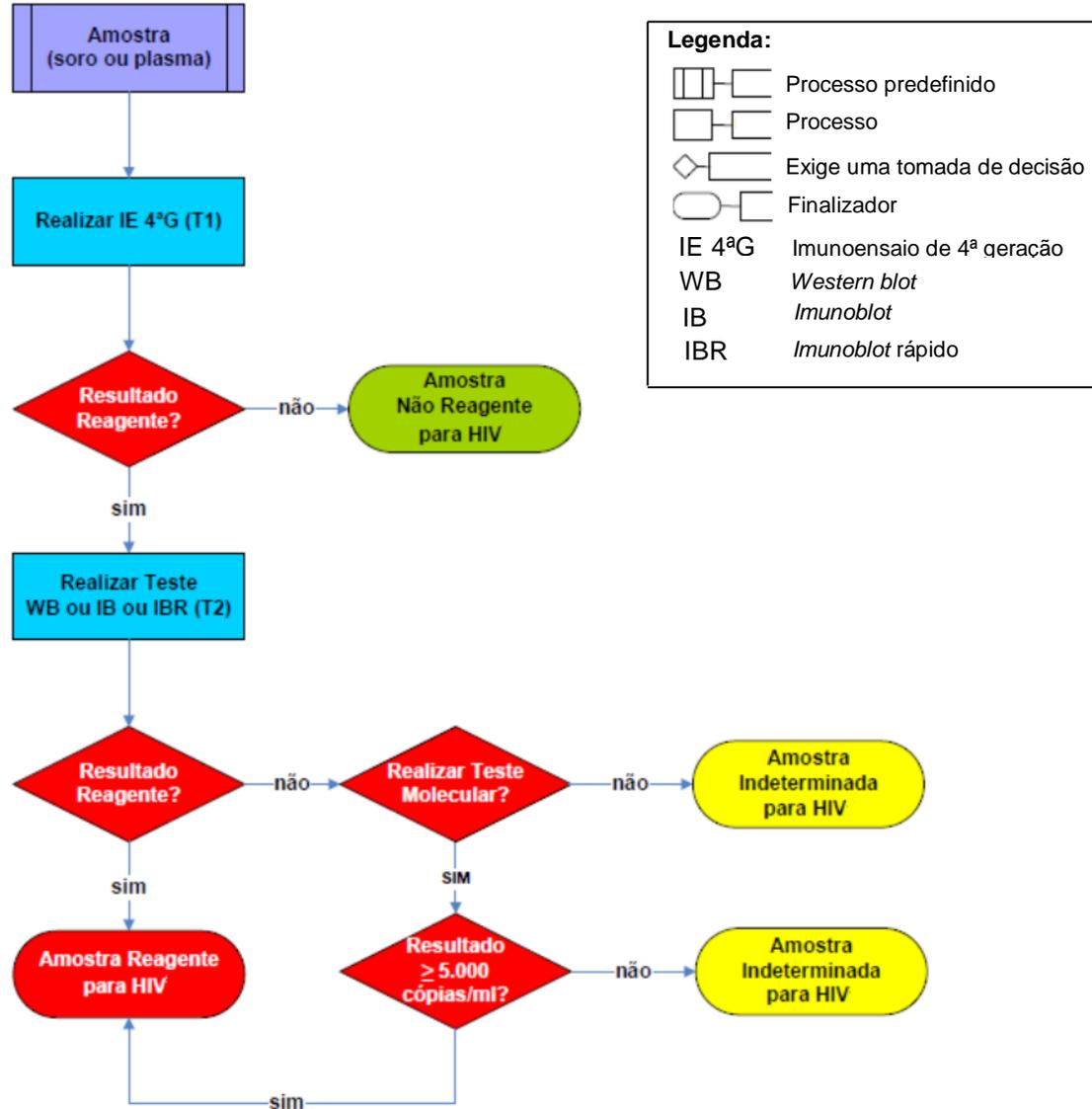
Todas as amostras de soro, independente do resultado obtido no TR (reagente ou não reagente), foram encaminhadas ao CIM-IAL para a realização dos ensaios sorológicos convencionais.

4.3.2 Fluxograma 6 - Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL

No Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL, o soro de cada indivíduo foi fracionado em duas alíquotas, uma para a realização dos testes sorológicos e a outra armazenada em freezer (temperatura de -20°C) para utilização em casos específicos (confirmação de resultado ou para a realização do teste molecular).

Para o desenvolvimento do presente estudo, as amostras foram processadas no período de setembro a dezembro de 2018 para detecção de anticorpos anti-HIV, utilizando-se os reagentes disponíveis na rotina do CIM-IAL. Os procedimentos foram realizados de acordo com o Fluxograma 6 do Manual técnico (Figura 4), preconizado pela Portaria vigente^{8,9}.

Figura 4. Fluxograma 6 para a testagem da infecção pelo HIV



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018⁹.

O teste inicial realizado por meio da sorologia convencional foi o ensaio de quimioluminescência (CLIA – quarta geração) [Advia Centaur HIV Ag/Ab Combo (CHIV); Siemens Healthcare Diagnostics, Inc, NY, USA], que detecta o antígeno p24 viral e anticorpos anti-HIV-1 (incluindo grupo O) e anti-HIV-2. Nas amostras com resultado reagente foi realizado o teste confirmatório imunoblot rápido (IBR) [Imunoblot Rápido DPP HIV1/2 (IBR DPP HIV); Bio-Manguinhos - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil].

No IBR, amostras com resultado não reagente ou indeterminado foram submetidas à etapa complementar de quantificação da CV no Centro de Virologia do IAL, para a verificação da presença do RNA viral.

No Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL, em ambos os ensaios sorológicos (CHIV e IBR), foi utilizado o CQI HIV, que consistem em amostras de soro fracamente reagentes para HIV, preparadas e estabelecidas para serem materiais de referência. Essas amostras, juntamente com os controles fornecidos pelo fabricante dos conjuntos de reagentes diagnósticos, servem como um parâmetro adicional para validar as reações, monitorando a precisão e exatidão dos ensaios sorológicos e fornecendo resultados mais fidedignos. Além disso, a sensibilidade e a especificidade analítica dos lotes do kit de reagentes diagnóstico CHIV utilizados neste estudo foram levadas em consideração empregando-se painéis comerciais (*Seracare/BBI Diagnostics*) de soroconversão PRB 977, composto por quatro amostras, e de performance PRB 205 (M2) com 17 amostras.

4.3.2.1 *Etapa complementar - Centro de Virologia do IAL*

Aos indivíduos que obtiveram resultados reagentes na etapa de triagem (CHIV) e indeterminado ou não reagente no ensaio confirmatório (IBR), as alíquotas de soro mantidas em freezer -20°C foram encaminhadas ao Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais do Centro de Virologia do IAL para a execução do teste de quantificação da CV. Resumidamente, o RNA foi extraído no equipamento automatizado Abbott Real time M2000sp e analisado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real - qPCR (Abbott Real Time M2000rt), seguindo-se as recomendações do fabricante, sendo o resultado expresso em cópias/mL ou em *log*. Amostras com resultado igual ou superior a 5.000 cópias/mL foram consideradas reagentes para HIV.

4.3.2.2 *Interpretação dos resultados*

De acordo com a Figura 4, as amostras que se apresentaram como não reagentes na etapa de triagem (CHIV), a interpretação do resultado laboratorial foi dada como "Amostra não reagente para HIV". Àquelas com resultados reagentes no CHIV e no IBR foram definidas como "Amostra reagente para HIV", enquanto que as amostras com resultado reagente no CHIV e indeterminado ou não reagente no IBR, foram submetidas ao teste de CV. Os resultados da CV \geq

5.000 cópias/mL foram considerados como “Amostra reagente para HIV” e para CV < 5.000 cópias/mL, como “Amostra indeterminada para HIV”.

4.4 Análise estatística dos resultados

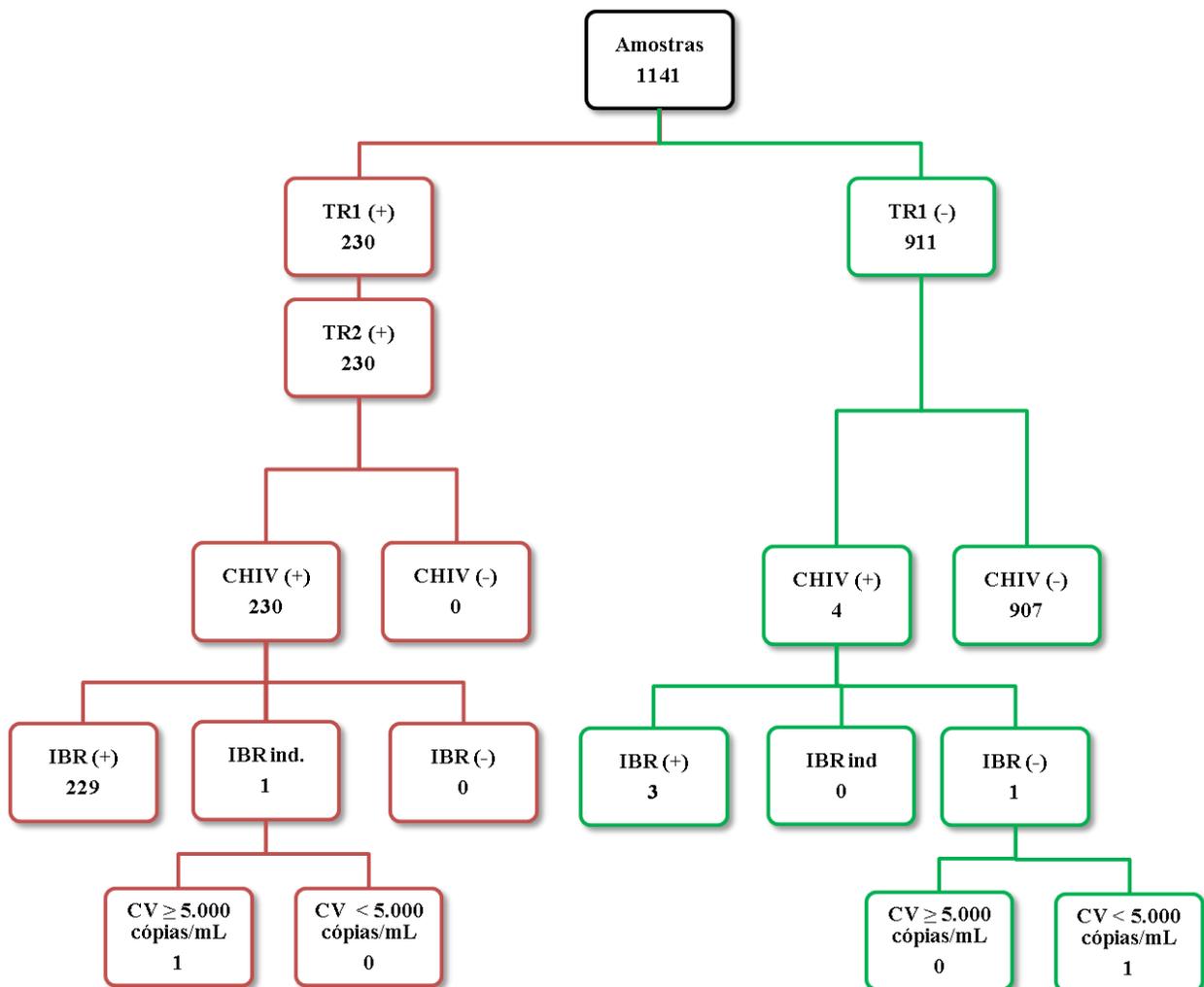
Os níveis de concordância entre os resultados dos ensaios TR e CHIV, e entre o Fluxograma 1 (dois TR) e o Fluxograma 6 (CHIV e IBR/CV) foram avaliados utilizando-se o índice *Kappa* (κ), que descreve a concordância entre dois instrumentos⁴⁸. Conforme proposto por Altman (1999) e adaptada de Landis e Koch (1977)^{48,49}, o valor $\kappa < \text{zero}$ é interpretado como concordância insignificante; entre 0 e 0,2 fraca; entre 0,21 e 0,4 razoável; entre 0,41 e 0,6 moderada; entre 0,61 e 0,8 forte e entre 0,81 a 1 considera-se concordância quase perfeita.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos TR HIV no CRT – DST/Aids, as 1.141 amostras de soro foram encaminhadas ao CIM-IAL para avaliação por meio dos ensaios sorológicos convencionais, sendo 765 (67%) provenientes da 1ª colheita de sangue das voluntárias (travestis e mulheres transexuais) e as demais (376 amostras) resultantes das várias colheitas realizadas ao longo do acompanhamento da coorte para medir a incidência do HIV. Destas, 239 (21%) amostras foram oriundas da 2ª colheita, 127 (11%) da 3ª colheita e 10 (1%) amostras da 4ª colheita.

A figura 5 ilustra o número de amostras avaliadas (1.141) nas diferentes metodologias utilizadas e os seus respectivos resultados.

Figura 5. Resultados das amostras obtidos nos ensaios TR, CHIV, IBR e CV para HIV



TR: teste rápido; CHIV: ensaio de quimioluminescência (Ag/Ac); IBR: imunoblot rápido; CV: carga viral.

(+): amostra reagente; (-) amostra não reagente.

Das amostras enviadas pelo CRT – DST/Aids, 230 tiveram resultados reagentes em ambos os TR (TR1 e TR2), apresentando uma percentagem de 100% de concordância entre estes testes. 911 amostras com resultados não reagentes no TR1 não foram submetidas ao TR2, de acordo com o preconizado no Fluxograma 1 do Manual do MS⁹.

As amostras encaminhadas como reagentes nos TR (230) apresentaram-se também reagentes no CHIV (230). Seguindo-se o preconizado pelo Fluxograma 6, foi realizado o teste confirmatório IBR HIV nestas amostras. Destas, 229 amostras apresentaram o padrão de bandas compatível com o critério de positividade para HIV-1, sendo consideradas como "Amostra reagente para HIV". Uma amostra apresentou resultado indeterminado no IBR, revelando perfil de reatividade neste ensaio apenas na banda gp41. Nesta amostra, o resultado da CV para HIV-1 foi detectável, apresentando um valor de 2.757.243 cópias/mL, o que permitiu definir o diagnóstico da infecção como "Reagente para HIV". Vale ressaltar que esta tratava-se da 2ª colheita da voluntária; a 1ª colheita, realizada em um período anterior, apresentou-se como não reagente em ambos os ensaios de triagem (TR1 e CHIV), enquanto a 3ª colheita apresentou resultados reagentes em todos os testes sorológicos realizados (TR, CHIV e IBR), demonstrando um processo de soroconversão (o intervalo para cada colheita foi de aproximadamente seis meses). Para casos como este, de infecção aguda e/ou recente, recomenda-se a utilização do teste inicial de quarta geração (Ag/Ac) seguido por teste molecular para a confirmação diagnóstica.

De acordo com o sistema de estadiamento laboratorial de Fiebig³⁷, a amostra acima citada apresenta o padrão de reatividade do estágio IV, em que os anticorpos/antígeno puderam ser detectados no ensaio de triagem e o RNA no teste molecular, enquanto o resultado do ensaio de IBR apresentou-se como indeterminado. Todavia, na terceira colheita o resultado do IBR foi reagente, com reatividade em todas as bandas específicas para HIV-1 (gp160, g120, gp41, p24) possíveis de detecção neste ensaio. O tempo para o aparecimento de anticorpos (soroconversão) diferencia-se entre os indivíduos, mas os marcadores de infecção, RNA e antígeno p24, podem ser detectados precocemente, demonstrando a presença do vírus no indivíduo testado. O diagnóstico precoce, logo após a transmissão do HIV, é primordial aos pacientes, pois a TARV imediata tem-se mostrado eficaz ao longo do tempo, reduzindo a CV e a probabilidade de transmissão, especialmente se houver estratégias implementadas (como o aconselhamento sobre comportamentos de risco)⁵⁰. O resultado obtido no IAL corrobora com os estudos de Taylor. *et al*

(2014)⁵⁰ que demonstram o tempo de detecção da infecção em diferentes ensaios para HIV, revelando que ensaios de quarta geração e testes rápidos (terceira geração) levam de duas a três semanas para detectar os anticorpos, enquanto os ensaios que empregam a metodologia de WB podem levar um tempo superior.

Em relação às amostras com resultados não reagentes no TR (911), quando avaliadas no CHIV, 907 apresentaram-se como não reagentes e quatro foram reagentes. Destas quatro amostras, uma (25%) apresentou-se como não reagente no ensaio confirmatório (IBR), devido à ausência de bandas, sendo nesta amostra o resultado de CHIV próximo ao valor de *cut off* (1,05/1,00), mantendo-se este valor mesmo após a repetição do ensaio com a amostra analisada em duplicata. Neste caso, no qual houve discordância entre o ensaio confirmatório (IBR) e ensaio de triagem (CHIV), optou-se pela continuação do Fluxograma 6 empregando-se o teste molecular na amostra pareada, mantida a -20°C, para confirmar ou não a presença da infecção pelo HIV. A CV não produziu sinal de presença de RNA viral (não detectável), concluindo-se como "Amostra indeterminada para HIV". Para esta amostra, independentemente de prosseguir ou não à etapa molecular do Fluxograma 6, a interpretação final do resultado manteve-se indeterminado. Autores como Juarez *et al* (2016)⁵¹ apontam que resultados falso-positivos podem ser encontrados em testes de triagem, pois estes são desenvolvidos para apresentarem alta sensibilidade e, por este motivo, requerem a confirmação por testes mais específicos, como por exemplo o IBR, para concluir o diagnóstico da infecção pelo HIV^{9,51}. Em virtude de outras doenças presentes, a reatividade cruzada de anticorpos pode ocorrer no soro de alguns indivíduos, levando à obtenção de resultados falso-reagentes.

As outras três amostras com resultado reagente para HIV no ensaio confirmatório IBR (resultado compatível com CHIV e discordante do TR1), com intuito de elucidar as possíveis causas de discordâncias entre os testes de triagem, foram avaliadas empregando-se os mesmos kits de TR (TR1 e TR2) utilizados anteriormente no CRT/Aids, porém de diferentes lotes. Nestes dois TR, todas as amostras (3/3) apresentaram-se reagentes.

Por mais que o avanço tecnológico nos ensaios tenha permitido o aumento da velocidade na entrega dos resultados dos testes, autores como Najat (2017)⁵² e Vieira *et al* (2011)⁵³ observaram que os erros em todas as fases do processo - pré-analítico, analítico e pós-analítico - ainda permanecem. Essas três amostras aqui descritas possivelmente inserem-se nesta esfera. Dentre estes prováveis erros, a Organização Mundial da Saúde (OMS)⁵⁴, em conformidade com

outros estudos, destaca os mais recorrentes como sendo: a troca de amostras durante a realização do ensaio, problemas intrínsecos ao lote do kit diagnóstico, problemas no procedimento analítico ou na interpretação do resultado do teste pelo profissional, além de problemas no armazenamento dos reagentes e na transcrição dos resultados (fase pós-analítica) entre outros^{54,55}. Um estudo desenvolvido por Castejon *et al* (2018)⁵⁶ identificou resultados negativos no TR (TR1) que apresentaram-se como positivos nos exames laboratoriais, mostrando algumas limitações do método único do TR, principalmente em função de erros, destacando, dessa forma, o papel fundamental dos exames sorológicos convencionais na elucidação do diagnóstico laboratorial, além da implementação de um programa de qualidade.

Ampliar os serviços de testagem do HIV e garantir a qualidade do diagnóstico são fatores fundamentais na saúde pública. Dessa forma, torna-se necessário um esforço paralelo para melhorar a qualidade durante os procedimentos já existentes para evitar o aparecimento de falhas. As consequências de um diagnóstico incorreto são graves para o indivíduo, pois um resultado falso-positivo implica em tratamento desnecessário e transtornos psicológicos e físicos ao indivíduo, enquanto que um resultado falso-negativo o impede de receber tratamento e assistência adequados e de prevenir a transmissão contínua do HIV⁵⁴.

A Tabela 1 mostra o número de amostras e a respectiva interpretação final dos resultados pelo Fluxograma 1 e pelo Fluxograma 6 para diagnóstico do HIV.

Tabela 1. Conclusão laboratorial diagnóstica da infecção por HIV/aids por meio de TR e de testes laboratoriais convencionais

Teste	Conclusão diagnóstica laboratorial (por número de amostras)			Total
	Amostra Reagente para HIV	Amostra não reagente para HIV	Amostra Indeterminada para HIV	
Teste Rápido (Fluxograma 1)	230	911	0	1.141
Laboratorial convencional (Fluxograma 6)	233	907	1	

Para os resultados demonstrados na Tabela 1, segundo os critérios estabelecidos para a interpretação do índice κ , o grau de concordância para o TR1/CHIV foi quase perfeito ($\kappa =$

0,989), em que se observou a proporção de concordância de aproximadamente 100%. De maneira semelhante, o grau de concordância para o diagnóstico do HIV entre Fluxograma 1 e o Fluxograma 6 foi também considerado quase perfeito ($\kappa = 0,989$), com proporção de concordância de aproximadamente 100%.

O desenvolvimento dos testes rápidos facilitou o acesso à testagem do HIV, permitindo que milhões de indivíduos conheçam o seu status sorológico⁵¹. Neste contexto, é de fundamental importância a precisão no teste diagnóstico de HIV, pois este é o primeiro passo para a identificação de indivíduos infectados⁵⁷. Várias são as questões que impactam a qualidade do diagnóstico por meio de TR HIV, portanto, é necessário buscar soluções para monitorar e melhorar a precisão do teste, que incluem treinamentos com ênfase em garantia da qualidade, participação dos profissionais em ensaios de proficiência, verificação da sensibilidade e especificidade a cada novo lote do kit, entre outros. A implementação destas ferramentas aprimora a qualidade dos resultados oferecidos à população⁵⁷.

Estudos demonstram que 70% das decisões do diagnóstico clínico dependem da precisão e exatidão dos testes laboratoriais⁵². Atentando-se para obtenção de resultados fidedignos, o Laboratório de HIV/Aids do CIM-IAL tem participado de Programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) e utilizado rotineiramente material de referência (CQI HIV) para monitorar a qualidade de seus procedimentos (exatidão e precisão). A utilização do CQI tem proporcionado aos profissionais envolvidos na rotina laboratorial maior confiabilidade na liberação de resultados.

Ainda, em relação à sensibilidade dos testes, Tomaras *et al* (2008)⁵⁸, estudando a resposta de células B em indivíduos doadores de plasma, revela que as primeiras imunoglobulinas anti-HIV-1 livres no plasma são direcionadas à glicoproteína gp41, aparecendo em torno de 13 dias após a detecção do vírus no plasma. Este estudo é consistente com os resultados obtidos por Moshgabadi *et al* (2015)⁵⁹, que demonstra que a sensibilidade dos testes rápidos é elevada quando emprega-se em sua composição o antígeno gp41. Os TR HIV e o ensaio CHIV utilizados nesta pesquisa, de acordo com as informações do manual de instruções do fabricante, apresentam em sua composição o antígeno recombinante gp41. Possivelmente, a alta taxa de concordância ($\kappa = 0,989$) entre TR1 e CHIV deva-se a este fato, além de outros não abordados neste estudo.

6. CONCLUSÃO

Em infecções que muitas vezes passam imperceptíveis ao indivíduo, como as infecções pelo HIV, o diagnóstico fidedigno consiste no primeiro passo para dar início ao tratamento e propiciar qualidade de vida, além de ser uma ferramenta chave para a implementação de ações de Vigilância em Saúde. Colaborando com estes pontos, o presente estudo avaliou o desempenho dos testes utilizados em algoritmos de testagem para o HIV preconizados pelo Ministério da Saúde. Os resultados obtidos demonstraram elevada concordância entre os testes rápidos e os ensaios sorológicos convencionais utilizados, revelando alta confiabilidade para a realização destes testes. Por outro lado, constatou-se que a introdução de controle de qualidade em todas as fases do procedimento (analítica, pré-analítica e pós-analítica) é imprescindível, visto que as principais divergências encontradas neste estudo ocorreram em função de falhas técnicas e/ou humanas (como por exemplo problemas intrínsecos ao lote do kit de TR empregado, erro na transcrição dos resultados, troca de amostras, entre outros).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United Nations Program on HIV/AIDS. **DATA 2018**. Genebra: UNAIDS, 2018. Disponível em <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaids-data-2018_en.pdf> Acesso: 04 out. 2018.
2. VERAS, M. A. S. M. *et al.* High HIV prevalence among men who have sex with men in a time-location sampling survey, São Paulo, Brazil. **Aids and Behavior**, [S.l.], v. 19, n. 9, p.1589-1598, set. 2015.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Policy brief: Transgender people and HIV. Genebra: WHO, 2015. 34 p.** Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/179517/WHO_HIV_2015.17_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 17 out. 2018.
4. GUIMARÃES, M. D. C. *et al.* Vulnerability and factors associated with HIV and syphilis among men who have sex with men, Belo Horizonte, MG. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.l.], v. 23, n. 4, p.399-412, 2013.
5. BARAL, S. D. *et al.* Worldwide burden of HIV in transgender women: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.l.], v. 13, n. 3, p.214-222, mar. 2013.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017**. Brasília: MS, 2017. 64 p. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hiv aids-2017>> Acesso: 18 out. 2018.
7. VAN GRIENSVEN, F. *et al.* Challenges and emerging opportunities for the HIV prevention, treatment and care cascade in men who have sex with men in Asia Pacific. **Sexually Transmitted Infections**, [S.l.], v. 93, n. 5, p.356-362, jul. 2017.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria SVS/MS nº 29, de 17 de dezembro de 2013**. Aprova o Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças e dá outras providências. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2013/prt0029_17_12_2013.html> Acesso: 19 set. 2018.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para Diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 19 set. 2018.
10. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Série TELELAB MS. **Testes rápidos**. [20--?]. Disponível em: <<https://telelab.aids.gov.br/index.php/component/k2/item/769>>. Acesso: 04 out. 2018.

11. KEEN, P. *et al.* Multi-centre field evaluation of the performance of the Trinity Biotech Uni-Gold HIV 1/2 rapid test as a first-line screening assay for gay and bisexual men compared with 4th generation laboratory immunoassays. **Journal of Clinical Virology**, [S.l.], v. 86, p.46-51, jan. 2017.
12. CONWAY, P. D. *et al.* Rapid Rapid HIV Testing Is Highly Acceptable and Preferred among High-Risk Gay And Bisexual Men after Implementation in Sydney Sexual Health Clinics. **Plos One**, [S.l.], v.10, n.4, p. 1-15, abr. 2015.
13. ADAMS, S. *et al.* Performance evaluation of the point-of-care INSTI™ HIV-1/2 antibody test in early and established HIV infections. **Journal of Clinical Virology**, [S.l.], v. 91, p.90-94, jun. 2017.
14. BERLITZ, F. A. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 46, n. 5, p.353-363, out. 2010.
15. FOGEL, J. M. *et al.* Impact of early antiretroviral therapy on the performance of HIV rapid tests and HIV incidence assays. **Jaids Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, [S.l.], v. 75, n. 4, p.426-430, ago. 2017.
16. KORBER, B. *et al.* Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**, Washington, DC, v. 288, n. 5472, p.1789-1796, jun. 2000.
17. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. Secretary's Minority AIDS Initiative Fund. **A TIMELINE OF HIV/AIDS. USA**, 2018. Disponível em: <<https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/history/hiv-and-aids-timeline>>. Acesso em: 12 set. 2018.
18. BARRÉ-SINOUSSE, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, [S.l.], v. 220, n. 4599, p.868-871, maio 1983.
19. GALLO, R. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, [S.l.], v. 220, n. 4599, p.865-867, maio 1983.
20. RATNER, L.; GALLO, R.; WONG-STAAAL, F. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. **Nature**, [S.l.], v. 313, n. 6004, p.636-637, fev. 1985.
21. MARX, J. AIDS virus has new name--perhaps. **Science**, [s.l.], v. 232, n. 4751, p.699-700, maio 1986.
22. ALEXANDER, T.S. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 Years of Evolution. **Clinical and Vaccine Immunology**, [S.l.], v. 23, n. 4, p.249-253, mar. 2016.

23. CHAPPEL, R. J.; WILSON, K. M.; DAX, E. M. Immunoassays for the diagnosis of HIV: meeting future needs by enhancing the quality of testing. **Future Microbiology**, [S.l.], v. 4, n. 8, p.963-982, out. 2009.
24. SEITZ, R. Human immunodeficiency virus (HIV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Freiburg, v. 43, n. 3, p.203-222, 2016.
25. LI, G.; CLERCQ, E. HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.l.], v. 80, n. 3, p.679-731, jun. 2016.
26. LEVY, J.A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. **Aids**, [S.l.], v. 23, n. 2, p.147-160, jan. 2009.
27. NYAMWEYA, A. S. *et al.* Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. **Reviews In Medical Virology**, [S.l.], v. 23, n. 4, p.221-240, fev. 2013.
28. 22nd INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE. AIDS 2018. **Subtypes of HIV**. Amsterdam: Netherlands, 2018. Disponível em: <<http://www.aids2018.org/Get-Involved/Take-part/Amsterdam-Youth-Force/Youth-Force-blog/ArticleID/132/Subtypes-of-HIV>>. Acesso: 21 set 2018.
29. VALLARI, A. *et al.* Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **Journal of Virology**, [S.l.], v. 85, n. 3, p.1403-1407, nov. 2010.
30. REQUEJO, H. I. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista de Saúde Pública**, [S.l.], v. 20, n. 2, p.331-345, jan. 2006.
31. SIEMIENIUK, R. A.; BECKTHOLD, B.; GILL, M.J. Increasing HIV subtype diversity and its clinical implications in a sentinel North American population. **Canadian Journal Infectious Diseases and Medical Microbiology**, [S.l.], v. 24, n. 2, p.69-73, summer 2013.
32. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (Comp.). **HIV Transmission**. , [S.l.], 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>>. Acesso em: 01 out. 2018.
33. NAIF, H. M. Pathogenesis of HIV infection. **Infectious Disease Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.26-30, jun. 2013.
34. CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Molecular virology and immunology of HIV infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S.l.], v. 110, n. 2, p.189-198, ago. 2002.
35. DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Sinais e Sintomas**. Florianópolis, 2018. Disponível em: <<http://aids.sc.gov.br/sinais-e-sintomas.html>> Acesso: 02 out. 2018.
36. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. 1 ed. Brasília: MS, 2013. 412 p. Disponível em: <

<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>>. Acesso em: 02 out. 2018.

37. FIEBIG, E. W. *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **Aids**, [S.l.], v. 17, n. 13, p.1871-1879, mar. 2003.

38. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Consolidated guidelines on HIV testing services: 5Cs: consent, confidentiality, counselling, correct results and connection. Genebra: WHO, 2015. 163 p.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/179870>>. Acesso em: 15 out. 2018.

39. CONSTANTINE, N. **HIV antibody assays.** Califórnia, 2006. Disponível em: <<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-02-01#S1X>>. Acesso em: 3 out. 2018.

40. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV.** Série TELELAB MS, [20--?] 12p. Disponível em: <https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22167/mod_resource/content/1/HIV%20-%20Manual%20Aula%205.pdf>. Acesso: 03 out 2018.

41. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Fluxogramas definidos na Portaria 29 de 17/12/2013-SVS/MS.** Série TELELAB MS, [20--?]. Disponível em: <https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22166/mod_resource/content/1/HIV%20-%20Manual%20Aula%204.pdf>. Acesso: 03 out. 2018.

42. ALONSO, R. *et al.* New automated chemiluminescence immunoassay for simultaneous but separate detection of human immunodeficiency virus antigens and antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 52, n. 5, p.1467-1470, fev. 2014.

43. TAVAKOLI, A. *et al.* Current diagnostic methods for HIV. **Future Virology**, [S.l.], v. 12, n. 3, p.141-155, mar. 2017.

44. CASTEJON, M. J. *et al.* Implementation of a strategy for improving the serological diagnosis of HIV/AIDS by introducing the internal quality control. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 2, p.157-164, maio 2010.

45. CASTEJON, M. J.; YAMASHIRO, R.; OLIVEIRA, C. A. F. **Manual Técnico – Programa de Controle de Qualidade Interno em ensaios sorológicos para HIV/AIDS.** São Paulo: IAL, 2016. 24 p. Disponível em: <<ses.sp.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=6092>>. Acesso: 16 out. 2018.

46. DEWES, J. O. **Amostragem em Bola de Neve e Respondent Driven Sampling:** uma descrição dos métodos. 2013. 52f. Monografia (Bacharel em Estatística) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

47. HECKATHORN, D. D. Respondent-Driven Sampling: A new approach to the study of hidden populations. **Social Problems**, [S.l.], v. 44, n. 2, p.174-199, maio 1997.

48. ALTMAN, D. G. Inter-rater agreement In: ALTMAN. **Practical Statistics for Medical Research. 8 ed.** Londres: Chapman And Hall, 1999. p. 403-409.
49. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, [S.l.], v. 33, n. 1, p.159-174, mar. 1977.
50. TAYLOR, D. *et al.* Probability of a false-negative HIV antibody test result during the window period: a tool for pre- and post-test counselling. **International Journal of Std & Aids**, [S.l.], v. 26, n. 4, p.215-224, jul. 2014.
51. JUAREZ, S. I. *et al.* Field evaluation of four rapid tests for diagnosis of HIV infection in Panama. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 54, n. 4, p.1127-1129, jan. 2016.
52. NAJAT, D. Prevalence of pre-Analytical errors in clinical chemistry diagnostic labs in Sulaimani City of Iraqi Kurdistan. **Plos One**, [S.l.], v. 12, n. 1, p.1-13, jan. 2017.
53. VIEIRA, K. F. *et al.* A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 47, n. 3, p.201-210, jun. 2011.
54. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A report on the misdiagnosis of HIV status. Geneva: WHO, 2015. 31 p.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/180231>>. Acesso em: 02 nov. 2018.
55. HAMMERLING, J. A. A Review of medical errors in laboratory diagnostics and where we are today: table 1. **Laboratory Medicine**, [S.l.], v. 43, n. 2, p.41-44, fev. 2012
56. CASTEJON, M. J. *et al.* Performance of rapid tests compared to conventional tests used for HIV diagnosis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, São Paulo, dez. 2018. Disponível em: <<http://jbpm.org.br/exportar-pdf/439/nahead-2%C2%AA-606.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2018.
57. PAREKH, B. S. *et al.* Scaling up HIV rapid testing in developing countries: comprehensive approach for implementing quality assurance. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 134, n. 4, p.573-584, out. 2010.
58. TOMARAS, G. D. *et al.* Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus Type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. **Journal of Virology**, [S.l.], v. 82, n. 24, p.12449-12463, out. 2008.
59. MOSHGABADI, N. *et al.* Sensitivity of a rapid point of care assay for early HIV antibody detection is enhanced by its ability to detect HIV gp41 IgM antibodies. **Journal of Clinical Virology**, [S.l.], v. 71, p.67-72, out. 2015.
60. RIBEIRO, A. S. **Confecção de painel sorológico para controle da qualidade de conjuntos de diagnósticos para detecção do anti-HIV.** 2006. 30 f. Monografia (Especialização)

- Curso de Especialização em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/14186>>. Acesso em: 03 out. 2018.