

# GESTANTE COM WESTERN BLOT – HIV INDETERMINADO. TRATAR, OU NÃO TRATAR. UMA VISÃO LABORATORIAL

FABIO TRIACHINI CODAGNONE<sup>1,2</sup>  
PLÍNIO CASAROTTO<sup>2</sup>

1. Farmacêutico-Bioquímico do Setor de Imunologia do Laboratório Municipal de Curitiba.
2. Farmacêutico-Bioquímico Mestre em Farmacologia pela Universidade Federal do Paraná, Rua Antonio Parolin Júnior, 1000, 80220-350, Curitiba, PR.

Autor responsável: F.T.Codagnone. Email: fcodagnone@gmail.com

## INTRODUÇÃO

O diagnóstico sorológico do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é realizado, a partir de métodos que detectam a presença de anticorpos específicos e/ou antígenos específicos para HIV (NUWAYHID, 1995; MYLONAKIS et al, 2000; JACKSON et al., 1988; GURTLER, 1996; IWEALA, 2004; MACHADO et al. 1999).

No Brasil, este roteiro diagnóstico foi estabelecido por meio do decreto governamental 059/2003 que determina que sejam realizados os seguintes testes: Elisa (método de triagem), Imunofluorescência Indireta e Western Blot.

Diferentes interpretações para o Western Blot são adotadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e outras entidades, o que gera controvérsias na definição dos resultados (positivos, negativos e indeterminados) (CREMONEZI, et al., 2005; TEBOURSKI, et al., 2004; MAHÉ et. al., 2002)

Alguns protocolos terapêuticos tem preconizado que gestantes em acompanhamento sorológico para determinação de anticorpos anti-hiv e que cursam com resultado indeterminado devem fazer uso da terapia anti-retroviral (TARV) (Protocolo Mãe Curitibana, 2006). Tal procedimento pode trazer conseqüências deletérias tanto para gestante (danos psicológicos, iatrogênicos, etc) quanto para o feto (estresse oxidativo, alterações neurológicas, disfunção mitocondrial, etc).

### Diagnóstico laboratorial do HIV na gestante

O teste de Elisa é um imunoenensaio qualitativo, de fácil execução, alta reprodutibilidade, extrema sensibilidade, facilmente adaptado a automação e de baixo custo (MYLONAKIS et al., 2000).

Seu princípio consiste na detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos virais (usualmente anti-p24, gp41 e/ou gp120). Recentemente, ensaios para detecção de antígenos (p24) também têm sido introduzidos comercialmente, o que reduz a “janela imunológica” em torno de uma semana.

O valor preditivo do Elisa e dos testes de triagem (screening) para HIV, ou seja, o quão o ensaio determinará com acurácia o verdadeiro status infeccioso do paciente, depende da prevalência da infecção por HIV na população. Em geral, uma alta prevalência da infecção por HIV na população, resulta num alto valor preditivo positivo do ensaio (IWEALA, 2004).

O teste de Elisa foi desenvolvido para que se tenha uma alta sensibilidade com intuito de detectar todos indivíduos possivelmente infectados. Como conseqüência, resultados falso-positivos podem ocorrer (NUWAYHID, 1995).

Em populações de baixo risco (como é o caso das gestantes), as quais a prevalência da infecção é baixa, o valor preditivo positivo (VPP) de um Elisa fracamente reativo é de 2% comparado com um valor preditivo positivo (VPP) de 87 a 100 % para um Elisa fortemente reativo. Em contraste, em uma população de alto risco, na qual a prevalência do HIV é  $\geq 30\%$ , o VPP de um Elisa fracamente reativo é de 87% comparado com VPP de 99 a 100% para um Elisa com reatividade moderada a forte (NUWAYHID, 1995).

Os testes de Elisa utilizados atualmente produzem poucos resultados falso-positivos em decorrência do aumento de sua sensibilidade e especificidade. Este fato resulta das novas técnicas de obtenção de antígenos virais por proteínas recombinante e/ou por peptídeos sintéticos (TANG et al., 1997).

Porém, resultados falso-positivos ainda são reportados em consequência de inúmeros fatores como demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1.** Causas de Elisa com resultados falso-positivos

Causa de resultados falso-positivos no Elisa
Presença de anticorpos reativos contra:
Antígenos leucocitários humanos ou outros componentes celulares, como aqueles observados em gestantes múltiparas e pacientes politransfundidos
Pacientes renais crônicos em hemodiálise
Pacientes com doenças autoimunes
Pacientes que receberam vacinas para o vírus da influenza e hepatite B recentemente
Pacientes infectados com herpesvirus

Altos percentuais de Elisa com resultados falso-positivos têm sido reportado em pacientes hemofílicos (19%), pacientes alcoolistas com hepatite (13%), pacientes submetidos a hemodiálise (4%) e pacientes que apresentam um teste de reagina plasmática positivo (24%) (JACKSON et al., 1988) .

Embora os resultados do Elisa sejam geralmente interpretados qualitativamente como reagente ou não reagente, o nível quantitativo de uma Elisa reagente influencia o valor preditivo do resultado: quanto maior o valor de um resultado reativo, maior será seu valor preditivo positivo. De forma geral, os testes de Elisa com resultado falso-positivos têm um baixo nível de reatividade (MYLONAKIS et al, 2000).

Testes de Elisa com resultados positivos podem e devem ser elucidados por testes confirmatórios (imunofluorescência indireta e Western Blot) (IWEALA, 2004).

Porém se o resultado for inconsistente com a história e os achados clínicos do paciente, outros ensaios podem ser executados, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (NUWAYHID, 1995).

O ensaio mais utilizado para confirmar um Elisa com resultado positivo é o Western Blot.

O Western Blot é um ensaio para detecção de anticorpos dirigidos contra alguns antígenos virais. A técnica consiste na eletroforese de proteínas virais (antígenos) em um gel de poliácridamida. Estes antígenos virais separados pela eletroforese são transferidos para uma fita de nitrocelulose e posteriormente incubados com o soro do paciente (JACKSON et al., 1988). Este ensaio compartilha de alguns princípios do Elisa com a vantagem de identificar anticorpos específicos para diferentes antígenos virais do HIV (anticorpos dirigidos contra proteínas virais codificadas por diferentes genes, a saber: core(p17,p24,p55), env(gp160/120, gp41) e pol(p31,p51,p66) (MYLONAKIS et al, 2000).

O Western Blot não deve ser utilizado como um teste de triagem em decorrência de seu alto percentual de re-

sultados falso-positivos (>2%), por conseguinte deve ser precedido pelo Elisa (MYLONAKIS, E. et al, 2000).

Entre 4 a 20% das amostras que são repetidamente reativas para o Elisa-HIV são interpretadas como indeterminadas pelo Western Blot (MYLONAKIS, E. et al, 2000).

A recomendação de que todas gestantes devam ser testadas para HIV, independente do fator de risco, tem gerado um aumento significativo em ambos percentuais de Elisa falso-positivos e Western Blot indeterminados. Além disso, o valor preditivo positivo (VPP) de um teste de Elisa em um grupo de baixo risco tende a ser baixo, resultando num aumento da frequência de Western Blot indeterminados. Um resultado indeterminado pode causar alguns problemas quando o médico interpreta o resultado como sendo indicativo de uma infecção por HIV (CREMONEZI, et al, 2005).

Cremonezi *et al* <sup>(2)</sup> estudando uma população de 9786 gestantes submetidas ao acompanhamento pré-natal chegaram a prevalência de 1% de soropositividade para HIV de acordo com o algoritmo definido pelo decreto governamental N°488 e 059.

Neste mesmo estudo 11 soros (0,1%) foram positivos para Elisa1, negativos ou positivos para o Elisa2, negativos na Imunofluorescência Indireta e indeterminados para Western Blot.

Posteriormente 10 dos 11 soros foram submetidos ao ensaio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com intuito de determinar a carga viral nestas pacientes.

Todos os soros apresentaram uma carga viral indetectável (limite de detecção do teste 50 cópias).

O perfil do Western blot destes soros pode ser observado na tabela abaixo (tabela 2)

**Tabela 2.** Perfil Western blot de soros.

N°	Western Blot
1	(p24gp160)
2	(p39gp160)+bandas não específicas entre p66 e gp120
3	(p24p31p51p66gp120)gp160
4	p24(gp41)
5	(p17gp41)+bandas não específicas entre p66 e gp120
6	(p24p51p55)
7	(p18p24)
8	(p24p66)
9	p24
10	(p24p66gp120)

BANDAS EM PARENTÊSE FORAM FRACAMENTE REATIVAS

Em outro estudo realizado por Celum *et AL*, de 89 pacientes com testes repetidamente reativos para Elisa e com resultados indeterminados para Western Blot, 4 pacientes, todos de alto risco para infecção por HIV, sorocverteram com 10 meses de seguimento.

Tebourski colaboradores estudaram as discrepâncias entre os resultados de Western Blot interpretados conforme os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Centro de Controle de Doenças Infecciosas (CDC) e elucidaram os resultados conflitantes utilizando o teste de PCR, como padrão ouro. Posteriormente propuseram um algoritmo que diminuiria o número de resultados indeterminados no WB e limitaria a necessidade pelo teste de PCR, promovendo uma diminuição nos custos sem perder a acurácia diagnóstica.

Das 737 amostras testadas para HIV, 21 (4,5%) foram discordantes. Todas as amostras discordantes foram “positivas”, de acordo com o critério do CDC e indeterminadas de acordo com o critério da OMS. Todas as amostras discordantes foram submetidas ao teste de PCR e, destas amostras, duas apresentaram carga viral detectável e 19 foram consideradas negativas (carga viral indetectável). Além disso, as 19 amostras consideradas positivas pelo CDC foram, de fato, falso-positivas.

Ainda utilizando o teste de PCR, foram analisadas as amostras duplamente indeterminadas (n=31) tanto pelo critério do CDC quanto pelo critério da OMS e nenhuma amostra demonstrou carga viral detectável.

Os autores sugerem que amostras com resultados indeterminados por ambos os critérios (CDC e OMS) podem ser reportadas como negativas.

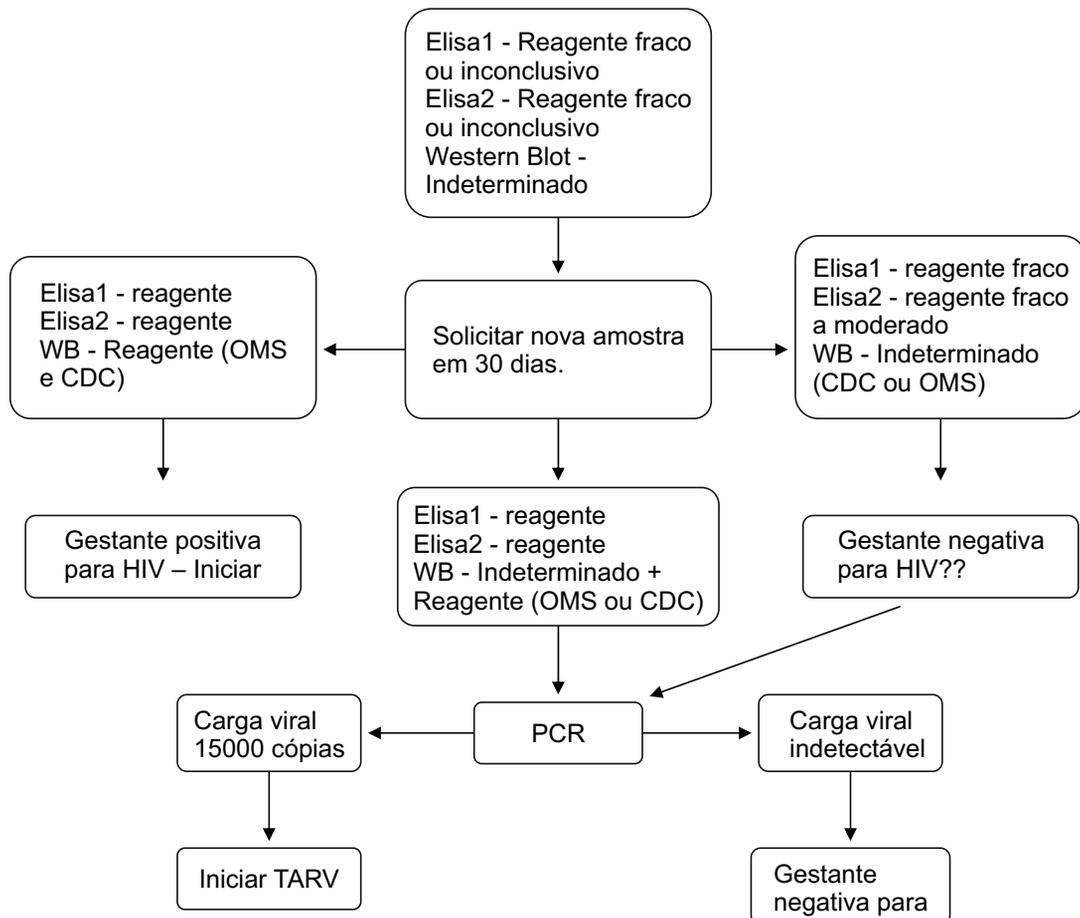
A partir dos argumentos colocados anteriormente, sugerimos um algoritmo para tomadas de decisões com intuito de se utilizar a TARV somente nos casos em que haja uma evidência “sorológica” para tal.

Ressalta-se, ainda, que a adoção de técnicas mais específicas para confirmação diagnóstica (PCR) requer um aporte de recursos financeiros, o que nem sempre é possível, nos países em desenvolvimento (TEBOURSKI, et al., 2004; MAHÉ et al., 2002). Acreditamos que o algoritmo proposto promoveria uma diminuição das amostras que necessitariam de confirmação por PCR resultando numa diminuição de custos sem perda da confiabilidade do resultado.

PCR – Reação em cadeia da polimerase; TARV – Terapia anti-retroviral, Reagente fraco: teste com valor de leitura que ultrapassa o valor de corte (cut off) porém se mantém muito próximo a este (reatividade baixa); Inconclusivo: teste com valor de leitura que não ultrapassa a faixa de corte (zona cinza).

WB – sempre analisado (classificado) conforme critérios da OMS e CDC.

Carga Viral  $\geq$  15000 – evitar falso positivo



## DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição a drogas e a substâncias químicas sabidamente carcinogênicas em indivíduos adultos é preocupante e estes carcinógenos são ainda mais potentes quando a exposição ocorre durante o desenvolvimento embrionário. A exposição de gestantes de numerosas espécies, incluindo primatas não humanos, a alguns carcinógenos resulta em neoplasias em sua descendência. Análogos nucleosídeos da transcriptase reversa como a Zidovudina (AZT) incorporam-se no núcleo e no DNA mitocondrial, possibilitando toxicidades a curto ou a longo prazo. Em células de mamíferos tem-se observado efeitos genotóxicos do AZT como mutações genéticas, alterações nas cromátides irmãs, formação de micronúcleos e aberrações cromossômicas (POIRIER et al., 2004).

Ainda a exposição intra-uterina ou no puerpério a análogos nucleosídeos tem sido associada com rara, mas clinicamente significativa disfunção mitocondrial, resultando em sintomas neurológicos (NOGUERA, A. et al., 2004).

Devemos ressaltar que a transmissão vertical do HIV tem sido dramaticamente reduzida em países em desenvolvimento graças à terapia anti-retroviral (TARV) e a outras medidas como cesariana eletiva, porém a morbidade que a TARV pode causar nos fetos e recém-natos de gestantes infectadas ainda não está clara (NOGUERA, A. et al., 2004). Mais preocupante é o fato que gestantes e conseqüentemente seus fetos estão sendo expostos a drogas anti-retrovirais sem ter seu diagnóstico sorológico para HIV definido.

Tal fato pode gerar conseqüências danosas tanto para gestante quanto para o feto.

Medidas adicionais como as propostas no presente artigo podem contribuir para uma melhor seleção de pacientes que necessitam de exames mais específicos como a determinação da carga viral por PCR, elucidando o diagnóstico sorológico do HIV neste grupo de gestantes.

A adoção destas medidas pode proporcionar uma diminuição dos custos diretos (tratamento da gestante, do recém-nato com drogas anti-retrovirais) e indiretos (danos físicos e psicológicos).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CELUM, C.L. et al. Risk factors for repeatedly reactive HIV-1 EIA and indeterminate western blots. A population-based case-control study. *Arch. Intern. Med.*, v.154, p.1129-1137, 1994.
- CREMONEZI, D. et al. Prevalence of indeterminate human immunodeficiency virus western blot results in pregnant women attended at a public hospital in President Prudente, Brazil. *Braz. J. Infectious Disease*, v.9, n.6, p.506-509, 2005.

- GURTNER, L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet*, v.348, p.176-179, 1996.
- IWEALA, O.I. HIV diagnostic tests: an overview. *Contraception*, v.70, p.141-147, 2004.
- JACKSON, J.B. et al. Practical diagnostic testing for human immunodeficiency virus. *Clinical Microbiol. Reviews*, v.1, n.1, p.124-138, 1988.
- MACHADO, A.A. et al. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). *Medicina*, Ribeirão Preto, v.32, p.138-146, 1999.
- MAHÉ, C. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Western blot: revised diagnostic criteria with fewer indeterminate results for epidemiological studies in Africa. *Int. J. Epidemiol.* v.31, p.985-990, 2002.
- MYLONAKIS, E. et al. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am. J. Med.*, v.109, p.568-576, 2000.
- NOGUERA, A. et al. Hyperlactemia in human immunodeficiency virus-uninfected infants who are exposed to antiretrovirals. *Pediatrics*, v.114, n.5, p.598-603, 2004.
- NUWAYHID, N.F. Laboratory tests for detection of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v.2, n.6, p.637-645, 1995.
- PEREIRA, J.M. Avaliação de ensaio molecular para determinação de carga viral em indivíduos sorologicamente negativos para HIV-1. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v.38, n.1, p.21-23, 2002.
- POIRIER, M.C. et al. Perinatal genotoxicity and carcinogenicity of anti-retroviral nucleoside analog drugs. *Toxicol. App. Pharmacol.* v.199, p.151-161, 2004.
- Portaria Ministerial 059/2003. Disponível em: [http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B41015A25-0442-4811-9AD0-06735E0AC199%7D/Portaria\\_59\\_novo\\_algoritmo.pdf](http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B41015A25-0442-4811-9AD0-06735E0AC199%7D/Portaria_59_novo_algoritmo.pdf). Acesso em: 19/08/2006.
- Protocolo Mãe Curitiba, p.70-80. Disponível em: <http://www.curitiba.pr.gov.br/saude/sms/protocolos/cap3.pdf>. Acesso em: 14 ago.2006.
- TEBOURSKI, F. et al. The significance of combining World Health Organization and Center for Disease Control criteria to resolve indeterminate human immunodeficiency virus type-1 Western blot results. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* v.48, p.59-61, 2004.
- TANG, Y. et al. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, v.43, p.2021-2038, 1997.