Imunodiagnóstico das Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs)

Profª. Msc. Luanda Bárbara Ferreira Canário de Souza

O que são as ISTs ?

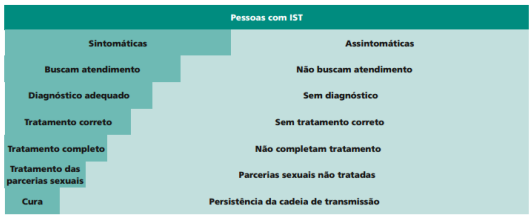
- Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)
- Terminologia adotada em substituição à expressão **Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST)**
- São causadas por mais de 30 agentes etiológicos (vírus, bactérias, fungos e protozoários)
- Transmissão
  - Contato sexual (oral, vaginal, anal) sem o uso de preservativo
  - Gestação, parto ou amamentação
  - Eventualmente, Corrente sanguínea

Representação esquemática de vírus, bactérias e protozoários.

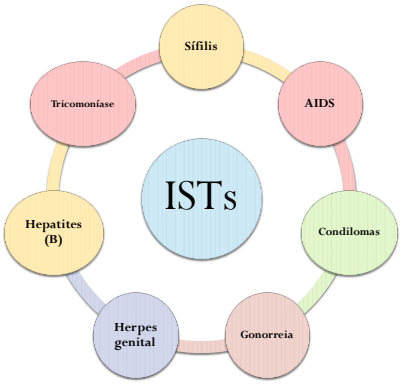
O que são as ISTs ?

- As IST são frequentes, têm **múltiplas etiologias** e **apresentações clínicas**;
- Causam impacto na **qualidade de vida** das pessoas, nas relações pessoais, familiares e sociais.
- Essas infecções podem se apresentar sob a forma de síndromes: úlceras genitais, corrimento uretral, corrimento vaginal e entre outras manifestações;
- O diagnóstico e tratamento das pessoas com IST e de suas parcerias sexuais interrompe a cadeia de transmissão, prevenindo outras infecções e possíveis complicações.

Barreira ao controle de IST: perdas em diferentes níveis entre a infecção e a cura



Fonte: adaptado de OMS/RHR, 2005.



Diagnóstico Laboratorial das ISTs

Imunodiagnóstico

- Técnicas **sem** uso de marcadores
  - Reações de Precipitação
  - Reações de Aglutinação

Detectam / quantificam as conseqüências da ligação Ag – Ac

- Técnicas **com** uso de marcadores
  - ELISA
  - Citometria de fluxo
  - Imunofluorescência
  - Radioimunoensaio

Detectam / quantificam diretamente a ligação Ag – Ac

Sífilis

- IST causada pelo *Treponema pallidum*
  - Pouco conhecimento sobre a biologia
  - Dificuldade de cultivo
- Transmissão
  - Sexual
  - Vertical

Fases da Sífilis

Sífilis Primária → Sífilis Secundária → Sífilis Terciária

- Lesão única localizada
- Indolor
- Secreção com muitos *T. pallidum*
- Cura espontaneamente em até 2 semanas

- Invasão de órgãos e líquidos do corpo pelo *T. pallidum*
- Erupções cutâneas ricas em treponemas

- 10 ou mais anos para se manifestar
- Inflamação e destruição de tecidos
- Neurossífilis e sífilis cardíaca

Fa

- Sífil
  - S
  - A
  - C

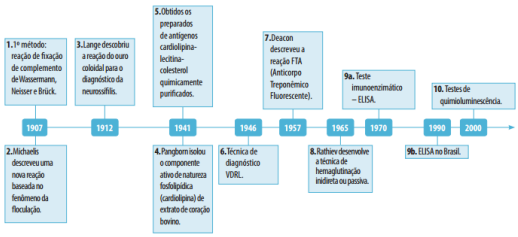
iria não

odo

- Sífil
  - P
  - C
  - A

ões
ntas dos

Histórico Diagnóstico Laboratorial da Sífilis



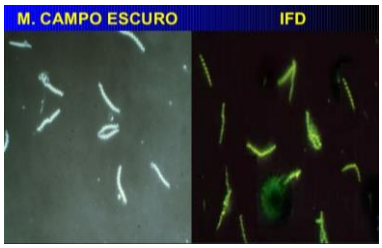
Diagnóstico da Sífilis

- Pesquisa Direta do *T. pallidum*
- Testes Não Treponêmicos
- Testes Treponêmicos

Pesquisa direta do *T. pallidum*:

Técnica	Testes
Microscopia	A fresco em campo escuro Coloração (Fontana-Tribondeaux ou Imunfluorescência Direta)

Quadro 1 – Técnicas para pesquisa do *T. pallidum*.



Diagnóstico da Sífilis

Testes treponêmicos

São testes que detectam anticorpos contra antígenos do *Treponema pallidum*.

Estes testes são qualitativos. Eles definem a presença ou ausência de anticorpos na amostra.

Testes não treponêmicos

São testes que detectam anticorpos não treponêmicos, anteriormente denominados anticardiolipínicos, reagínicos ou lipoídicos. Esses anticorpos não são específicos para *Treponema pallidum*, porém estão presentes na sífilis. Os testes não treponêmicos podem ser:

- **qualitativos** – rotineiramente utilizados como testes de triagem para determinar se uma amostra é reagente ou não;
- **quantitativos** – são utilizados para determinar o título dos anticorpos presentes nas amostras que tiveram resultado reagente no teste qualitativo e para o monitoramento da resposta ao tratamento. O título é indicado pela última diluição da amostra que ainda apresenta reatividade ou floculação visível.

TESTES NÃO TREPONÊMICOS

* **Teste Triagem**
* **Efeito Pró-Zona**
* **Soro negativação espontânea em 25% dos infectados não tratados**
* **Falso Positivo: hepatite, mononucleose, pneumonia, tuberculose, hanseníase, doenças do tecido conjuntivo (LES), doenças malignas, mieloma.**
* **Falso Negativo: Fase primária e fase tardia**
* **Diagnóstico e Resposta Terapêutica**

Nos testes não treponêmicos:

Técnica	Testes
Floculação	VDRL (*Venereal Disease Laboratory*) RPR (*Rapid Test Reagin*) USR (*Unheated Serum Reagin*) TRUST (*Toluidine Red Unheated Serum Test*)
Aglutinação	Testes Rápidos – TR
Imunoenzimáticos (ELISA)	ELISA (*Enzyme – linked immunossorbent assay*)
Imunocromatográficos	Testes Rápidos – TR

Quadro 2 – Técnicas para testes não treponêmicos.

Testes Não Treponêmicos

Resultados falso-positivos podem ser **permanentes:**

- em portadores de lupus eritematoso sistêmico;
- na síndrome antifosfolipídica e em outras colagenoses;
- na hepatite crônica;
- em usuários de drogas ilícitas injetáveis;
- na hanseníase;
- na malária.

Resultados falso-positivos podem também ocorrer **transitoriamente:**

- em algumas infecções;
- após vacinações;
- no uso concomitante de medicamentos;
- após transfusões de hemoderivados;
- na gravidez;
- em idosos.

Testes de floculação

Os testes de floculação baseiam-se em uma suspensão antigênica que contém cardiolipina, colesterol e lecitina.

No preparo da suspensão antigênica, a ligação desses componentes ocorre ao acaso e resulta na formação de estruturas arredondadas denominadas micelas, conforme você pode ver na figura adiante.

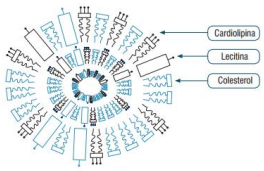


Figura 1 – Representação esquemática do antígeno dos testes não treponêmicos, na forma de micelas.

Os anticorpos não treponêmicos presentes na amostra ligam-se às **cardiolipinas**[1] das micelas.

A ligação de anticorpos em várias micelas resulta na floculação, que pode ser observada ao microscópio. Veja a figura a seguir, que representa a ligação de várias micelas por meio dos anticorpos.

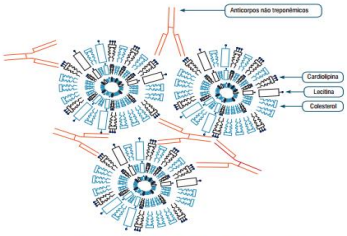
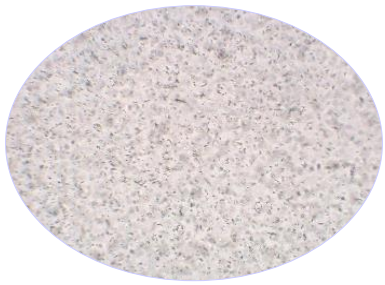


Figura 2 – Representação esquemática de uma reação de floculação na qual os anticorpos não treponêmicos ligam-se simultaneamente em várias micelas.

Essa ligação é encontrada na forma de flocos ou grumos, grandes ou pequenos, que podem ser visualizados a olho nu em alguns testes e em outros com auxílio de microscópio.

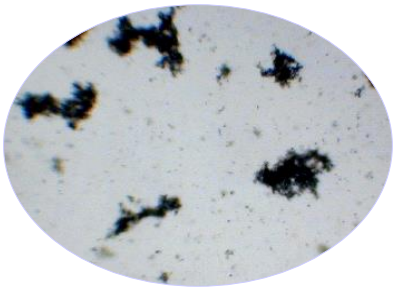
VDRL

(Venereal Disease Research Laboratory)



VDRL

(Venereal Disease Research Laboratory)



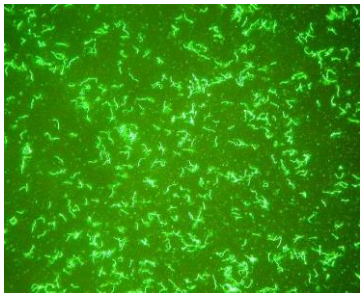
Nos testes treponêmicos:

Técnica	Testes
Imunofluorescência indireta	FTA-abs (*Fluorescent treponemal antibody absorption*)
Hemaglutinação	MHA-TP (*microhemaglutinação para Treponema pallidum*)
Aglutinação de partículas	TPPA (*Treponema pallidum particle agglutination assay*)
Imunoenzimáticos e suas variações	ELISA (*Enzyme-linked immunossorbent assay*), CMIA (Ensaio imunológico quimioluminescente magnético)
Imunocromatografia	Testes rápidos
Testes moleculares	Reação de amplificação do DNA da bactéria como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Quadro 3 – Técnicas para testes treponêmicos.

TESTES TREPONÊMICOS

FTA-ABS: Fluorescent Treponemal Antibody Absorption



Princípio metodológico da reação de FTA-abs

A reação de FTA-abs é uma técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Essa técnica utiliza *Treponema pallidum* (da cepa Nichols) fixado em áreas demarcadas de lâminas de vidro em que são feitas as reações. Veja na Figura 1 a representação do seu princípio metodológico.

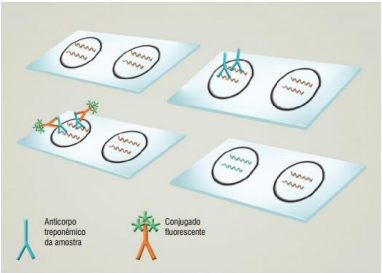
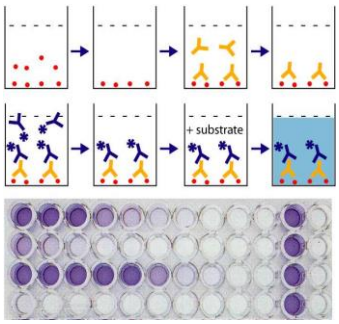


Figura 1 – Representação esquemática de uma reação de imunofluorescência indireta.

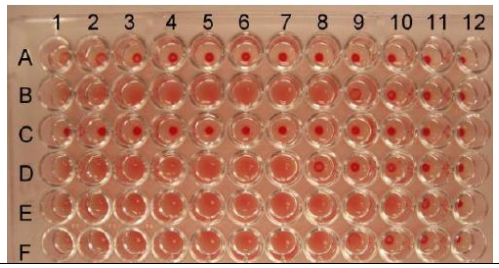
ELISA



TPHA: *Treponema pallidum* Hemagglutination

O teste de hemaglutinação indireta ou passiva baseia-se na ligação dos anticorpos treponêmicos presentes no soro com hemácias que contêm, na sua superfície, antígenos de *Treponema pallidum* (cepa Nichols).

Os anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos que estão na superfície das hemácias, resultando na hemaglutinação.



Numa leitura e interpretação da reação de hemaglutinação ou de aglutinação, os resultados possíveis são estes:

Reagente

Quando há hemaglutinação (ou aglutinação), forma-se uma rede ou "tapete" de hemácias (ou de partículas de gelatina) unidas aos anticorpos, a qual se espalha por toda a superfície do poço da placa em que foi realizada a reação;

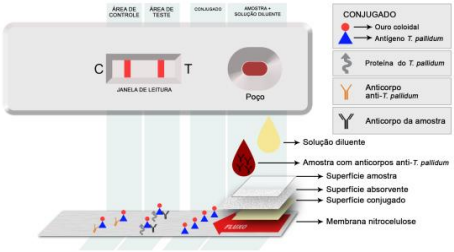
Não reagente

Quando não há hemaglutinação, as hemácias (ou as partículas de gelatina) se depositam e formam um botão compacto no fundo do poço da placa em que a reação foi realizada;

Inconclusiva

Neste caso, não há formação completa da hemaglutinação nem do botão, por isso se observa um misto dos dois, não sendo possível definir se a amostra é reagente ou não reagente. Quando isso ocorre, o teste deve ser repetido.

Testes Rápidos



Reagente – quando há formação de uma linha colorida na área T e outra na área C. Um resultado reagente indica que há anticorpos antitreponêmicos detectáveis na amostra do indivíduo (Figura 5);

Figura 5 - Teste rápido de fluxo lateral reagente

Não reagente – quando há formação de linha colorida apenas na área C. Um resultado não reagente indica que não há anticorpos antitreponêmicos detectáveis na amostra do indivíduo (Figura 6);

Figura 6 - Teste rápido de fluxo lateral não reagente

Teste Inválido – se não houver formação de linha colorida na área C, o teste será considerado inválido, independentemente do resultado obtido na área T. Neste caso, o teste deverá ser repetido (Figuras 7 e 8).

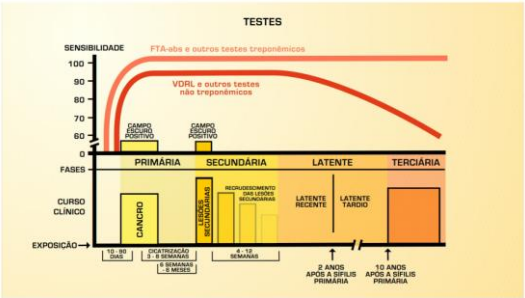


Gráfico 1 - Relação entre os testes para diagnóstico da Sífilis, as fases da doença, o curso clínico da infecção e o tempo.
Fonte: Ministério da Saúde

HIV
Vírus da Imunodeficiência Humana

Estrutura do HIV

- Partícula esférica
- Mede de 100 a 120 nm de diâmetro
- Pertencente ao gênero *Lentivirinae* e família *Retroviridae*
- Duas cópias de RNA de cadeia simples, encapsuladas por uma camada proteica ou núcleo-capsídeo, capsídeo e um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica.

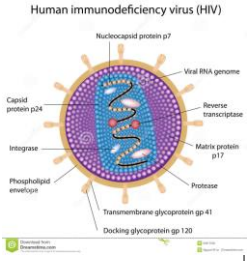
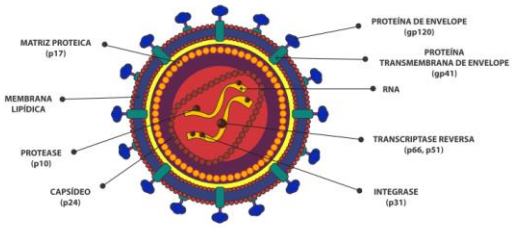


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do HIV-1



Fonte: DDAHV/SVS/MS.

Transmissão

Assim pega

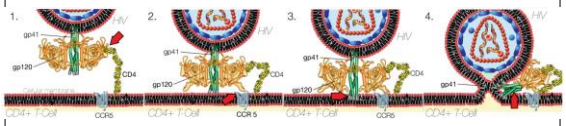
- sexo vaginal sem camisinha
- sexo anal sem camisinha
- sexo oral sem camisinha
- uso da mesma seringa ou agulha por mais de uma pessoa
- transfusão de sangue contaminado
- mãe infectada pode passar o HIV para o filho durante a gravidez, o parto e a amamentação
- Instrumentos que furam ou cortam, não esterilizados

Assim não pega

- sexo, desde que se use corretamente a camisinha
- masturbação a dois
- beijo no rosto ou na boca
- suor e lágrima
- picada de inseto
- aperto de mão ou abraço
- talheres / copos
- assento de ônibus
- piscina, banheiros, pelo ar
- doação de sangue
- sabonete / toalha / lençóis

Interação do vírus HIV com a célula hospedeira

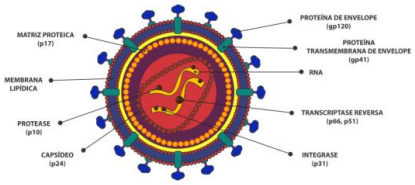
- O vírus HIV infecta preferencialmente os linfócitos T CD4+.
- O primeiro passo da infecção consiste na ligação da gp120 ao CD4 do linfócito, após a qual há uma mudança na conformação da mesma gp 120 que interage com outro receptor, o CCR5, permitindo uma ligação mais eficaz entre o vírus e a célula.



Principais proteínas de importância diagnóstica

- Proteínas do envelope viral (gp160, gp120 e gp41)
- Proteínas codificadas pelo gene gag (p55, p24 e p17) e
- Proteínas codificadas pelo gene pol (p66, p51, p31).

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do HIV-1



Fonte: DDAHV/SVS/MS.

Cinética da infecção

- **Janela clínica ou janela aguda ou período de incubação:**
  - definem o período entre o momento da infecção e o aparecimento dos sintomas e/ou sinais clínicos.
- **Janela de soroconversão ou janela imunológica ou janela sorológica:**
  - duração do período entre a infecção pelo HIV até a primeira detecção de anticorpos anti-HIV, a qual inclui a fase aguda e a fase eclipse.

Cinética da infecção

- **Janela diagnóstica:**
  - Conceito mais amplo do que o de janela imunológica ou sorológica.
  - É o tempo decorrido entre a **infecção e o aparecimento ou detecção de um marcador da infecção**, seja ele RNA viral, DNA pró-viral, antígeno p24 ou anticorpo.
  - A duração desse período depende do tipo do teste, da sensibilidade do teste e do método utilizado para detectar o marcador.

Diagnóstico Laboratorial

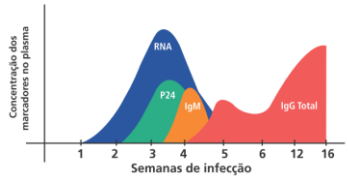
- São **testes de triagem** para detecção de anticorpos anti-HIV (testes sorológicos):
  - Várias gerações de ensaio por imunoabsorbância ligado à enzima (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*– Elisa)
  - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Immuno Assay* – EIA)
  - Ensaio Imunoenzimático com Micropartículas (*Microparticle Enzyme Immuno Assay* – Meia) e
  - Ensaio imunoenzimático com quimioluminiscência.
  - Imunofluorescência (IFA)
  - Radioimunoensaio (RIA)

Diagnóstico Laboratorial

- São **testes confirmatórios**:
- 1) testes sorológicos (detecção de anticorpos anti-HIV):
  - Imunofluorescência indireta, Imunoblot, Western Blot, aglutinação
- 2) testes virais (detecção de RNA ou DNA do HIV):
  - Teste de amplificação de ácidos nucléicos, como a reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) e
  - Amplificação seqüencial de ácidos nucléicos (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification* – Nasba).

Marcadores

Figura 5 - Marcadores da infecção pelo HIV na corrente sanguínea de acordo com o período que surgem após a infecção, seu desaparecimento ou manutenção ao longo do tempo.



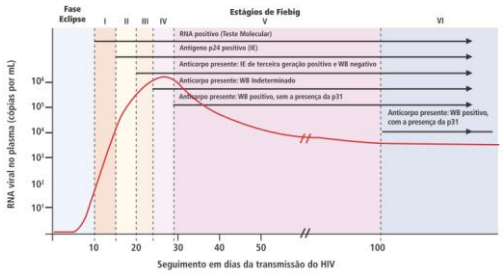
(Fonte: BUTTÒ, S.; SULIGOI, B.; FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Ann. Ist. Super. Sanità*, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 24-33, 2010. Adaptado de: HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil Telelab/MS).

SISTEMA DE ESTAGIAMENTO LABORATORIAL DA INFECÇÃO RECENTE PELO HIV

CLASSIFICAÇÃO DE FIEBIG

- Estágio 0 (ou período de eclipse): é caracterizado pela ausência de marcadores virais em amostras de sangue. Esse período tem uma duração média de 10 dias, a partir da infecção até a primeira detecção de RNA viral;
- Estágio I: o RNA viral é consistentemente detectável em amostras de sangue e nenhum outro ensaio laboratorial é positivo. A duração média desse estágio é de 5 dias;
- Estágio II: os testes para RNA viral e antígeno p24 são positivos, mas os anticorpos estão ausentes (não reagente) no IE. A duração média desse estágio é de 5,3 dias;
- Estágio III: RNA, antígeno p24 e IE de terceira geração (sensíveis à detecção de IgM anti-HIV) são reagentes, mas o Western blot não mostra bandas específicas do HIV-1. Esse estágio é o mais curto e tem duração média de 3,2 dias;
- Estágio IV: como o estágio III, mas com padrão indeterminado no Western blot, ou seja, a presença de bandas específicas de HIV-1, mas que não preenchem os critérios de interpretação de WB positivo, que é definido pela presença de duas de três bandas seguintes: p24, gp41 ou gp120/160. A duração média é de 5,6 dias;
- Estágio V: como o estágio IV, mas com padrão positivo de Western blot, exceto pela ausência de reatividade da proteína p31 (pol). Esse estágio é mais longo e o tempo médio até o aparecimento da p31 é de 69,5 dias;
- Estágio VI: como o estágio V, mas com o padrão de reatividade do Western blot completo, incluindo a banda p31. A duração desse estágio não é definida; no entanto, ele pode ser subdividido em dois períodos de infecção: recente e crônica.

Figura 13 - Estágios da infecção recente pelo HIV-1. A análise de amostras de indivíduos recentemente infectados pelo HIV-1 revelou que as primeiras semanas após a infecção podem ser divididas em estágios com base no padrão de reatividade de diferentes ensaios laboratoriais.



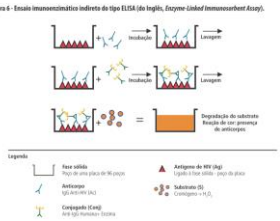
(Modificado de: MCMICHAEL, A.; BORROW, P.; TOMARAS, G. D. et al. The imune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev.*, [S.l.], v. 10, p. 11-23, 2010).

Principais testes de diagnóstico

Imunoensaios (IE)

- 1ª geração
  - Formato indireto, ou seja, a presença de anticorpos específicos é detectada por um conjugado constituído por um anticorpo anti-IgG humana.
  - Na fase sólida, os antígenos são originados de um lisado viral de HIV.
  - Essas características tornam o ensaio pouco específico e, pelo fato de **detectarem apenas IgG**, também são menos sensíveis

Figura 6 - Ensaio imunoenzimático indireto do tipo ELISA (do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).



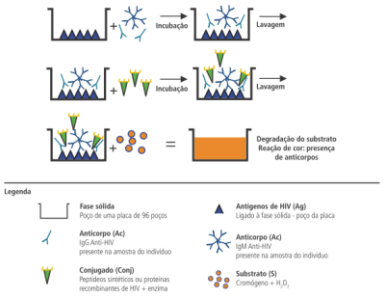
Imunoensaios (IE)

- 2ª geração
  - Também tem formato indireto; porém, utiliza antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados de proteínas do HIV.
  - Em comparação com os ensaios de primeira geração, os de segunda geração são **mais sensíveis e específicos, por conter uma maior concentração de proteínas** (epítopos imunodominantes) relevantes.

ELISA 3ª geração

- O ensaio de terceira geração tem o formato "sanduíche" (ou imunométrico).
- A característica desse ensaio é utilizar antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos tanto na fase sólida quanto sob a forma de conjugado.
- **Esse formato permite a detecção simultânea de anticorpos anti-HIV IgM e IgG**. A possibilidade de detectar anticorpos da classe IgM torna esse ensaio mais sensível do que os de gerações anteriores.
- Há aumento da especificidade, pois o conjugado (antígenos) liga-se apenas à valência livre do anticorpo que está no complexo imune (antígenos na fase sólida do ensaio e anticorpos da amostra). Em média, a **janela de soroconversão dos ensaios de terceira geração é de 22 a 25 dias**.

Figura 7 – Ensaio imunoenzimático "sanduíche" ou imunométrico de terceira geração do tipo ELISA (do inglês, *enzyme- linked immunosorbent assay*)

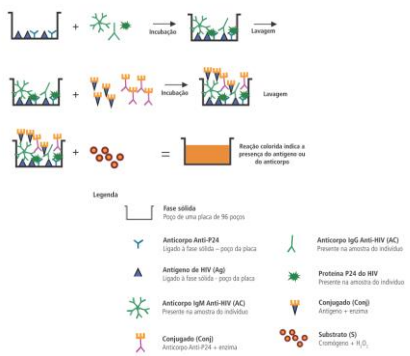


Fonte: Adaptado de HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS.

ELISA 4ª geração

- O ensaio de quarta geração **detecta simultaneamente o antígeno p24 e anticorpos específicos anti-HIV**.
- O componente de detecção de anticorpo tem o formato de "sanduíche"; portanto, **detecta todas as classes de imunoglobulinas contra proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados das glicoproteínas gp41 e gp120/160**.
- O componente de **detecção de antígeno p24 é constituído por um anticorpo monoclonal na fase sólida (para capturar o antígeno p24 presente no soro) e de um conjugado constituído por um antissoro (anticorpo) poliespecífico contra a proteína p24**.
- Em média, a janela diagnóstica dos ensaios de quarta geração é de aproximadamente 15 dias, dependendo do ensaio utilizado.

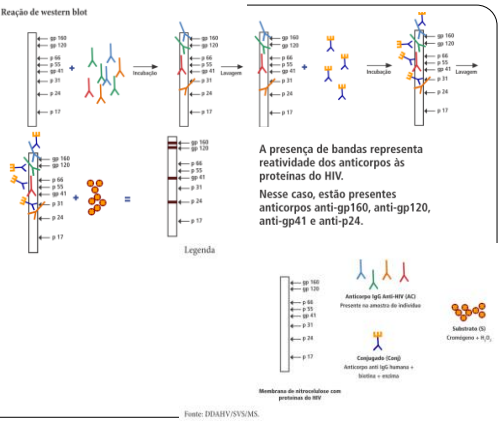
Figura 8 - Ensaio imunoenzimático sanduíche ou imunométrico de quarta geração do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).



Western Blot e Imuno Blot

- O WB e o IB empregam proteínas nativas do HIV separadas por eletroforese (WB) e transferidas para uma membrana ou proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos impregnados diretamente em membranas (IB). Estas são incubadas com amostras de soro ou plasma.
- Os anticorpos presentes na amostra se ligam especificamente às proteínas imobilizadas nas membranas de WB ou IB e esses anticorpos anti-HIV específicos ligados às proteínas são detectados por anticorpos secundários, conjugados com uma enzima, seguido por um substrato que gera um produto colorido que precipita onde o complexo imune está localizado.

Figura 12 – Reação de western blot



Fonte: DDAHV/SVS/MS.

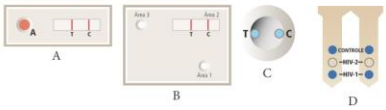
Testes Rápidos

- Os testes rápidos (TR) são imunoensaios (IE) simples, que podem ser realizados em até 30 minutos.
- Existem vários tipos:
  - dispositivos (ou tiras) de imunocromatografia de fluxo lateral, imunocromatografia de duplo percurso (DPP), dispositivos de imunoconcentração e fase sólida.
- Testes rápidos são, primariamente, recomendados para testagens presenciais.
- Podem ser feitos com amostra de sangue total obtida por punção venosa ou da polpa digital, ou com amostras de fluido oral. Dependendo do fabricante, podem também ser realizados com soro e (ou) plasma.

Testes Rápidos

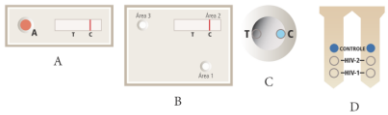
- Os testes rápidos podem ser usados para pesquisar antígenos ou anticorpos contra os agentes infecciosos para os quais foram projetados.
  - Caso o teste seja para pesquisa de anticorpos, haverá antígenos (usualmente proteínas sintéticas) imobilizados, na membrana de nitrocelulose, para a captura dos anticorpos presentes na amostra.
  - Caso a pesquisa seja para antígenos, haverá anticorpos imobilizados para a captura dos antígenos presentes na amostra.

Figura 10 – Exemplos de testes rápidos (TR) reagentes para HIV. Observa-se presença de linha ou ponto na área T (Teste) e na área C (Controle), (A) imunocromatografia de fluxo lateral, (B) imunocromatografia de duplo percurso– DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida



Fonte: Adaptado de HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS.

Figura 11 – Exemplos de testes rápidos (TR) não reagentes para HIV. Observa-se presença de linha ou ponto apenas na área C (Controle), (A) imunocromatografia de fluxo lateral, (B) imunocromatografia de duplo percurso – DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida



Fonte: Adaptado de HIV - Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS.

Acompanhamento e monitoramento do paciente HIV+

- Contagem de CD4+ e CD8+
  - Técnica: Citometria de fluxo
- Contagem da carga viral
  - Técnica: teste molecular para quantificação do material genético do vírus
    - PCR, NASBA, NAT

Citômetro de Fluxo

FACS – Fluorescence activated cell sorter

BD FACSCalibur,
Becton & Dickinson
4 cores (4 marcadores a serem caracterizados)

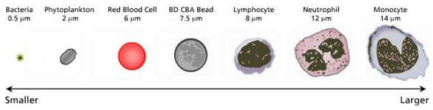
8 cores

BD FACSCantoII,
Becton & Dickinson

Princípios Básicos da Citometria de Fluxo

CITO	METRIA	de	FLUXO
⇩	⇩		⇩
CÉLULA	MEDIDA		MOVIMENTO

Técnica que serve para separar, contar, examinar e classificar partículas microscópicas (ex. células, cromossomos, microvesículas, nanovesículas,....) suspensas em meio líquido em fluxo;



Citometria de Fluxo: Vantagens

É uma tecnologia que permite estudar **várias características** de uma célula de **forma rápida** e **por vários parâmetros** (multiparamétrica);

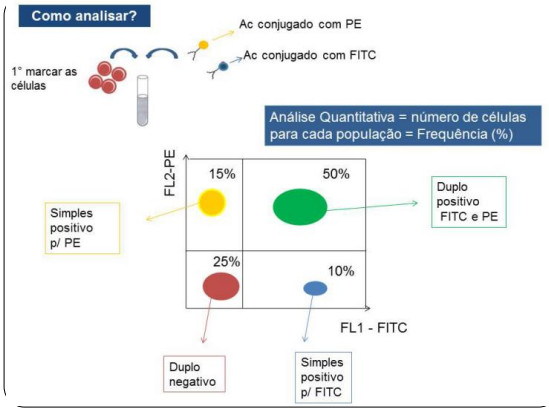
Parâmetros:

- **FSC**: (Forward SCatter) - mede **tamanho** relativo da célula
- **SSC**: (Side SCatter) – **granulosidade** ou complexidade da célula

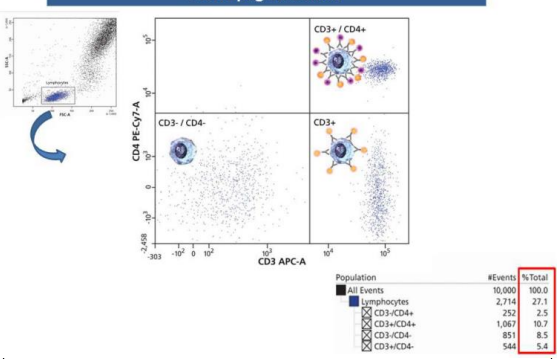
} **Morfologia celular**

- **FL**: Intensidade de **fluorescência** (vários canais: FL1, FL2, FL3, FL4, FL5....)

Como analisar?



Fenotipagem Celular



Population	#Events	%Total
All Events	10,000	100.0
Lymphocytes	2,714	27.1
CD3-/CD4+	252	2.5
CD3+/CD4+	1,067	10.7
CD3-/CD4-	851	8.5
CD3+/CD4-	544	5.4

Obrigada!

luanda_canario@hotmail.com