

Estudo comparativo entre os resultados de testes para diagnóstico da infecção do vírus da imunodeficiência humana em amostras de soro e de saliva

Silvia Cardoso * Lucilene de Lima Rodrigues * Gisele Maria Cappi Soler * Luciana de Oliveira Basso

J Bras Doenças Sex Transm, 7(1): 4 - 8, 1995

O objetivo do estudo é comparar os resultados de testes para o diagnóstico da infecção do vírus da imunodeficiência humana em amostras de soro e saliva.

Foram estudados 20 indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana, 20 indivíduos sem esta infecção e clinicamente saudáveis e 12 indivíduos com enfermidades auto-imunes e outros tipos de infecções. De todos foram colhidas amostras de sangue e saliva, a primeira por punção venosa, através de coleta por sistema a vácuo, a segunda com o dispositivo para a coleta de amostras de saliva "OMNISAL" (Saliva Diagnostics Systems, Inc.).

As amostras, tanto de saliva como de soro, foram analisadas pela técnica de Elisa, utilizando-se os seguintes testes: HIV-1 recombinante (Abbott), HIV-1/HIV-2 recombinante (Abbott), LAV-EIA (Genetic Systems), como também pela técnica de aglutinação de partículas, utilizando-se Serodia HIV (Fujirebio, Inc) para testes.

Todas as amostras (soro e saliva), cujos resultados foram reagente pela técnica empregada, foram confirmados com a técnica de imunoeletrotransferência, Western Blot (Organon Tekinika).

Os autores concluíram que os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação entre as amostras de soro e saliva, e que amostras de saliva podem ser utilizadas nas provas de detecção de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana.

Palavras-chave: HIV em soro e saliva

Summary

The objective of the study to compare the results of diagnostic tests for HIV infection in serum and saliva samples.

We studied 20 patients infected with HIV, 20 healthy persons and 12 persons with other infectious and auto-immune persons.

We collected serum and saliva samples of all, the serum samples were obtained using venous puncture and saliva specimens were obtained using the "omnisal" (Saliva Diagnostics Systems, Inc.).

The samples (serum and saliva) were assayed by the following tests: HIV-1 RECOMBINANT (Abbott), HIV-1/HIV-2 recombinant (Abbott), LAV-EIA (Genetic Systems) and the indirect agglutination

using the Serodia - HIV (Fujirebio, Inc.)

All the positive samples (serum and saliva) were confirmed by Western Blot assay (Organon Tekinika).

The authors concluded that results showed a good correlation between the different kind of samples studied (serum and saliva) and detecting HIV antibodies in saliva samples is a good alternative method.

Key words: HIV in serum and saliva

I - Introdução

O diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foi amplamente estudado e desenvolvido para ser testado em amostras de soro, onde há maior concentração de anticorpos específicos contra o HIV.

Foi demonstrado que alguns fluidos corporais exceto o soro, contêm imunoglobulinas específicas contra o HIV, como a saliva e urina.*

A presença de anticorpos na saliva foi demonstrada pela primeira vez em 1960 por ELLISON et. al (4), e confirmada posteriormente. Os anticorpos da cavidade oral se originam pela difusão passiva do líquido intersticial da mucosa oral, secreção gengival e tecidos linfáticos da boca e da faringe, possuindo as mesmas propriedades funcionais que as imunoglobulinas encontradas no sangue^{1,2e4}

Os níveis aproximados de imunoglobulina G (UI/ml), variam na seguinte proporção: soro - 100; saliva - 0,4; urina 0,004*.

A manipulação de amostras de sangue implica em riscos de transmissão da infecção pelo HIV, por perfuração acidental com objetos contaminados, expondo os indivíduos do serviço de saúde à agentes biocontaminantes.

Estudos demonstram^{6e10} que nas amostras de saliva não existe até o momento, nenhuma prova documentada da transmissão de HIV, devido a um número reduzido de partículas virais presentes e também pela presença de substâncias na saliva que inibem o vírus.

A partir destes dados, a amostra de saliva tornou-se objeto de pesquisa, como uma alternativa para o diagnóstico da infecção pelo vírus HIV, principalmente devido ao baixo poder infectante, tanto na coleta da amostra, como na execução da análise.

* MAJOR, C. et. al. "Fluidos corporales alternativos para prueba de prevalência de HIV", Canadá, Ministério da Saúde, s.d. (comunicação de pesquisa).

* Farmacêutico-Bioquímico HU/USP

II - Objeto

O presente estudo, tem por objeto:

1 - avaliar o procedimento de coleta de saliva, utilizando-se o dispositivo comercial "OMNISAL" (Saliva Diagnostics Systems, Inc.).

III - Objetivo

O objetivo do presente trabalho é:

1 - comparar os resultados dos testes de triagem, como também de uma prova confirmatória, obtidos em amostras de soro e saliva com fins diagnóstico da infecção ocasionada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

2 - Verificar se as amostras de saliva podem ser utilizadas como uma alternativa ao diagnóstico da infecção pelo HIV.

IV - Materiais e Métodos

IV.1 - População Estudada

Foram estudadas 52 pessoas da comunidade assistida pelo Hospital Universitário da USP, dos quais foram distribuídos em quatro grupos.

Grupo 1: indivíduos soro positivos ao HIV-1, assintomáticos.

Grupo 2: pacientes soro positivos com síndrome da imunodeficiência adquirida

Grupo 3: indivíduos clinicamente sadios.

Grupo 4: pacientes com outras patologias, como: doenças autoimunes, infecções bacterianas, infecções virais.

IV.2 - Amostras

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, através de coleta por sistema à vácuo; o soro foi separado por centrifugação e congelado para posterior análise.

As amostras de saliva foram obtidas, utilizando-se um dispositivo comercial "OMNISAL" (Saliva Diagnostics Systems, Inc.) Este dispositivo consiste em uma placa de algodão esterilizada presa a um bastão de polipropileno que é introduzido na boca do paciente, após enxague com água, embaixo da língua, na parte posterior dos dentes. A haste de plástico em sua extremidade contrária à placa de algodão, possui um orifício com papel indicador, que se colore de azul quando da saturação da placa de algodão com a saliva.

Após a obtenção da saliva o dispositivo é introduzido em um frasco contendo solução tampão com azida sódica a 0,2% como preservativo.

Com auxílio de um agitador mecânico (Vortex), a placa de algo-

ção é despreendida da haste que é desprezada, ficando no frasco a solução tampão com a placa de algodão saturada de saliva. Neste frasco, é então introduzido um outro tubo contendo na extremidade inferior um filtro que pressiona a placa de algodão e por capilaridade o eluato é filtrado, este é transferido para tubos tipo Eppendorf e congelado para posterior análise.

IV.3 - Procedimento da Prova

Utilizou-se vários Kits comerciais de testes de triagem existentes para detecção de anticorpos anti-HIV; de diferentes metodologias a saber:

a) testes imunoenzimáticos (Elisa) - utilizou-se os seguintes testes

- a.1) HIV-1 recombinante (Abbott)
- a.2) HIV-1/HIV-2 recombinante (Abbott)
- a.3) LAV-EIA (Genetic Systems)

b) testes de aglutinação indireta, utilizando-se partículas de gelatina - Serodia-HIV (Fujirebio, Inc.)

c) teste de imunoeletrotransferência, técnica de Western Blot, prova confirmatória aos testes de triagem com resultados reagentes, utilizou-se HIV-1 Western Blot (Organon Tekinika).

Em todas as provas para a detecção de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana, foram utilizados os protocolos fornecidos pelo dispositivo especial de saliva "OMNISAL" (SDS, Inc.).

Verificou-se que a diferença existente em todos os protocolos, quando comparados com a técnica preconizada pelo fabricante dos testes, era o volume da amostra, que no caso da saliva é maior do que no soro, razão devida à menor concentração de imunoglobulinas e pelo fato do próprio dispositivo já diluir a saliva coletada.

IV.4 - Métodos Estatísticos

No presente estudo foram utilizados os seguintes métodos estatísticos: média, desvio-padrão e coeficiente de correlação segundo Spearman.

V - Resultados

Do total de 52 indivíduos estudados, 20 foram classificados como soropositivo; dos quais 10 assintomáticos; 10 com síndrome da imunodeficiência adquirida; 20 pessoas clinicamente sadias e 12 com outras patologias tais como: lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, infecções virais, infecções bacterianas.

Dos 52 indivíduos estudados, 24 (46,15%) correspondem ao sexo masculino e 28 (53,85%) ao sexo feminino, a idade média foi de 35 anos, com máximo de 60 anos e mínimo de cinco anos.

Nas provas de triagem, Elisa e aglutinação indireta, a correlação entre as 20 amostras reagentes, soro e saliva foi de 98,75% (Quadro I).

No total dos 52 resultados pareados, obteve-se uma correlação entre soro e saliva de 97,82% (Quadro I).

Quadro I - Resultados obtidos pelas técnicas de Elisa (Abbott, Genetic System) e aglutinação de partículas (Seródia), para determinação de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV1/2), em amostras de soro e saliva segundo o grupo estudado, o número de casos.

Grupo estudado	Nº	HIV -1 Abbott				HIV -2 Abbott				Genetic System				Seródia			
		reagente		não reagente		reagente		não reagente		reagente		não reagente		reagente		não reagente	
		sor	sali	sor	sali	sor	sali	sor	sali	sor	sali	sor	sali	sor	sali	sor	sali
Grupo 1	10	10	10	0	0	10	10	0	0	10	10	0	0	10	10	0	0
Grupo 2	10	10	10	0	0	10	10	0	0	10	10	0	0	10	9	0	1
Grupo 3	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20	0	0	20	20
Grupo 4	12	0	0	12	12	2	0	10	12	1	0	11	12	0	0	12	12
TOTAL	52	20	20	32	32	22	20	30	32	21	20	31	32	20	19	32	33

Notas: Grupo 1 - Soro positivo assintomáticos
 Grupo 2 - Soro positivos com síndrome da imunodeficiência adquirida
 Grupo 3 - Indivíduos clinicamente sadios
 Grupo 4 - Pacientes com outras patologias
 sor - soro
 sali - saliva

Quadro II - Resultados obtidos na prova confirmatória, pela técnica de Western Blot, em amostras de soro e saliva, de acordo com os resultados obtidos pelas técnicas de Elisa e Aglutinação indireta.

Interpretação do Western Blot	material biológico					
	SORO			SALIVA		
	positivo	indeterminado	negativo	positivo	indeterminado	negativo
REAGENTE	20	0	0	16	04	0
NÃO REAGENTE	0	0	05	0	0	05

Observação:
 (1) Soro reagente = 100% positividade no Western-Blot
 (2) Saliva reagente = 80% de positividade no Western-Blot e 20% indeterminados

Houve dois resultados falso-positivos no soro, no grupo de pacientes com outras patologias, uma dessas amostra, foi reagente em dois testes diferentes e não confirmada no Western Blot, o mesmo não ocorreu com a amostra de saliva.

Na prova confirmatória, técnica de Western Blot, as 20 amostras reagentes demonstraram 100% de positividade com amostras de soro e 80% com amostras de saliva; os 20% restantes das amostras de saliva, foram consideradas indeterminadas (Quadro II).

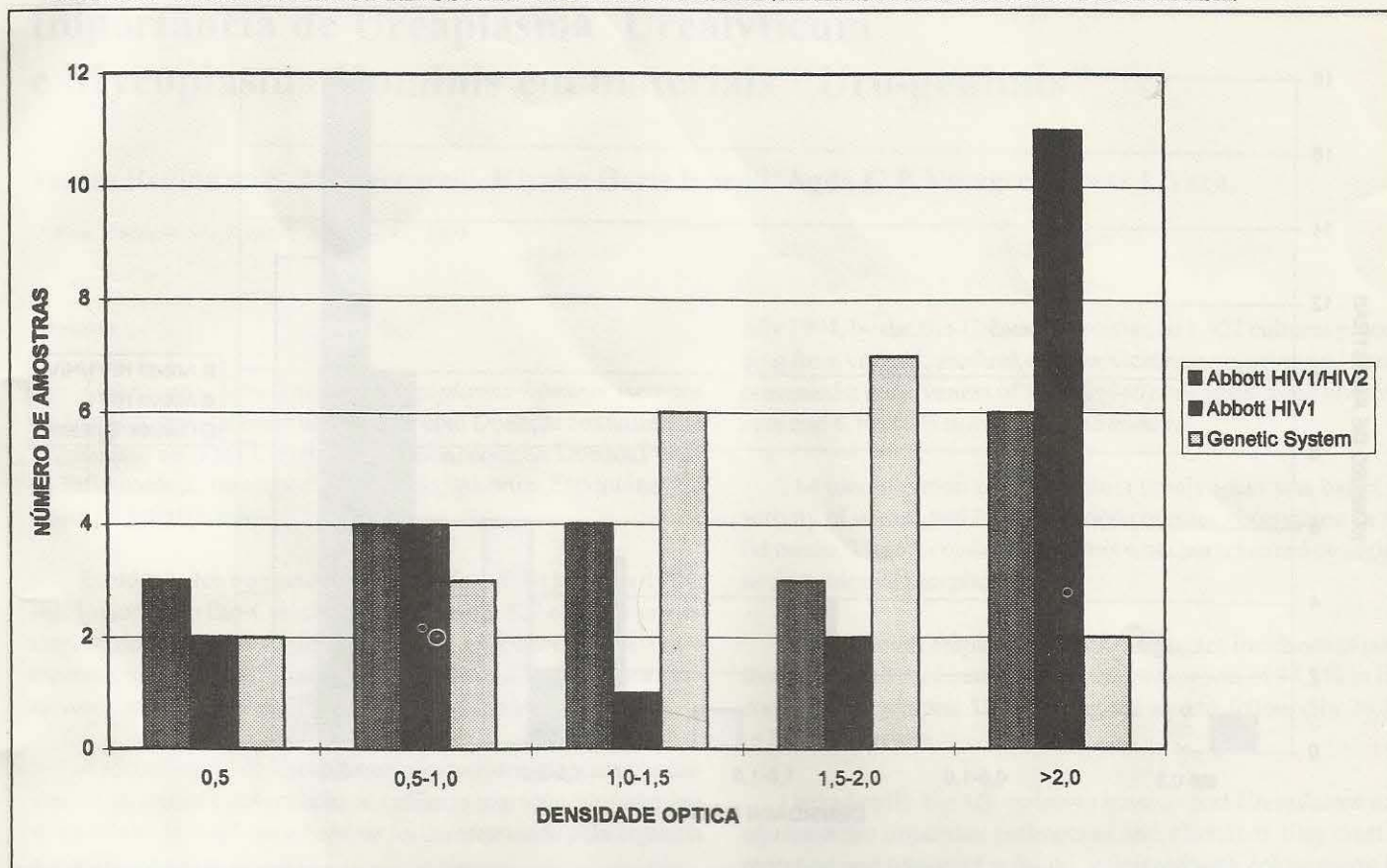
Das cinco amostras não-reagentes, soro e saliva, escolhidas ao acaso, demonstraram ser negativas na técnica de Western-Blot.

VI - Discussão

Os dados obtidos no presente estudo, confirmam a possibilidade de se utilizar amostras de saliva para a detecção de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana, pelo menos como testes de triagem.

Com referência aos resultados obtidos na prova confirmatória, técnica de Western Blot, 20% das amostras foram consideradas indeterminadas, segundo os critérios de interpretação do fabricante, ressaltando que em todas essas amostras, observou-

FIGURA 1 - RESULTADOS OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE SALIVA REAGENTES NOS TESTES DE ELISA.



Quadro III - Interpretação do resultado "indeterminado" obtido pela técnica de Western-Blot em amostras de saliva.

Glicoproteínas (gp)	Número de casos
120	2
160, 120, 41	1
160, 120	1

se a presença de no mínimo uma banda reagente correspondente à proteína específica do envelope do vírus HIV-1 (gp 160; gp 120; gp41), (Quadro III).

Segundo Barriga* e (5), o predomínio em amostras de saliva, na técnica de Western Blot, das bandas correspondentes às proteínas específicas do envelope do vírus, poderia ser explicada da seguinte maneira:

- a prova de Western Blot se baseia na detecção de anticorpos do tipo G (IgG) e a imunoglobulina predominante na saliva é do tipo A (IgA).
- um título baixo de anticorpos contra os determinantes antigênicos gag e pol na saliva.
- a produção de imunoglobulina G (IgG) é local e as partícu-

las virais se encontram em sua maioria intracelularmente dentro dos linfócitos, expondo somente os antígenos do envelope do vírus.

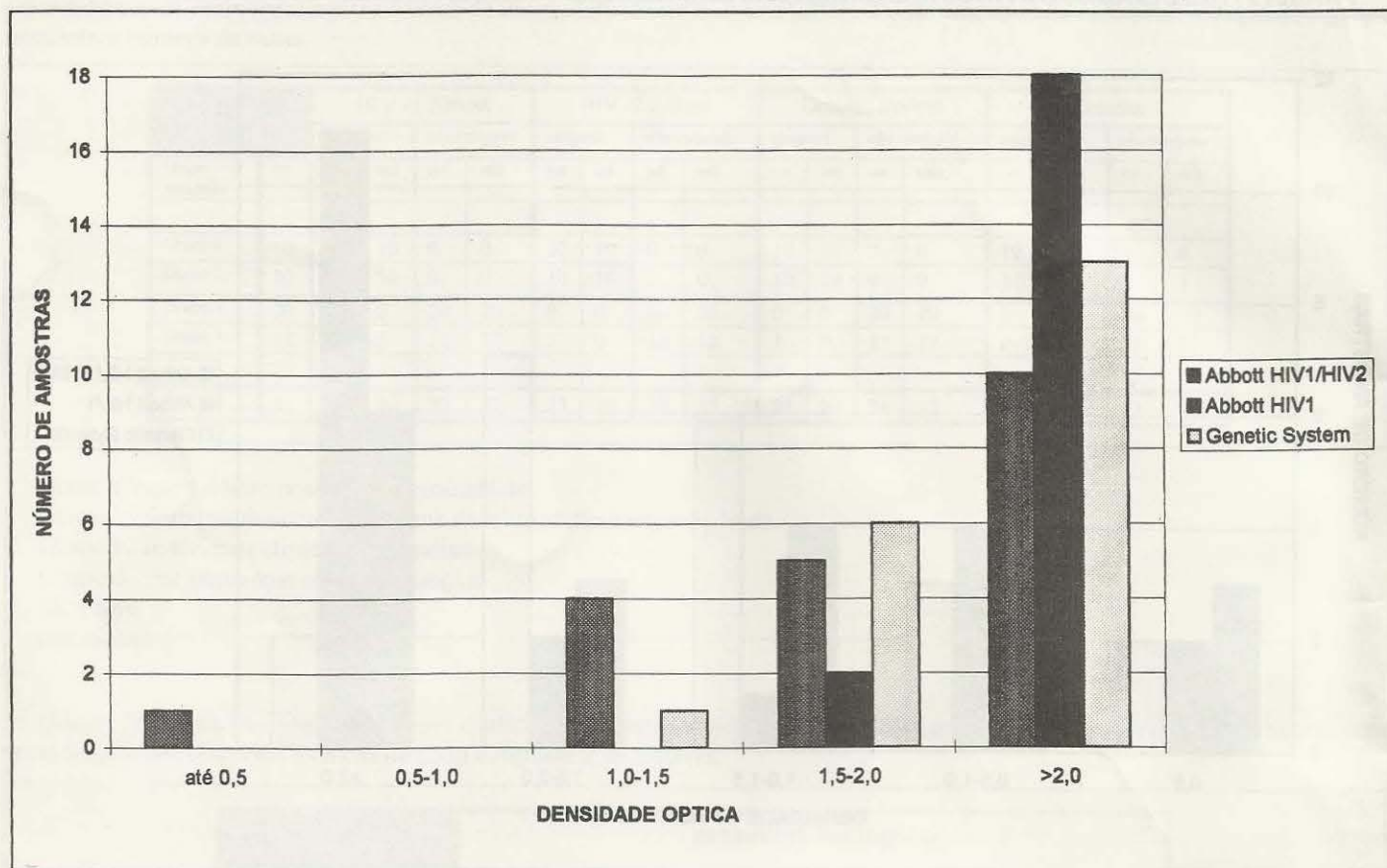
* BARRIGA, A. G. et al. *La muestra de saliva, una alternativa en el diagnóstico de la infección con los virus de la inmunodeficiencia humana. México, Hospital de Infectología Centro Médico "La Raza", s. d. (comunicación de pesquisa).*

VII - Conclusão

Com os resultados obtidos no estudo, os autores concluíram que:

- 1) A coleta de saliva pelo dispositivo "OMNISAL" (SDS, Inc.) é um procedimento bastante simples, não necessita de profissional treinado para tal, também não exige condições especiais para sua obtenção, transporte e armazenamento. O sistema não é invasivo.
- 2) Nos testes empregados para a determinação de anticorpos contra o HIV, os resultados revelaram ótima correlação entre amostras de soro e saliva, principalmente nos testes de triagem.
- 3) Os resultados encontrados e as pesquisas até agora reali-

FIGURA 2 - RESULTADOS OBTIDOS NAS AMOSTRAS DE SORO REAGENTES NOS TESTES DE ELISA.



zadas não são definitivos para recomendar a adoção para prova confirmatória.

4) Os autores verificaram que as amostras de saliva podem ser utilizadas como uma alternativa para o diagnóstico da infecção pelo HIV em testes de triagem, quanto à prova confirmatório, os resultados encontrados e as pesquisas até agora realizadas não são definitivos à sua utilização^{6 e 7}

VII - Agradecimentos

Os autores agradecem ao professor Dr. Carlos A. C. Sannazzano, diretor do SLC pela orientação recebida e às firmas RCR - Rinaldi e Saliva Diagnostic System - USA, pela doação dos coletores de salivas, sem os quais este trabalho não seria possível.

VIII - Observações

Este trabalho foi apresentado na seção de temas livres do XX CAC.

IX - Referências Bibliográficas

[1] BRANDTZAEG, P. Immunoglobulin Systems or oral mucosa

on saliva. Oral mucosa in Health and Disease. London, Blackwell, 1975. [2] BRANDTZAEG, P.; FJELLANGER, I.; GJERULDSSEN, S. T.. Human secretory immunoglobulins I. Salivary secretion from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins. Scand J. Haematol., p. 3-83, 1970, Supplement 12p. [3] DIXON, W. I.; MASSEY, C. J. Introduction to statistical analysis. 2 ed. New York, McGrawHill, 1967. [4] ELLISON, S. A.; MASHIMO, P. A.; MANOEL, I. D.. Imunochemical studies of human saliva. I. The demonstration of serum proteins in whole and parotid saliva. J. Dent. Res. v. 39, p. 982, 1960. [5] FITZGIBBONS, D. et. al. Anticuerpo HIV EIA e resultados Western Blot en espécimnes pareados de suero e saliva. In. CONFERENCIA INTERNACIONAL DEL SIDA, 8, Amsterdã, 1992. [6] FOX, P. C. et. al. Salivary inhibition of HIV-1 infectivity: functional properties and distribution in men, women and children. J. Am. Dent. Assoc., v. 119, p. 709-11, 1984. [7] FRERICHS, R. R. et. al. Salivary assays for HIV antibody diagnosis. Labmedica, 5-6, p. 16-19, 1994. [8] FRERICHS, R. R. et. al. Comparison of saliva and serum for HIV surveillance in developing countries. Lancet, v. 340, p. 1496-9, 1992. [9] MAJOR, C. J. et. al. Comparicion de saliva y sangre para analisis de prevalencia de HIV. J. Infect. Dis., v. 163, p. 699-702, 1991. [10] VOLLER, B. Aids transmission and saliva. Lancet, v. 1, n. 8489, p. 1099-100, 1986.

Endereço p/ correspondência: Hospital Universitário da USP- Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 - Cidade Universitária
CEP: 05508-900 - S. Paulo - SP - Tel.: (011) 212-7711 - Fax: (011) 212-8004