

MARIA IRACI BUARQUE VALENÇA

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O
DIAGNÓSTICO DO HIV-1 EM DOADORES DE SANGUE
COM RESULTADOS INCONCLUSIVOS**

**Recife
2007**

MARIA IRACI BUARQUE VALENÇA



**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O
DIAGNÓSTICO DO HIV-1 EM DOADORES DE SANGUE
COM RESULTADOS INCONCLUSIVOS**

Dissertação apresentada ao curso do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

**Recife
2007
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

Valença, Maria Iraci Buarque

Relação em cadeia de polimerase (PCR) para o diagnóstico do HIV-1 em doadores de sangue com resultados inconclusivos / Maria Iraci Buarque Valença. – Recife: O Autor, 2007.

69 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. HIV – Doadores de sangue. I. Título.

616.97
616.951

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2007-128

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Tadeu Pinheiro

DIRETOR SUPERINTENDENTE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS

Prof. Heloísa Mendonça

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Prof. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

**VICE-CORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Prof. Rosângela Cunha Duarte Coelho

CORPO DOCENTE

Profa. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Profa. Elizabeth Malagueño de Santana

Profa. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Profa. Gerusa Dreyer Vieira

Prof. Joaquim Alfredo Alves Norões

Profa. Maria Amélia Vieira Maciel

Profa. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Profa. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Profa. Silvia Maria de Lemos Hinrichsen

Profa. Vera Magalhães da Silveira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL – MESTRADO E DOUTORADO

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

MARIA IRACI BUARQUE VALENÇA

No dia 12 de setembro de 2007, às 08h30, na Sala de Reunião do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP) – Bl. A – Térreo do Hospital das Clínicas (HC/UFPE), os Professores: Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (Dept. de Medicina Clínica/UFPE – Membro Interno), Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro (Dept. de Medicina Tropical/UFPE – Membro Interno) e a Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Cartaxo Muniz (Instituto de Ciências Biológicas/UPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argúiram a mestrandona sobre a sua Dissertação intitulada “**APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DO HIV-1 EM DOADORES DE SANGUE COM RESULTADOS INCONCLUSIVOS PELOS MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS**”. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestrandona, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Aprovada

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Aprovada

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Maria Tereza Cartaxo Muniz

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Célia M. Machado B. de Castro

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Maria Tereza Cartaxo Muniz

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Cartaxo Muniz



AGRADECIMENTOS

À Deus pela constante presença em minha vida.

À minha família, especialmente a Jefferson, meu marido pela companhia e apoio que recebi durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa' Dra. Rosangela Coelho agradeço pela confiança e aprendizado transmitido durante esta orientação.

À amiga Dra. Ana Cristina de Souza Bezerra do Laboratório de Biologia Molecular de Doadores que me incentivou e colaborou no planejamento deste projeto.

À Dra. Silvana Carneiro Leão, Gerente do Hemocentro Recife, e Dra. Inês pelo apoio institucional na execução do projeto.

À Dra. Lúcia Dourado, Enfermeira Ana Lúcia, Rosangela, Tatiana, da coleta de doadores pela enorme colaboração que prestaram na concretização do estudo.

Enorme gratidão ao Dr. Emanuel Borges pela concessão dos *primers* que foram utilizados neste estudo e pela sua disponibilidade constante em colaborar.

Especial agradecimento pela contribuição inestimável da Dra. Bruna Arruda do Laboratório de Biologia Molecular de Doadores, que me orientou e apoiou em todos os momentos de dificuldades na execução dos procedimentos técnicos. Dr. Bruno Morais e Clara Vieira, bolsista do laboratório meu agradecimento pelo apoio dado.

Aos colegas do Laboratório de Sorologia de Doadores da Fundação HEMOPE, pelo apoio técnico e orientação que me concederam colaborando no andamento do projeto. Dra. Lucília, Dra. Emanulle, Dra. Wandeje, Raquel, Bergman e demais companheiros meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do laboratório de Virologia - LIKA Paulo Souza, Lucas e Rafael agradeço pela ajuda e orientação recebida.

À gerencia do UNILAB pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência. À minha companheira de trabalho, Vera Lúcia de Araújo do Laboratório de Imunopatologia, minha sincera gratidão pela disponibilidade e grande ajuda prestada.

Ao Prof Dr. Ricardo Ximenes, Profª Dra. Heloísa Ramos e demais professores por compartilhar conhecimentos com paciência e sabedoria.

Aos funcionários Walter Leite e Jupira Pinho Ramos .

Aos meus colegas de mestrado Joanna, Paulo, Araiz, Juliana, Rosangela, Cristiano e Fabiana pelos bons momentos que passamos juntos nesta etapa tão importante para todos nós.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Artigo I

Figura 1. Algoritmo com os dois testes não reagentes	25
Figura 2. Algoritmo com dois testes reagentes	26
Figura 3. Algoritmo para o primeiro teste não reagente e segundo reagente	26
Figura 4. Algoritmo para o primeiro teste reagente e segundo não reagente	27

Artigo II

Tabela 1. Características dos ELISAS utilizados na triagem de doadores de sangue	46
Tabela 2. Seqüência de primers (nucleotídeos iniciadores) utilizados na PCR e Nested PCR e suas localizações no genoma do HIV-1.....	47
Tabela 3. Distribuição de doadores segundo sexo,idade, estado civil e tipo de doação... ..	49
Tabela 4. Distribuição de doadores segundo a idade e nº de doações realizadas	49
Tabela 5. Resultados do ELISA Ag/Ac na triagem e após o retorno.....	50
Tabela 6. Resultados do ELISA Ac na triagem e após o retorno.....	50
Tabela 7. Resultados do ELISA AG/Ac <i>versus</i> da Nested- PCR	51
Tabela 8. Resultados do ELISA Ac versus <i>Nested</i> –PCR	52
Tabela 9. Medidas de qualidade dos testes diagnósticos	52

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	viii
INTRODUÇÃO	12
Referências bibliograficas.....	16
ARTIGO I	19
Infecção pelo HIV na Hemoterapia.	
Resumo	20
Abstract	20
Introdução	21
Objetivo	22
Método	22
Revisão da Literatura	23
Conclusão.....	31
Referências Bibliográficas	32
ARTIGO II	38
Aplicação da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico do HIV em doadores de sangue com resultados inconclusivos pelos métodos imunoenzimáticos	
Resumo	39
Abstract	40
Introdução	41
Material e Métodos	44
Resultados	48
Discussão	52
Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas	58
ANEXOS	64
Anexo 1 – Aprovação do CEP.....	65
Anexo 2 – Termo de consentimento	66

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) é a infecção provocada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é transmitida por sangue e seus produtos, pela via sexual e transmissão vertical (GONÇALVES *et al.* 2006).

A preocupação com os riscos da transmissão envolvendo o ato transfusional, exige o desenvolvimento de estudos sobre o processo de seleção de doadores e de segurança do ato transfusional, constituindo grande interesse para pesquisadores da área de Saúde Pública (GENDLER & PASCUCCIO, 2007).

Embora várias medidas sejam tomadas para garantir a segurança com o uso do sangue, estima-se que cerca de 5% dos casos de AIDS no mundo ocorram através da transfusão sanguínea (WAHDAN, 1995; GERMAN&GOLDMAN, 2002). O sangue é um meio eficiente na transmissão do HIV com uma freqüência da soroconversão após transfusão de doadores infectados acima de 90% (DONEGAN, 1990; SHRESTHA, 1996).

Os testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico do HIV na triagem de doadores de sangue, são essenciais para o seguimento dos pacientes infectados e na vigilância epidemiológica da infecção e doença. As práticas realizadas nos serviços de hemoterapia são regulamentadas pelo Ministério da Saúde, através do Regulamento Técnico para obtenção, testagem, processamento e controle de qualidade do sangue e hemocomponentes para uso humano (RDC 153). O regulamento é fiscalizado pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL,2004).

A partir de 1985, quando os testes sorológicos para HIV foram disponibilizados para uso, houve um decréscimo no percentual de transmissão. E com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, uma seleção mais rigorosa de doadores e o uso adequado do sangue houve uma redução do risco para a infecção (PILONEL & LAPERCHE, 2005).

Portanto, a segurança da transfusão sanguínea depende de uma série de fatores, que em conjunto podem proporcionar melhor qualidade do sangue e dos hemocomponentes a serem utilizados. Dentre estes fatores, os mais importantes estão: a seleção da população de doadores, a triagem clínica, a realização dos testes imunohematológicos, a triagem sorológica e o uso racional de sangue e hemocomponentes (KIELLY&WOOD, 2005).

A triagem sorológica tem um significado estratégico especial, pois a partir de um determinado momento, é o único procedimento que vai validar ou não a utilização do sangue. Entretanto, triar doadores de sangue por testes sorológicos gera um número substancial de resultados conflitantes, discordantes e consequentemente inconclusivos (BARBOSA *et al.*1998).

Doadores com resultados inconclusivos na triagem sorológica são problemáticos para os serviços de sangue por causa da perda do produto e pela condução clínica posterior deste doador (KIELLY&WOOD, 2005). O desafio para os serviços de sangue é determinar quando informar esses doadores sobre seus resultados e como isso deve ser feito para minimizar-lhes a ansiedade (GASTALDELLO *et al.*,2001). É difícil explicar aos doadores que embora seus resultados não indiquem infecção seu sangue não poderá ser utilizado para transfusão.

Os testes confirmatórios para pesquisa de anticorpos como Imunofluorescencia (IMF) e Western Blot (WB), também são em diversas ocasiões inconclusivos, portanto os centros de hemoterapia buscam a utilização de testes que elucidem satisfatoriamente a interpretação do laudo.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e outros ensaios moleculares vêm sendo usados com freqüência em vasto campo da ciência e medicina, especialmente no estudo do HIV/AIDS (AMERICAN RED CROSS, 2005).

Pesquisas utilizando testes de triagem, confirmatórios e moleculares já foram realizadas: um estudo investigou a freqüência de falsos positivos entre doadores de sangue nos EUA na triagem de 5 milhões de doadores; dos quais 421 foram positivos no WB, dentre estes, 20 apresentaram resultado com desfecho de testes negativos na PCR, concluindo que doadores devem se possível, testados por PCR além da análise sorológica (MICHAEL & LISA,1998).

Outro estudo realizado nos Estados Unidos pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention) para avaliar a correlação da PCR com os testes imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos, investigou 242 pacientes que apresentavam risco para infecção por HIV e concluiu que a PCR detectava a maioria das amostras que apresentavam sorologia com anticorpos positivos, comprovando a sensibilidade e especificidade da técnica (KIELLY&WOOOD, 2005).

Assim, o presente trabalho utilizou a *Nested-PCR* em amostras de sangue de doadores com resultados inconclusivos, identificados na triagem sorológica e que retornaram ao hemocentro para repetição nos dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizados na triagem sorológica.

A dissertação será apresentada em dois artigos: o primeiro traz uma atualização sobre a infecção pelo HIV em doadores de sangue, com medidas e procedimentos adotados para evitar a disseminação do vírus e os principais métodos de diagnóstico utilizados para sua detecção. Apesar de não se tratar de uma revisão sistemática do ponto de vista de suas etapas metodológicas, procurou-se dar abrangência à busca e à

seleção de artigos mediante palavras – chave usando critérios que deram uma boa delimitação ao tema.

No segundo artigo são apresentados os resultados da pesquisa e a análise das amostras inconclusivas na sorologia, que foram submetidas à *Nested-PCR* para uma avaliação qualitativa do HIV-DNA (provírus) em doadores de sangue da Fundação HEMOPE, realizada no período de novembro de 2006 a Janeiro de 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN RED CROSS,

Disponível em:<http://chapters.redcross.org/ca/norcal/phys/geninfo/abntests.htm>.

Acesso: 15/10/2005.

BARBOSA, E.F.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; OLIVEIRA, D.R. HIV-1 Detection and subtyping by PCR and heteroduplex mobility assay in blood donors: Can these testes help to elucidate conflicting serological results? **Transf. Sci.** Belo Horizonte, v.19, n.1, p.39-43, 1998.

BRASIL. Resolução RDC nº153, de 14 de junho de 2004. ANVISA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 jun.2004.

Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>. Acesso em: 10 de dezembro de 2006.

DONEGAN, E. *et al.* Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations. **Annals of Internal Medicine**, n.113, p.733-739, 1990.

GASTALDELLO, R.; GALLEGOS, S.; ISA, M.B. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate western blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV-I/II in Cordoba, Argentina. **Rev. Inst.Med.Trop. S.Paulo**, v.43, p. 277-282, 2001.

GENDLER ,S.A.; PASCUCCIO,M.S. Routine HIV screening among blood donors in Buenos Ayres(Argentina): Results from six years' experience and report of a single window-period donation.**Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.**,Argentina,v. 25, n.2,p.82-90, 2007.

GERMAIN, M.; GOLDMAN, M. Blood Donor Selection and Screening:Strategies to Reduce Recipient Risk. **American Journal of Therapeutics**. v.9, n.5, p.406 – 410, 2002.

GONÇALVES,K.I. *et al.* Soroprevalênciade HIV-1/2 entre doadores de sangue de Goiânia-Goiás. **RBAC**, Goiás, v.38, n.4, p.263-266,2006.

KIELLY, P.; WOOD, E. Can we improve the management of blood donors with nonspecific reactivity in viral screening and confirmatory assay? **Transfusion Medicine Reviews**,Austrália, v.19, n. 1, p.58-65, 2005.

MICHAEL, P.; LISA, H. *et al.* False-Positive HIV-1 Test Results in a Low -Risk Screening Setting of Voluntary Blood Donors. **Journal of the American Medical association.** v.280, p. 1080, 1998.

PILLONEL, J.; LAPERCHE, S. Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). Euro Surveill, v.10, n.2, p.5-8, 2005. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/em/v10n02/1002-223.asp>

SHRESTHA, P.N. Transmission of HIV through blood or blood products in the Eastern Mediterranean Health Journal,v.2 , n.2,p.283-289,1996.Disponível em:
<http://www.emro.who.int/Publications/EMHJ/0202/14.htm>. Acesso: 8 de agosto de 2006.

WAHDAN,M.H. Epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome. Alexandria, **World Health Organization**, Regional Office for the Eastern Mediterranean, 1995.

ARTIGO I

INFECÇÃO PELO HIV EM DOADORES DE SANGUE

Resumo

O risco de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) através de doações de sangue constitui uma preocupação para os profissionais da saúde pública. Nestes últimos anos, várias medidas foram adotadas e o avanço tecnológico no diagnóstico laboratorial tem contribuído para reduzir a transmissão do vírus. Este artigo tem como objetivo fazer uma atualização sobre a infecção pelo HIV na hemoterapia e os principais métodos de diagnóstico utilizados para sua detecção. Realizou-se uma busca *online*, nas bases de dados *Medline-PubMed*, *Science Direct* e *Scielo*. A pesquisa permitiu identificar as medidas que foram introduzidas desde o surgimento da epidemia visando reduzir o risco da transmissão do HIV nos bancos de sangue. Apesar do avanço dos métodos sorológicos apresentando maior sensibilidade e melhor especificidade e a implantação de métodos moleculares em alguns hemocentros do país, ainda permanece o risco residual de transmissão do vírus por transfusão sanguínea.

Descritores: HIV, Doador de Sangue, Método sorológico, Método Molecular.

Abstract

The risk of transmission by the human immunodeficiency virus (HIV) through blood donations constitutes a concern for the professionals of the public health. In the past years, some measures had been adopted and the technological advance in the laboratorial diagnosis has contributed to reduce the transmission of the virus. The purpose of this

article is to make an update of HIV infection in the blood donors and the main methods of its diagnostic. A search for relevant articles was conducted online, in the databases *Medline-PubMed*, *Science Direct* and *Scielo*. The research allowed identifying the measures that had been introduced since the sprouting of the epidemic aiming to reduce the risk of HIV transmission in blood banks. Despite of the advance of serologic methods with bigger sensitivity and better specificity and the implantation of molecular diagnostic in some blood banks in the country, still remain the residual risk of transmission of the virus by blood transfusion.

Key words: HIV, Blood donor, Serologic diagnostic, Molecular Diagnostic.

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Retrovirinae* e ao gênero *Lentivirus*. É o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS).

De acordo com dados da UNAIDS (2006) sobre a Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) mundial, a epidemia parece estar diminuindo lentamente, embora novas infecções continuem a aumentar em certas regiões e países. Há uma estimativa que 39,5 milhões de pessoas estejam vivendo com HIV em todo o mundo (UNIAIDS, 2006).

Dentre as vias de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a transfusão sanguínea ainda constitui um problema em todo mundo, particularmente quando se trata de pacientes politransfundidos (de PAULA *et al.*, 2005).

A descoberta da AIDS gerou grande impacto na sociedade levando a mudança de hábitos e costumes. Assim, legislações apropriadas para esta nova realidade foram elaboradas para normatizar as práticas e os procedimentos da hemoterapia no Brasil com o objetivo de garantir a qualidade do sangue (SPADA *et al.*, 2005).

Considerando que o HIV nos bancos de sangue pode ser transmitido por eritrócitos, plaquetas, crioprecipitados, plasma fresco, plasma congelado e possivelmente, por outros componentes sanguíneos, a seleção e o recrutamento apropriados de doadores além da adequada triagem laboratorial para marcadores infecciosos constitui fatores importantes para diminuir o risco desta infecção (CRUZ; SPADA *et al.*, 2005).

OBJETIVO

Revisar a literatura científica sobre a infecção pelo HIV na hemoterapia e os principais métodos diagnósticos utilizados para sua detecção.

MÉTODO

Pesquisa bibliográfica nas bases de dados *Medline-PubMed*, *Science Direct* e *Scielo* usando termos de busca como : *serology* , *blood donors*, *molecular diagnostic*, *risk factors*, *HIV*, *epidemiologic date*, dando enfoque aos artigos que informam sobre os procedimentos e medidas adotados desde o surgimento do HIV, como também o avanço tecnológico dos métodos diagnósticos.

REVISÃO DA LITERATURA

O risco de transmitir doenças infecciosas por transfusão sanguínea ainda permanece e deve-se a vários fatores como: erro humano/técnico e presença de variantes virais não reconhecidas por alguns ensaios. No entanto, o risco maior ocorre pela existência de uma fase sorológica silenciosa, conhecida como pré-soroconversão ou janela imunológica, que corresponde ao período entre o contágio e o aparecimento de anticorpos específicos (PILONEL, 1998).

Nos Estados Unidos, segundo SCHEREIBER (1996) o risco de receber sangue contaminado, foi estimado em 1: 660.000 doações no ano de 1996, porém este risco foi reduzido para 1: 1.300,00 em 2000 (ALLAIN, 2000).

Na França, entre o período de 1990 a 1996 o risco estimado foi de 1: 400.000 e em 2000 reduziu para 1:1. 350.000 doações (DELBOK, 2000).

O risco residual de transmissão do HIV por transfusão, no Brasil mostrou-se sempre mais alto em relação aos países citados acima (SPADA *et al.*,2005).

No Brasil, até junho de 2004, dos 63.000 infectados pelo HIV na categoria exposição sanguínea, 2000 pessoas foram contaminadas por transfusão sanguínea (BRASIL, 2004).

Através de seus hemocentros, o estado de São Paulo foi o que mais publicou dados sobre o risco residual de infecção pelo HIV em doadores de sangue. Em estudo de HAMERSCHLACK *et al.* (1993) esse risco foi estimado em 1: 15.000 transfusões realizadas.

No Hemocentro de Marília, foi de 1: 10.330 (CANUTTI, 1998); em Ribeirão Preto de 1: 77.000 (COVAS, 1998) e na Fundação Pró-Sangue - SP, foi de 1 em 64.000 doações (SABINO *et al.*, 1999).

Em Santa Catarina, o risco estimado foi de 1: 50.000 no período de 2000 a 2003(SPADA *et al.*, 2005).

Diante dos índices de risco residual para a infecção pelo HIV comentados acima, o diagnóstico laboratorial representa uma importante estratégia para o controle da transmissão pela transfusão sanguínea (PASQUIER *et al.*, 2003).

O diagnóstico da infecção pelo HIV na hemoterapia é baseado na demonstração de anticorpos e/ou detecção de antígeno viral, por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), um ensaio imunoenzimático, e na presença do material genético do vírus, através de método de amplificação do ácido nucléico, embora ainda restrito a alguns hemocentros (MACHADO& COSTA,1999).

Para a detecção de anticorpos contra o HIV, desde a introdução do primeiro ELISA em 1985, o algoritmo mais utilizado, embora com algumas restrições, tem sido a triagem por este método e quando necessário realiza-se o procedimento com métodos mais específicos, como o Western Blot (WB) (CDC, 1988). No entanto, o uso do WB é limitado pelo alto custo (MAHÉ *et al.*,2002).

Houve um grande avanço tecnológico nos ELISAs ao longo desses últimos anos, com a introdução de testes mais sensíveis reduzindo-se a taxa de falsos negativos (SLOAND *et al.*, 1995;PASQUIER *et al.*, 2004).

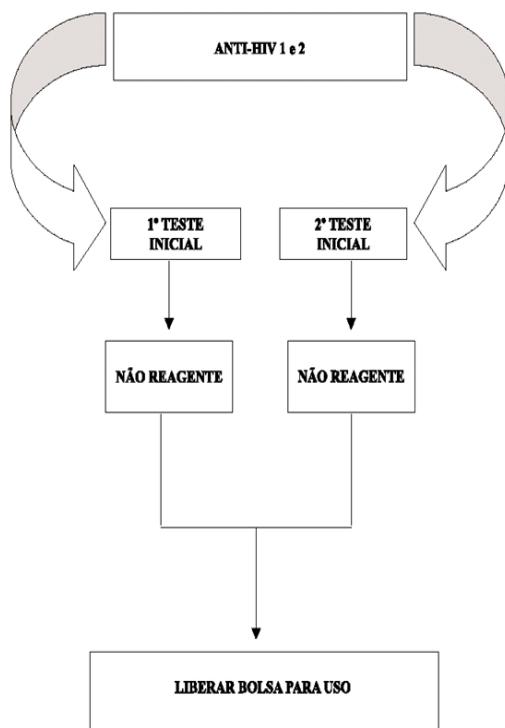
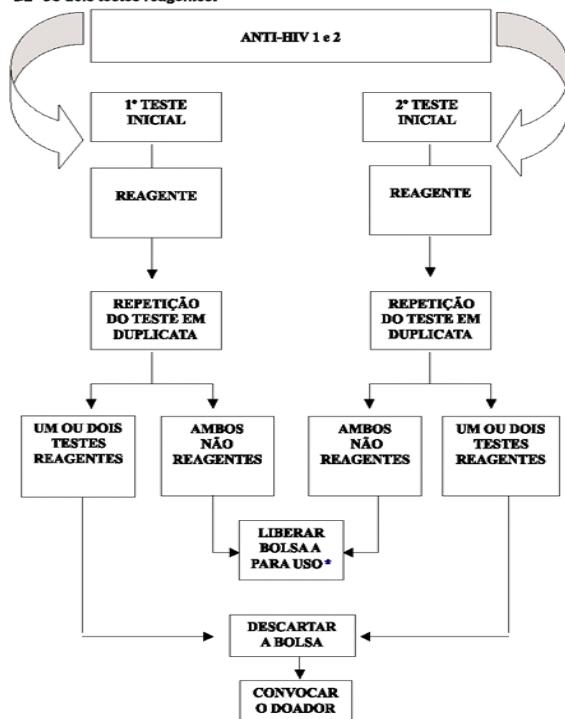
Os ensaios de primeira geração com antígenos obtidos a partir de lisado viral eram capazes de detectar apenas anti-HIV do tipo IgG. No entanto, anticorpos direcionados contra esses抗ígenos causavam freqüentemente reatividade não específica (CARVALHO *et al.* 2005).

Os ensaios de segunda e terceira geração passaram a usar peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes que detectavam anti-HIV 1 e 2 dos tipos IgG e IgM, aumentando a sensibilidade do ensaio e reduzindo o tempo médio para detectar a soroconversão para menos de 20 dias (BUSH *et al.*, 1995; LY *et al.*, 2001).

Novos ensaios surgiram para aumentar a eficácia dos métodos convencionais para o diagnóstico precoce da infecção, como a pesquisa da proteína p24 do capsídeo viral, que detecta o antígeno do *core*, produzido pelo gene *gag* que codifica para proteínas da matriz do HIV-1. Estes foram associados à pesquisa de anticorpos, e denominados de ensaios combinados ou de quarta geração. São mais sensíveis que os de terceira geração, porém a sensibilidade analítica para o p24 nos testes combinados é mais baixa do que sua determinação isolada (GENDLER & PASCUCCIO, 2006).

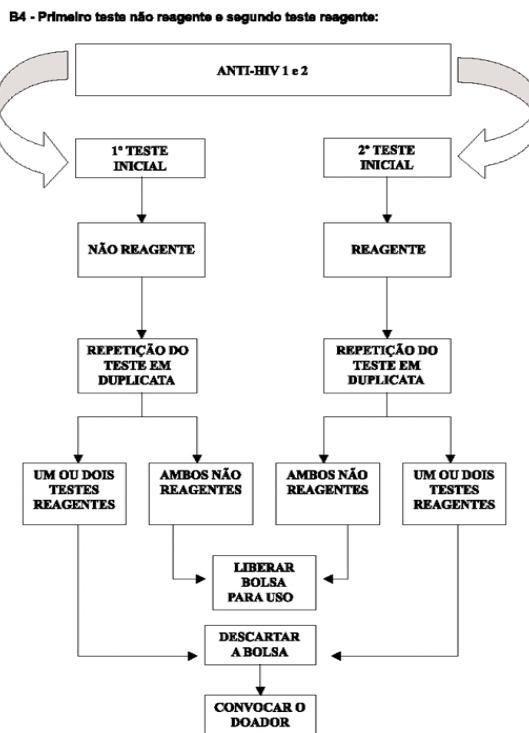
No Brasil, o teste para triagem do HIV em doadores de sangue iniciou em 1985 e atualmente segue a portaria nº 59 de janeiro/2003 , que determina o uso de dois ELISAs com抗ígenos diferentes e/ou princípios metodológicos distintos em primeira linha e testes confirmatórios (Western Blot, Imunofluorescência) no caso de positivos ou indeterminados(BRASIL,2003).

As figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os algoritmos usados para liberação de bolsa de sangue em função dos resultados dos testes para HIV, reproduzidos da portaria nº 59:

B1- Os dois testes não reagentes:**Figuras 1:** Algoritmo para os dois testes não reagentes**B2- Os dois testes reagentes:**

* Repetir a testagem de todas as amostras dessa placa ou corrida. Esse resultado é indicativo de troca de amostra. Não liberar nenhuma bolsa até a retestagem de todas as amostras.

Figura 2: Algoritmo para os dois testes reagentes.



Figuras 3: Algoritmo para o primeiro teste não reagente e segundo reagente

B3- Primeiro teste reagente e segundo teste não reagente:

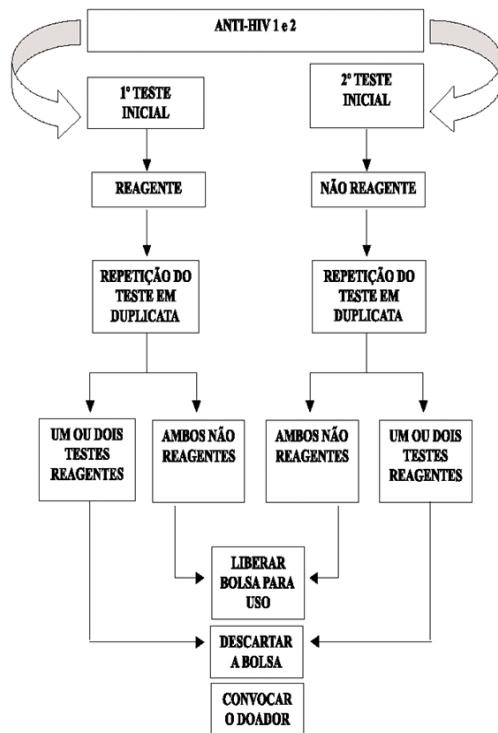


Figura 4: Algoritmo para o primeiro teste reagente e segundo não reagente

Quando os doadores são submetidos aos dois ensaios ELISA e são reagentes para o HIV, são retestados com uma segunda amostra. Em caso positivo na segunda amostra o resultado é submetido a um teste confirmatório. Em caso negativo, a ausência de anticorpos é concluída. Nos casos em que os testes são inconclusivos, ou seja, reativo em um teste e não reativo no outro, também se aplica um teste confirmatório. Porém resultados inconclusivos podem também ocorrer mesmo com os testes confirmatórios, dificultando a interpretação (PASQUIER *et al.*, 2004; HUANG, *et al.*, 2006).

Um resultado não reativo nos testes confirmatórios qualifica o sangue como liberado para o uso. Porém, quando o sangue é reativo e ao ser repetido mantém o resultado, o sangue doado é descartado (BRASIL, 2003).

Em síntese, os resultados destes testes podem se apresentar: positivo, confirmando os testes de triagem; negativo quando confirma que o teste de triagem era falso positivo e indeterminado ou inconclusivo quando os resultados são discordantes nos ELISAs utilizados. Freqüentemente resultados inconclusivos podem significar duas possibilidades: o doador não está infectado, mas reage inespecificamente nos testes de triagem e por isso o resultado se apresenta inconclusivo nos testes confirmatórios, o que é mais comum; ou o doador foi recentemente infectado com o agente, mas ainda não desenvolveu anticorpos (AM.RED CROSS, 2004).

É interessante lembrar que doadores de sangue são indivíduos que passam por triagem clínica rigorosa e são avaliados em vários aspectos relacionados ao seu estado de saúde. Portanto, um resultado indeterminado pode não significar sinal de infecção (CARVALHO *et al.*, 2005). Amostras repetidamente reativas nos ensaios imunoenzimáticos e que são negativas por testes confirmatórios são referidas pelos termos: biológico falso positivo ou falso positivo. Estas amostras são consideradas

negativas para o marcador em questão e o resultado reativo não é considerado específico para o HIV (KIELLY & WOOD, 2005).

A causa primária de resultados falsos positivos é a reatividade inespecífica do anticorpo, tanto contra um agente viral, como contaminação com epitopo não viral (BUSH *et al.*, 1996). Existe uma freqüente associação de resultados falsos positivos com o aumento da produção de anticorpos que ocorre durante uma resposta imune, como por exemplo, uma vacina (VARDINON & KATZ , 1999).

Por outro lado, KIELLY & WOOD (2005) também relatam que resultados falsos positivos apresentam algumas características que podem estar relacionadas:

- ao ensaio: uma amostra com resultado falso positivo quando retestada com ensaio alternativo frequentemente resulta em negativa. Portanto, resultados falsos positivos são frequentemente ensaio-específicos.
- a diferentes lotes de reagentes: a taxa de reação repetida falso-positiva para anti-HIV varia de 0,02% a 0,111% entre diferentes lotes.
- modificações do teste, isto é, mudanças na configuração de um ensaio ao incorporar novos determinantes antigênicos.

Assim, diante das dificuldades na interpretação dos métodos sorológicos para a triagem em banco de sangue, novas metodologias utilizando a biologia molecular vêm sendo introduzidas na rotina de alguns hemocentros no país..

Os métodos moleculares tiveram um grande avanço dês de o surgimento da Reação em Cadeia da Polimerase(PCR) Para sua realização, utiliza-se uma enzima termoestável (DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplificam a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. O produto

amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins (MOLINA & TOBO, 2004).

Entre as diversas técnicas resultantes de modificações da PCR, os autores MOLINA & TOBO também citam:

-A RT-PCR que utiliza uma enzima chamada transcriptase reversa para converter uma amostra de RNA em cDNA antes da etapa de amplificação da PCR, permitindo estudo de vírus RNA e análises de expressão gênica;

-A *nested* PCR, que emprega uma segunda etapa de amplificação com par de *primers* internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método;

- A PCR multiplex que é uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas seqüências alvos numa mesma amostra

- A PCR a partir de primers randômicos utilizando seqüências curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico sendo bastante empregada em estudos epidemiológicos;

- A PCR em tempo real permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente em um sistema fechado, sendo necessário para isto um termociclador que possua sistema de monitoramento de emissão de fluorescência.

A sensibilidade e a especificidade diagnóstica dessas metodologias são altas, 99% e 98% respectivamente (CALIENDO, 2003), estudos mostram que a adição de testes de amplificação de ácidos nucléicos no algoritmo para HIV aumenta a identificação de casos da infecção (PILCHER *et al.*, 2001, 2005)

Alguns estudos já foram realizados como o de BARBOSA *et al.* (1998) que analisou amostras de DNA de 50 doadores de sangue reativos no ELISA mas inconclusivos no WB usando a PCR, elucidando os resultados de 5 doadores .

Na pesquisa de REZENDE *et al.* (2002), foram submetidas 200 amostras de doadores de sangue por PCR, 75 amostras negativas e 90 indeterminadas no ELISA foram negativas na PCR e das 35 consideradas positivas no ELISA , 25 confirmaram ser reagentes pelo método molecular.

Considerando a sensibilidade e especificidade das técnicas de detecção de ácidos nucléicos, o Ministério da Saúde, através da portaria nº112 de janeiro de 2004, determinou a implantação do NAT (técnica de ácido nucléico) para o diagnóstico do HIV como método mais seguro na triagem de doadores de sangue. Este medida visa diminuir ainda mais o período da janela imunológica e reduzir o risco da transmissão do vírus por transfusões sanguíneas, entretanto ainda não foi possível o uso simultâneo da técnica em todo o país (BRASIL, 2004).

CONCLUSÕES

A avaliação laboratorial de indivíduos sob risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana assumiu importante papel na hemoterapia, confrontar a alta sensibilidade dos testes moleculares *versus* métodos sorológicos e interpretar as associações entre os métodos utilizados, representa um avanço no diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HIV (CLEMENTI *et al.* 1996; YILMAZ; SCHIMITT, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIN, J.P. Will genome detection replace serology in blood screening for microbial agents? **Baillière Clinical Haematology**. França, v.13, n. 4.p. 615-629, 2000.

AMERICAN RED CROSS. General informations: Evaluation of donors with abnormal test results.2004.

Disponível em: <http://chapters.Redcross.org/ca/norcal/phys/geninfo/abtests.htm>.

Acesso: 15/10/2006.

BARBOSA, E.F.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; OLIVEIRA, D.R. HIV-1 Detection and subtyping by PCR and heteroduplex mobility assay in blood donors: Can these tests help to elucidate conflicting serological results? **Transf. Sci.** Belo Horizonte,v.19,n.1, p.39-43,1998.

BRASIL. Ministério da Saúde.**Boletim Epidemiológico**, janeiro a junho de 2004. Disponível em:<http://www.aids.gov.br/final/dados/BOLETIM2.pdf>...Acesso: 20/03/2007

BRASIL. Ministério da Saúde.**Portaria nº112/GM**.Em 29 de janeiro de 2004.D.O.U.- Diário Oficial da União

BRASIL.**Portaria Nº. 59**, 28 de Janeiro de 2003, Ministério da Saúde. Publicado em Diário Oficial.

BUSH. M.P.;LEE, L.L.J.; SATTEN, G.A. *et al.* Time course of detection of viral load and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion implications for screening of blood and tissue donors. **Transfusion**, n.35,p.97-7,1995.

BUSH, M.P.; KLEIMAN, S.H.;WILLIAMS, A.E. *et al:* Frequency of human immunodeficiency virus (HIV)infection among contemporary anti-HIV and anti_HIV1/2 suplemental test-indeterminate blood donors. **Transfusion** , n.37,p. 37-44, 1996.

CALIENDO, A.M..Technics and interpretation of HIV-RNA quantification. Official reprint from Uptodate. 2003. Disponível em: <http://www.uptodate.com>. Acesso em: set/2006.

CANNUTTI, J.V. Transfusional Risk: methodology and study. **Update in hemotherapy**, n.5,p.90-99, 1998.

CARVALHO,M.B.; HAMERSCHALACK,N.VAZ,R.S. *et al.* Risk factors analysis and serological diagnosis of HIV-1/HIV-2 infection in a Brasilian blood donors populations validations of the WHO strategy for HIV testing.**AIDS**,n.10,p.1135-40,2005.

CARVALHO,P.G.; ANDRADE,F.B.;DIAS, A.T.N. Avalia o do Emprego de Teste Combinado Antígeno/Anticorpo na Identifica o de Infec o Recente de HIV/I/II em Doadores de Sangue.**RBAC**, Fortaleza, v.37,n.3,p.169-174,2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL: Update:serologic testing antibody for HIV. **MMWR.** 36:833-840,1998.

CLEMENTI,M.,MENZO S.; BAGNARELLI P.,VALENZA, S. *et al.* Clinical use of quantitative molecular methods in studying human immunodeficiency virus type 1 **infection.** **Rev.** v. 9, p. 135-147, 1996.

COVAS, D. T. Transmission Risk of HIV-1 by blood transfusion. **Escola brasileira de Hematologia.**Série de monografias ,São Paulo,v.5,p.100-106,1998.

CRUZ, J.R.; PEREZ-ROSALES, M.D.; ZICKER, F.; SCHUMUNIS, G.A.J. **Clin. Virol.** Dec; 34 Suppl 2,p.75-80,2005.

DE PAULA, E.V.; GONCALES, N.S.; XUEREF, S. *et al.* **Clin. Virol.**, Dec; Suppl 2,p.S27-32,2005.

DELBOC, A.; WEILLER, J.; DUSSERT, P. L'hémovigilance à l'aube du XXIe siècle. **Presse Med** , v.29,n.19,p.1066-1071,2000.

GENDLER , S.A.; PASCUCCIO,M.S.Routine HIV screening among blood donors in Buenos Ayres(Argentina):Results from six years' experience and report of a single window-period donation.**Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.**,v.25,n.2,p.82-90,2007.

HAMERSCLACK N.,PASTERNACK J.,NETO VA. Today's risk of AIDS transmission by transfusion.**Rev. Hosp Clin Fac Med S Paulo**,v.48,n.4,p.183-185, 1993.

HUANG,L.-J.;LIU,C.-Y.;CHU,S.-C. et al. Predictive value of two commercial human immunodeficiency virus serological tests in cases with indeterminate Western blot results. **J.Microbiol.Immunol. Infect**, v.39,p.219-224,2006.

KIELLY, P.; WOOD, E. Can We Improve The Management of Blood Donors With Nonspecific Reactivity in Viral Screening and Confirmatory Assay? **Transfusion Medicine Reviews**,Austrália, v.19, n. 1,p. 58-65,2005.

LY,T.D. ; MARTIN,L. ; DAGHFAL,D. et al. Seven Human Immunodeficiency Virus(HIV) antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection.. **J. of Clin. Microbiol**.v.39,n.9,p.3122-3128,2001.

MACHADO,A.A.;COSTA,J.C. Métodos Laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana(HIV).**Medicina**, Ribeirão Preto, n.32, p.138-146,1999.

MAHÉ, C.; KALEEBU.P. ; OJWIYA, A. ; WHITWORTH, J.A.G. Human immunodeficiency virus type 1 Western blot : revised diagnostic criteria with fewer indeterminate results for epidemiological studies in Africa .**International Journal of Epidemiology**,v.31,p.985-990,2002.

MOLINA,A.L.; TOBO,P. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico.**Einstein**,v.2, n.2,p.139-142,2004.

PASQUIER, C. SANDRES-SAUN ,K.;MANSUY,J.-M. *et al.* Virological exploration of individual with discordant HIV screening tests. **J. of Clin. Virol**, França.v.30,p.218-223,2004.

PILCHER,C.D.; FISCUS, S.A.; NGUYEN,T.Q. *et al.* Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina, **New England J.Med.**, n.352,p.1873-83,2005.

PILCHER, C.D ; McPHERSON J.T. ; LEONE, P.A. et al. Real-time universal screening for acute HIV infections in a routine HIV counseling and testing populations. **JAMA**, v.288, p.216-221,2002.

PILLONEL, C.;SAURA, A.M. Viral marker rates among unpaid blood donors in Europe decreased from 1990 to 1996.European Communicable Disease Bulletin.Euro surveillance.V03N.7July1998.Disponível em:<http://www.eurosurveillance.org/em/v03n07/v03n07.pdf>. Acesso: 24/07/2005.

REZENDE, P.R.; ALVES, G.B.; PEREIRA L.M.C. *et al.*Sensibilidade da técnica de rea o em cadeia da polimerase para HIV-1 em rela o  t técnica de ensaio imunoenzimático. **Rev.Bras.Hematol.Hemoter.** São Jose do Rio Preto ,v.24, n.1, 2002.

SABINO, E. C.; SALES, N.; SÁEZ- ALQUÉZAR, A. *et al.* Estimated risk o transfusion – transmitted HIV infection in São Paulo, Brazil. **Transfusion**, v.39,p.1152-3, 1999.

SCHIMTT,Y. Performance characterstcs of quantification assays for human immunodeficiency virus type 1 RNA.**J.Clin.Viro**. v.20,p.31-33.2001.

SHEREIBER, G.B.*et al.*The risk of transfusion-transmitted viral infections.**The New England Jornal of Medicine**,v.26,p.334,1996.

SLOAND, E.M.; PITT, E.; KLEIN, H.G. Safety of the blood supply. **Journal of the Ametrician Medical Association**, v.7,p.995-999,1995.

SPADA, C.; SOUZA, M.A.; TREINTIGER, A. Estimation of residual risk for the transmission of HIV in Blood Donors from the Mountain Region of Santa Catarina. **The Brazilian Journal of Infection Disease**, v.9,n.6,p.489-493, 2005.

UNIAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2006.2006. Geneva, Switzerland:
UNIAIDS/WHO.

VARDINON, N.; KATZ, O. *et a.l:* Anti-HIV indeterminate Western blot in dialysis patients: A long-term follow-up. **AM J Kidney Dis.** v.34,p.146-149, 1999.

YILMAZ G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. **J. Clin. Viro**. v.21, p.187-196, 2001.

ARTIGO II

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DO HIV-1 EM DOADORES DE SANGUE COM RESULTADOS INCONCLUSIVOS

Resumo

A transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), constitui uma preocupação constante nos hemocentros. O objetivo do presente estudo foi utilizar a *Nested-PCR* para identificação qualitativa do DNA-HIV (provírus) em doadores de sangue com resultados inconclusivos nos testes imunoenzimáticos utilizados na triagem sorológica. Foram analisadas 104 amostras de doadores de sangue, que retornaram ao hemocentro no período de novembro de 2006 a janeiro de 2007, por apresentarem resultados inconclusivos para o HIV. Foram incluídos na pesquisa os doadores que retornaram para a segunda coleta após o período mínimo de 20 dias e com sorologia negativa para os demais marcadores usados na triagem sorológica. Para o diagnóstico do HIV foram utilizados dois testes imunoenzimáticos (ELISAs): um kit de terceira geração para pesquisa de anticorpos (Abbott-Murex HIV 1.2.0) e outro de quarta geração para detecção combinada de antígeno e anticorpo (Abbott Hiv Ag/Ab Combination). Para a elucidação dos resultados inconclusivos obtidos nos testes ELISAs, foi utilizada a *Nested-PCR* com pares de *primers* específicos para a região *gag* (*primers JA4-JA7*) e duas regiões *env*, *JA13-JA16* e *JA9-12*, o último contendo a seqüência de nucleotídeos da alça V3. A população de doadores estudada foi constituída principalmente por doadores do sexo masculino (88,7%), idade média igual a 34 anos com variação entre 19 e 62 anos e 50% eram casados. O número de doações variou de 1 a 21 até a data do retorno, sendo 54,5% espontâneas e 45,5% vinculadas. Após a repetição da sorologia, 73 amostras permaneceram inconclusivas e as demais apresentaram resultados negativos. A *Nested-PCR* foi realizada em todas as amostras, porém apenas um doador, entre os 73 que permaneceram inconclusivos no

retorno, apresentou amplificação na região *env* (JA13-16). O percentual de falsos positivos no ELISA(Ag/Ac) e no ELISA(Ac) em relação à Nested-PCR foi de 45,6% e 26,2% respectivamente. A utilização de *primers* para mais de uma região genômica do vírus é necessária, tendo em vista a alta variabilidade genética do HIV.

Descritores: HIV, ELISA, Nested-PCR.

Abstract

The transmission of the human immunodeficiency virus (HIV), ethiological agent of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), constitutes a great concern for blood banks. The objective of this study was to use the Nested-PCR for qualitative identification of the DNA-HIV (provirus) in blood donors with indeterminate results in the screening assays. One hundred-four samples with indeterminate results were collected from November of 2006 to January of 2007, and analysed for the presence of HIV with PCR. The donors that returned for the second collection in a period greater than 20 days and non reactive serology in others screening tests were enclosed in the research. For the diagnosis of the HIV two immunoenzymatic tests had been used (ELISAs): a third generation kit for research of antibodies (Abbott-Murex HIV 1.2.0) and another one a fourth generation assay for antigen and antibody detection (Abbott Hiv Ag/Ab Combination). To clarify the indeterminate results in the ELISAs tests, we used nested primers for *gag* region (*primers JA4-JA7*) and two *env* regions, JA13-JA16 and JA9-12, the last one is the sequence of V3 loop. The population of donors studied was constituted mainly by males (88.7%), with an average of 34 years ranging from 19 to 62 years and 50% of them were married. The percentage of false positives results in ELISA (Ag/Ab) and ELISA (Ab) in relation to the Nested-PCR was of 45,6% and 26,2%

respectively. The use of primers for more than a genomic region of the virus is necessary, in view of its high genetic variability.

Key words: HIV, ELISA, Nested-PCR.

INTRODUÇÃO

A sensibilidade e especificidade dos testes de triagem para o HIV melhoraram consideravelmente nos últimos anos, entretanto, a ocorrência de resultados inconclusivos por estes testes pode causar implicações quando se trata de populações com baixo-risco para a infecção, como os doadores de sangue (KIELLY & WOOD, 2005).

Assim, os casos inconclusivos representam um constante desafio pela necessidade de testes adicionais para elucidar os resultados, pelo estresse gerado por esta situação não só para o doador, como também para os profissionais envolvidos no processo de doação (BARBOSA *et al.*, 1998).

Nos centros de hemoterapia a implantação de melhores critérios para seleção de doadores, o desenvolvimento de técnicas sorológicas mais sensíveis e mais recentemente a detecção viral através de métodos que utilizam ácidos nucléicos, vêm reduzindo a transmissão das doenças infecciosas por transfusão sanguínea (AUBUCHON, 1997; SCARACCHIO, 2007).

Entretanto, continua como fonte principal de infecção viral pós-transfusão o sangue coletado de doadores no estágio inicial da infecção, denominado período de pré-soroconversão (janela imunológica), quando o doador ainda é assintomático, porém virêmico e não apresenta reatividade nos testes de triagem nos bancos de sangue (STRONG & KATZ, 2002).

Para minimizar o problema do período pré-soroconversão, técnicas imunológicas de maior acurácia capazes de detectar de forma mais precoce a infecção, estão sendo desenvolvidas e introduzidas na rotina laboratorial desde a comercialização dos primeiros testes diagnósticos para HIV em 1985 (FERNANDES, 2001; ONUSIDA 2003).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) conhecidos como testes de primeira geração, empregavam抗ígenos procedentes de lisado viral para detecção de anticorpos anti-HIV (IgG), usando anticorpos antiimmunoglobulina humana policlonais conjugados a uma enzima, frequentemente apresentavam reações não-específicas. A partir daí, surgiram os testes de segunda geração melhorando a especificidade pelo emprego de抗ígenos obtidos por técnica de DNA recombinante e/ou peptídeo sintético, contudo a sensibilidade manteve-se a mesma dos ensaios anteriores e não reduziram significativamente a taxa de resultados falsos positivos porque apresentavam o mesmo princípio técnico do teste anterior (THORSTENSSON *et al.*, 1998, BRUST *et al.*, 2000).

Para superar os limites dos ensaios de primeira e segunda geração, foram elaborados os testes de terceira geração, que detectam simultaneamente HIV-1 e HIV-2 e usam na fase sólida抗ígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos. Baseados em novo princípio, estes抗ígenos podem ser conjugados e utilizados para detecção enzimática específica de anticorpos anti-HIV (IgG e IgM) (BRUST *et al.*, 2000; LY, *et al.* 2001).

Apesar desta evolução os laboratórios relataram que os ensaios falhavam em detectar alguns subtipos de HIV, particularmente o HIV-1 do grupo O (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; THORSTENSSON *et al.*, 1998). Assim, os ensaios foram melhorados com modificações que permitiram a detecção de subtipos do HIV (BRUST *et al.*, 2000).

Entretanto, a detecção de anticorpos anti-HIV durante o período da janela imunológica depende de diversos fatores, tais como: a resposta imune inata, a densidade de células alvo no

local da infecção, o número de partículas virais transmitidas e o genoma daquela população viral no hospedeiro (PINTO & STRUCHINER, 2006).

De uma maneira geral, anticorpos podem ser detectáveis em 1 a 2 semanas após a infecção, porém na maior parte das circunstâncias são detectáveis em 30 a 90 dias, após o evento que levou ao contágio em 95% dos indivíduos (GRANATO, 2001).

Atualmente, ensaios de quarta geração, baseados na detecção simultânea de antígeno p24 e anticorpos anti-HIV-1, foram desenvolvidos com a grande vantagem de encurtar o período da janela imunológica em uma a três semanas e teoricamente, estes testes oferecem maior sensibilidade (WEBER *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2006).

Na pesquisa de YEOM *et al.*(2006) a redução no período da janela imunológica com os testes de quarta geração em comparação aos de terceira geração, foi de 6,3 dias em estudo utilizando três painéis de soroconversão.

Com a introdução dos testes moleculares houve acréscimo na sensibilidade para a detecção do vírus em doações realizadas durante o período da janela imunológica (STRONG & KATZ, 2002) e permitiram a detecção precoce da infecção pelo HIV antes da soroconversão (CUNNINGHAM *et al.*, 2003).

Para o diagnóstico laboratorial da infecção primária do HIV-1 por métodos moleculares, é necessária a detecção precoce das seqüências de ácidos nucléicos no plasma (RNA viral) ou do DNA em células mononucleares do sangue periférico (DNA proviral) (BUSH & SATTEN,1997; KLEINMAN & BUSH,2000).

Entretanto, a detecção do provírus (HIV-DNA) é importante, pois este representa um reservatório na fase inicial da infecção (CHUN *et al.*, 1997; BRULSTEN *et al.*,1998). Assim, a amplificação do DNA gêonomico, em populações de baixo risco como os doadores de sangue torna-se essencial para a confirmação do diagnóstico do HIV. O ácido nucléico viral pode ser

detectado até 8 dias antes do aparecimento de anticorpos, otimizando a sensibilidade e a especificidade em relação ao diagnóstico sorológico (BUSH & SATTEN,1997).

CUNNINGHAM *et al.* (2003) demonstraram que no período de pré-soroconversão a detecção do HIV-DNA em doadores de sangue pode esclarecer os resultados indeterminados no teste Western Blot.

O objetivo deste estudo foi utilizar a *Nested-PCR* para identificação qualitativa do DNA-HIV (provírus) obtido a partir de células mononucleares do sangue periférico de doadores de sangue, com resultados inconclusivos na triagem sorológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), vinculado à Secretaria de Saúde do Estado, no período de novembro de 2006 a janeiro de 2007.

População de estudo

A população foi composta por 104 doadores de sangue de ambos os sexos, que retornaram ao Hemocentro por apresentarem resultados inconclusivos para o HIV na triagem sorológica.

Doadores considerados inconclusivos são todos aqueles que apresentaram resultados discordantes entre os dois ELISAs realizados na triagem sorológica.

Dados epidemiológicos como: sexo, idade, estado civil, tipo de doação e número de doações realizadas foram obtidos a partir dos registros dos doadores. O tipo de doação foi

categorizado como vinculada, quando a doação é destinada à reposição do estoque no Hemocentro ou espontânea, quando realizada por motivação própria.

Coleta das amostras

As amostras de sangue dos doadores foram coletadas para a repetição da sorologia em tubos sem anticoagulantes e para a realização dos testes moleculares em tubos com EDTA. O resultado da sorologia de retorno só foi conhecido após realização da *Nested-PCR*.

Aspectos Éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação HEMOPE, sob o número de 036/2006 de acordo com a resolução de nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Método imunoenzimático (ELISA)

Para a repetição da sorologia foram utilizados kits comerciais com as características apresentadas na tabela 1, seguindo as instruções do fabricante.

A interpretação objetiva dos resultados dos ELISAs requer um cálculo através da reação de densidade ótica(DO) de cada doador e o valor do ponto de corte ou cut-off(CO) obtido na reação. Os resultados entre – 10% e +10% do valor do cut-off são considerados indeterminados e se encontram na zona cinza (boderline).

Tabela 1. Características dos ELISAs utilizados na triagem de doadores de sangue.

Características	Murex HIV Ag/Ab (Combination) 4ª geração	MurexHIV1.2.0 3ª geração
Metodologia	EIA Antígeno e Anticorpo Sanduíche	EIA Antígeno Sanduíche
Ac. Capturados na Placa	Específicos	Específicos
Antígenos HIV na placa	Antígenos Recombinantes: HIV-1 gp41;HIV-2 gp36 e HIV-1 pol Peptídeo Sintético gp 41 do HIV-1 subgrupo “O”	Antígenos Recombinantes em Baculovírus: HIV-1 gp41;HIV-2 gp36 e HIV-1 p24 Peptídeo Sintético gp41 do HIV-1 subgrupo “O”
Anticorpos HIV na placa	Anticorpo Monoclonal contra p24 e p26	Não existentes
Antígenos presentes no conjugado	Antígenos Recombinantes : HIV-1 gp 41 HIV-2 gp 36 HIV-1 pol Peptídeo Sintético gp41 do HIV-1 subgrupo “O” Peptídeo Sintético região imunodominante do HIV-2	Antígenos Recombinantes em E.coli : HIV-1 p24 e gp41 (pAx146) – níveis baixos Antígenos recombinantes em E. coli : HIV-1 p24 e gp41 (pDX589) seqüência diferente do pAx146 Peptídeos Sintéticos para HIV-2 gp36 (MDL103) Peptídeos Sintéticos para HIV-1 subgrupo “O” (MDL604)
Anticorpos HIV no Conjugado	Anticorpo Monoclonal contra p24	Não existentes
Anticorpos detectados	IgG ; IgM e IgA	IgG ; IgM e IgA
Tempo de Reação	120 minutos (60'/30'/30')	90 minutos (30'/30'/30')

Reação em Cadeia da Polimerase (*Nested-PCR*)

Primers

As seqüências de nucleotídeos dos *primers* que codificam para a região *gag* e duas regiões *env* do genoma viral e suas localizações no genoma do HIV-1 são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Seqüência de *primers* (nucleotídeos iniciadores) utilizados na PCR e “Nested PCR” e sua localização no genoma do HIV-1.

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' – 3')	Gene e localização
JA4	GAAGGCTTCAGCCCAGAAG	<i>Gag</i> (1319 – 1338)*
JA5	ACCATCAATGAGGAAGCTGC	<i>Gag</i> (1446 – 1465)**
JA6	TATTGTTCTGAAGGGTAC	<i>Gag</i> (1577 – 1558)**
JA7	TCTCCTACTGGGATAGGTGG	<i>Gag</i> (1615 – 1596)*
JA9	CACAGTACAATGTACACATG	<i>Env</i> (7137 – 7156)*
JA10	AAATGGCAGTCTAGCAGAAG	<i>Env</i> (7191 – 7210)**
JA11	ACAATTCTGGTCCCTCC	<i>Env</i> (7532 – 7513)**
JA12	ACAGTAGAAAAATTCCCCTC	<i>Env</i> (7572 – 7533)*
JA13	TTCCTTGGTTCTGGGAGC	<i>Env</i> (8004 – 8023)*
JA14	GCAGCAGGAAGCACTATGGG	<i>Env</i> (8022 – 8041)**
JA15	CCAGGACTCTGCCTGGAGC	<i>Env</i> (8194 – 8175)**
JA16	AGGTATCTTCCACAGCCAG	<i>Env</i> (8209 – 8190)*

* *primers* externos

* *primers* internos

Os *primers* utilizados foram descritos por Albert J. & Fenyö, E.M. (1990).

Ressaltando-se que o conjunto de *primers* JA9-JA12 (*env*) foi desenhado para amplificar nucleotídeos que codificam para região determinante principal de neutralização (região V3) da glicoproteína externa do HIV (gp 120), região hipervariável que possui a capacidade de reconhecer diversas linhagens virais.

Para analisar a sensibilidade e especificidade da *Nested-PCR* utilizamos os *primers* acima em amostras de doadores de sangue reagentes e não reagentes nos ELISAs para HIV. As amostras apresentaram produto de amplificação com todos os pares de *primers*, porém, em um deles foi visualizado apenas produto na região *env* JA13-16. Por outro lado, nos doadores não reagentes para o HIV não foram visualizados produtos amplificados.

Extração do DNA genômico total

O DNA foi extraído utilizando-se o kit para isolamento de DNA genômico EZ-DNA (Biological Industries) seguindo as instruções do fabricante. O princípio segue versão modificada de método Chomenzinski (1987).

Nested- PCR

A Nested PCR é assim denominada por ser realizada em dois ciclos, o que aumenta a especificidade do método.

Para as reações foi preparado um mix com os seguintes reagentes: água bidestilada(14,6 µl), Magnésio (0,8 µl), solução tampão(2,0 µl), taq-polimerase(0,1 µl), DNTPs (0,5 µl), *primers* (1,0 µl),amostras(1,0 µl). Os tubos em cada etapa foram levados ao termociclador com o seguinte programa: 95°C 5 min, 95°C 10 seg, 45 ciclos de 60°C, 94°C, 50°C e 1 ciclo de 72°C 10 seg. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio e visualizados através da luz ultravioleta.

Análise estatística

Os programas utilizados foram : MS Office Excel (versão 2000), SPSS (Statistical Package for the Social Science) for Windows (versão 12.0) para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos e na elaboração das tabelas e redação usamos o MSOffice Word (versão 2000).

RESULTADOS

Caracterização da amostra

Dos 104 doadores de sangue, 82,7% pertenciam ao sexo masculino, sendo 50,0% casados e 54,4% fizeram doação espontaneamente (tabela 3).

Tabela 3: Distribuições dos doadores segundo sexo, idade, estado civil e tipo de doação.

Variável	N	%
SEXO (N=104)		
Masculino	86	82,7
Feminino	18	17,3
ESTADO CIVIL (N=96)*		
Solteiro(a)	46	47,9
Casado(a)	48	50,0
Divorciado(a)	1	1,0
Viúvo (a)	1	1,0
TIPO DE DOAÇÃO (N=99)**		
Espontâneo	54	54,4
Vinculado	45	45,5

* não informado o estado civil de 8 doadores

** não informado o tipo de doação em 5 doadores

A tabela 4 mostra que as idades variaram de 19 a 62 anos com média de 34 anos, e a média de doações foi de 3 por doador.

Tabela 4: Distribuição de doadores segundo a idade e nº de doações realizadas.

Variáveis Quantitativas	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	34,59	32,00	10,40	19	62
Nº de doações	3,12	2,00	3,27	1	21

Resultados da sorologia

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos na triagem e na sorologia de retorno para o ELISA Ag/Ac, onde observa-se que dos 24 casos que foram classificados como indeterminados na triagem, na sorologia de retorno 8 permaneceram nesta categoria, 8 foram negativos e 8 foram classificados como positivos.

Tabela 5: Resultados do ELISA Ag/Ac na triagem e após o retorno.

ELISA Ag/Ac Triagem					
		Negativo	Indeterminado	Positivo	Total
ELISA Ag/Ac Retorno	Negativo	43	8	7	57
	%	91,3%	33,3%	20,6%	54,8%
	Indeterminado	1	8	3	12
	%	2,2%	33,3%	8,8%	11,5%
	Positivo	3	8	24	35
	%	6,5%	33,3%	70,6%	33,7%
Total	N	47	24	34	104
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos na triagem e na sorologia de retorno para o ELISA Ac, onde observa-se que dos 23 casos que foram classificados como indeterminados na triagem, na sorologia de retorno 7 permaneceram nesta categoria, 14 foram negativos e 2 foram classificados como positivos.

Tabela 6: Resultados do ELISA Ac na triagem e após o retorno.

		ELISA Ac					Tota
		Negativ	Triagem	Indeterminad	Positiv		
ELISA Ac Retorno	Negativo	0	5	0	1	0	7
	%	98,2		62,5		25,0	73,1
	Indeterminad	N	1	7	4	1	
	%	1,8		29,2		16,7	11,5
	Positivo	N	0	2	1	1	
	%	0		8,3		58,3	15,4
Total	N	5	2	2	2	10	
	%	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	

Nested -PCR

Das 104 amostras com resultados considerados inconclusivos na sorologia, apenas uma apresentou amplificação pela *Nested*-PCR. A amplificação ocorreu na seqüência da região *env* (JA13-16) não sendo visualizados produtos de amplificação para as outras regiões testadas, *gag* (JA4-7) e *env*(JA9-12).

Sorologia versus Nested-PCR

Dos doadores com resultados negativos para o ELISA Ag/Ac, um apresentou resultado positivo pela *Nested*-PCR, ou seja, um resultado falso negativo pelo método sorológico. Houve também um percentual de 45,6%, de falsos positivos neste ELISA, uma vez que em nenhuma dessas amostras foi detectado DNA viral (tabela 7).

Tabela 7: Resultados do ELISA Ag/Ac e da Nested-PCR

		PCR			
		Negativo	Positivo	Total	
ELISA Ag/Ac	Negativo	56	1	57	
	%	54,4%	100,0%	54,8%	
Positivo*	N	47	0	47	
	%	45,6%	,0%	45,2%	
Total	N	103	1	104	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

*As amostras indeterminadas foram consideradas positivas por estarem mais 10% do valor do cutt-off.

O doador que amplificou na *Nested*-PCR foi também reagente no ELISA Ac. O kit apresentou 26,2% de falsos positivos (tabela 8) .

Tabela 8. Resultados do ELISA Ac versus Nested-PCR

		PCR			
		Negativo	Positivo	Total	
ELISA Ac	Negativo	76	0	76	
	%	73,8%	,0%	73,1%	
	Positivo	27	1	28	
	%	26,2%	100,0%	26,9%	
Total	N	103	1	104	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

Com os resultados das duas tabelas acima (tabelas 7 e 8), foram calculadas as medidas de qualidade dos testes diagnósticos.

Tabela 9: Medidas de qualidade dos testes diagnósticos

Medidas	ELISA Ag/Ac	ELISA Ac
Sensibilidade (%)	0,0	100,0
Especificidade (%)	54,0	74,0
VPP (%)	0,0	4,0
VPN (%)	98,0	100
Acur�ria (%)	45,0	74,0
RV+	0,0	3,85
RV-	1,84	0,0

DISCUSSÃO

Nos centros de hemoterapia a implanta o de melhores critérios para sele o de doadores de sangue e a triagem sorológica sistemática para a pesquisa de anticorpos

anti-HIV, reduziram significativamente o risco de infecção associado à transfusão sanguínea. Porém raros casos ainda são relatados.

Existe efetivamente um período de “janela” entre o inicio da infecção e o aparecimento de anticorpos específicos para HIV, que pode se estender até 90 dias (GRANATO,2001), daí a importância de se considerar ensaios por métodos moleculares no diagnóstico da infecção pelo HIV.

Neste trabalho, utilizamos a *Nested-PCR* para a identificação qualitativa de seqüências do HIV-DNA, em 104 amostras de doadores de sangue com resultados inconclusivos para HIV com base na reatividade dos ELISAs utilizados na triagem sorológica. Doadores com resultados inconclusivos apresentam um maior risco de infecção quando comparados àqueles com resultados negativos. No grupo estudado identificamos um doador com resultado inconclusivo, que apresentou amplificação.

Publicação de PASQUIER *et al.* (2003) indica que uma investigação por métodos moleculares poderá ser decisiva na interpretação definitiva do diagnóstico para o HIV. Pesquisas mostram que a detecção da seqüências do HIV-DNA é possível antes do aparecimento de anticorpos específicos, através da amplificação dessas seqüências de DNA pela PCR (BUSH&SATDEN,1997;YILMAZ,2001).

Segundo DEMETER (2000) a sensibilidade da DNA-PCR é de 95% após 2 semanas de infecção pelo HIV-1 e 99,9% após seis meses de infecção.

Porém, uma das limitações da tecnologia por PCR na identificação do HIV é a variação do genoma e, de acordo com CUNNINGHAM *et al.* (2003) o percentual de detecção do HIV-DNA pela PCR, em indivíduos sabidamente HIV-1 reagentes, pode variar sensivelmente dependendo da escolha dos *primers* utilizados na reação.

Neste estudo utilizamos pares de *primers* de uma região mais conservada do HIV, que é o gene *gag* e dois pares de *primers* para duas regiões do gene env (JA9-12 e JA13-16).

Assim, para confirmar a escolha correta dos *primers* usados na *Nested-PCR*, foram selecionadas amostras de doadores reagentes para HIV. As amostras apresentaram produto de amplificação com todos os pares de *primers*, porém, em um deles foi visualizado apenas produto na região *env* JA13-16. Por outro lado, nos doadores não reagentes para o HIV não foram visualizados produtos amplificados.

Como dito anteriormente, nesse estudo, uma amostra com resultado inconclusivo, ou seja, reagente no ELISA Ac (DO/CO=2,044) e não reagente no ELISA Ag/Ac, apresentou na *Nested-PCR* produto de amplificação para uma das seqüências de *primers* utilizados, a seqüência JA13-16; entretanto, a não visualização de produtos de amplificação com os outros pares de *primers*, pode sugerir a presença de linhagem viral diferente ou baixo número de células que albergam o genoma do HIV, o que resulta em pequeno número de produto amplificado, como relatam alguns trabalhos (REZENDE *et al.* 2002; LY *et al.*,2001; LAETHEM *et al.*,1998). Além disso, mutações na região onde se ligam os *primers* podem impedir a formação de produtos de amplificação (REZENDE *et al.*2002).

Ainda a considerar, a região *gag*, mesmo sendo relativamente conservada pode apresentar amplicons insuficientes levando a resultados falsos negativos, que podem ser atribuídos a formação de dímeros nesta região (CHRISTOPHERSON *et al.*,2001).

Avaliando os resultados da sorologia dos demais doadores inconclusivos e que não apresentaram produto de amplificação, sugere-se que não estejam infectados pelo HIV e que os resultados sorológicos encontrados podem ser interpretados dentro do contexto das reações não específicas, embora, devam ser modulados em relação a quantidade de DNA genômico amplificado, a porcentagem de células mononucleares infectadas com o HIV, a sensibilidade do método e possíveis variantes do vírus.

Segundo PANE *et al.* (1995), até mesmo amostras com resultados situados na zona cinza (*boderline*) nos ELISAs podem significar infecção com pequeno número de cópias do HIV-DNA.

Portanto, não se pode excluir completamente um baixo grau de infecção na população estudada, a comparação da análise sorológica com os resultados da *Nested-PCR* sugere que acompanhar e repetir a sorologia no intervalo de 3 a 12 meses pode ser satisfatório para determinar com segurança a infecção em doadores que inicialmente se apresentaram inconclusivos na sorologia.

Existe um percentual considerável de resultados falsos positivos nos imunoensaios utilizados; o kit ELISA Ac apresentou 26,2% e o kit ELISA Ag/Ac 45,6% de resultados falsos positivos em relação à *Nested-PCR*. Alguns autores relatam que ensaios que combinam Ag/Ac reduzem a especificidade, e isto é um aspecto importante a ser considerado quando se fala de ensaios combinados (LY *et al.*, 2001; WEBER, 2003).

Para PRAHARAJ *et al.* (2003) a utilização de kit que detecta o Ag-24 pode ser útil em populações de alto risco, porém em populações de baixo risco, como doadores de sangue, este pode não apresentar um bom custo-benefício. E de acordo com os autores, nos EUA em bancos de sangue, em apenas 4% de indivíduos assintomáticos são detectados o Ag p24, quando o método naqueles indivíduos com infecção aguda, o percentual de detecção varia de 50 a 75% .

Porém a não reatividade no kit ELISA Ag/Ac para o doador que apresentou produto de amplificação na *Nested- PCR*, pode-se deduzir as seguintes situações: baixo nível de Ag p24, uma vez que a detecção deste ocorre antes do aparecimento de anticorpos, ou seja, na fase aguda da infecção; pela formação de complexos imunes quando da queda do Ag e elevação de anticorpos o que pode inibir a sensibilidade dos ensaios; e pelo fato do kit ELISA (Ag/Ac)

não dispor de antígenos para detecção de anti – p24 (PRAHARAJ *et al.* 2003). Antígeno este, presente no Kit ELISA Ac onde a amostra foi reagente.

Com relação às medidas de qualidade dos testes diagnósticos observa-se um baixo valor preditivo positivo (VPP) nos ELISAs, o que é compatível com a baixa prevalência da infecção pelo HIV na população de doadores do HEMOPE, que foi de 0,1% (86/84.641) no ano de 2006. Investigações realizadas em outras regiões do Brasil e do mundo, apresentaram percentual de 0,2% (ANDRADE NETO *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004).

O ELISA(Ac) em relação à Nested- PCR, apresentou uma acurácia de 74% e a razão de verossimilhança para o teste positivo, mostrou ser 4 vezes maior que a chance do mesmo ser falso. Em relação à especificidade do ELISA(Ac), esta foi de 74% , percentual que representa a capacidade do kit em afastar a infecção quando ela realmente não estava presente.

Este estudo permitiu pela primeira vez neste serviço fazer uma avaliação sobre os resultados dos doadores inconclusivos na sorologia para HIV através de métodos moleculares, contribuindo para sugerir estratégias para o monitoramento dos doadores inconclusivos. O protocolo do método utilizado nesse estudo fica disponível para utilização de estudos posteriores no laboratório de biologia molecular em doadores de sangue.

Dessa forma, o trabalho permitiu realizar uma revisão da rotina laboratorial de doadores de sangue, antecipando-se à proposta da portaria do Ministério da Saúde, que prevê a implantação da técnica de detecção do ácido nucléico (NAT) em serviços de hemoterapia. A determinação foi motivada pela necessidade de se evitar o risco transfusional.

CONCLUSÕES

A presente investigação baseada nos *primers gag* e *env* se mostrou útil, sensível e específica na PCR .

A utilização de um método de detecção por ácidos nucléicos, seja por PCR ou por outros métodos resultantes de sua modificação como o NAT, deve ser considerada, porém se faz necessária a utilização de *primers* para mais de uma região genómica do HIV pela alta variabilidade genética que o vírus apresenta.

A aplicação da PCR não deve ser usada isoladamente, mas sempre acompanhada da sorologia, dando subsídios para melhor uma melhor avaliação naqueles casos que se fizer necessário.

A interpretação dos resultados de doadores inconclusivos mostra ser um desafio para os laboratórios de banco de sangue, pela necessidade de testes adicionais e pelo estresse gerado não só para o doador, como também para os profissionais envolvidos no processo de doação e liberação do sangue.

Espera-se dessa forma contribuir para uma melhor compreensão nos resultados desse grupo de doadores na rotina diária do banco de sangue, dando subsídios para a qualidade das ações oferecidas a esta população.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, J.; FENYO, E.M. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. **J.Clin.Microbiol.** Suécia,v.28,p.1560-4,1990.

ALLAIN, J.P. Will genome detection replace serology in blood screening for microbial agents? **Baillière Clinical Haematology**.França,v.13, n. 4, p. 615-629, 2000.

ANDRADE NETO,J.L.; PINTARELLI,V.L.; FELCHNER, P.C.Z. *et al.* HIV prevalence amongblood donors in a blood bank in Curitiba(Brazil). **Braz.j.Infect.Dis.** Curitiba,,v.6, n.1,p.15-21,2002.

AUBUCHON, J.P. *et al.*Safety of the blood syply in the United States:oportunities and controversies.**Ann.Inter.Med.** Estados Unidos,v.127, n.904-909,1997.

BARBOSA, E.F.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; OLIVEIRA,D.R.HIV-1 Detection and subtyping by PCR and heteroduplex mobility assay in blood donors: Can these tests help to elucidate conflicting serological results? **Transf. Sci.** Belo Horizonte,v.19, n.1, p.,39-43,1998.

BRULSTEN,S.M.P.REISS,P.;LAELIGER,A.E. *et al.* Cellular proviral HIV type 1 DNA load persists after long-term RT-inibitor therapy in HIV type 1 infected persons. **AIDS Res.Hum.Retrovir.** Estados Unidos,v.14,p.1053-1058,1998.

BRUST,S.;DUTTMANN,H.;FELDNER,J .*et al.* Shortening of the diagnostic window with a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test.**J.Virol.Methods**, França,v.90, n.2,p.153-165,2000.

BURTON, D.R.;DESROSIERS R.C.;DOMS,R.W. et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem.**Natur Immunology**. Inglaterra.v.5,n.3,p.233-236,2004.

BUSH, M. P.; SATTEN, G. A. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. Review. **Am J Méd**. Calif nia,v.102,p.117-124, 1997.

CASSEB, J.; KATZEINSTEIN,D.; WINTER,M.*et al.* Serotyping with V3 peptides: detection of high avidity antibodies presenting clade-specific reactivity. **Braz.J.Med.Biol.**Zimbaue,v.35, n.3, p. 369-375, 2002.

CHOMEZINSKI P.; SACCHI, N. **Anal Bichem.**,v.162,p.158-159,1987.

CHRISTIANSEN, B.; JESSEN,T.E.; NIELSEN,C.; STAUN-OLSEN,P. False negative anti-HIV1/2/O screening test.**J.Virol.Methods**.v.90,p.153-156,1996.

CHRISTOPHERSON, C.; SNINSK, J.; KWOK S. The effects of internal primer template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. **Nucleic Acid Res.**v.25,p.654-8, 1997.

CHUN,T.W.;CARRUT,I.; FINZI,D. *et al.* Quantification of latent tissue reservoir and total body viral load in HIV-1 infection.**Nature**.v.387,p.183-188,1997.

CUNNINGHAM, P.; MARRIOT, D.; HARRIS,C. *et al.* False negative HIV-1 proviral DNA polymerase chain reaction in a patient with primary infection acquired in Thailand. **J. of Clin.Virology**.Austrália,v.26, p.163-169,2003.

DEMETER,M.L.;RICHMAN,C.R. Detection of HIV infection diseases.:Churchill Livingston 5^a ed. New York.v.1,p.1369-1375,2000.

FERNANDES, M.F.A. Hemovigilância: análises das informações disponíveis para sua implantação, de acordo com a (re)investigação de casos de AIDS associados à transfusão.2001.Dissertação (mestrado em Saúde Pública)-Faculdade de Saúde Pública,Universidade de São Paulo,São Paulo,2001.

GRANATO, C. Interpretação das técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-HIV. São Paulo, abril 2001.

Disponível em:http://www.fleury.com.br/mednews/0401/cursiHIV_hiv.htm.

Acesso em 20 de março de 2006.

KIELLY, P.; WOOD, E. Can We Improve The Management of Blood Donors With Nonspecific Reactivity in Viral Screening and Confirmatory Assay? **Transfusion Medicine Reviews**, Austrália,v.19, n. 1,p. 58-65,2005.

KLEINMAN, S. H.; BUSH, M. P. The risks of transfusion-transmitted infection direct estimation and mathematical modeling. Review. **Best Practice Res Clin Haematol**, França , v.13,p.631-649,2000.

KWON, J.A.; YOON,S.Y.; LEE,C.K. *et al.* Performance evaluation of three automated human immunodeficiency virus antigen-antibody combination immunoassays. **J.Virol.Methods**,Korea,v.133,p.20-26,2006.

LAETHEM, K.V.; BEUSELINK,K.; VANDOOREN,S. *et al.* Diagnosis of human immunodeficiency virus by a chain reaction assay evaluated in patients harbouring strains of diverse geographical origin. **J. of Virol.Methods**.B lgica,v,70,p.153-166,1998.

LY, T. D.; LAPERCHE, S.; COUROUC , A. M. Early detection of human immunodeficiency virus infection using third and fourth-generation screening assays. **Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis**.França ,v .20,p.104-110,2001.

PANE,F.; BUTT ,S.; GOBBO,M.L. *et al.* Direct detection of Proviral gag segment of the Human Immunodeficiency V rus in Peripheral Blood Lymphocytes by Colorimetric PCR Assay as a Clinical laboratory Tool Applied to Different At-Risk populations. **J. of Clin. Virol**.Itlia, v.33,n3, p.641-647,1995.

PASQUIER, C. SANDRES-SAUNE, K.; MANSUY,J.-M. *et al.* Virological exploration of individual with discordant HIV screening tests. **J. of Clin. Virol**. França,v.30, p.218-223,2004.

PINTO, M.E.; STRUCHINER, C.J. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Cad. de Saúde Pública**, Rio de Janeiro,v.22,n.3,p.473-484,2006.

PRAHARAJ, A.K.; AGADI,K.; KALGATGI, A.T. et al.Early Diagnosis of Human Immnudeficiency vírus Infection by p24 Antigen Detection. Pune, **MJAFI**,v.59,p.313-315,2003.

REZENDE, P.R.; ALVES, G.B.; PEREIRA L.M.C.; VALE, T.J.I. et al. .Sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase para HIV-! Em relação à técnica de ensaio imunoenzimático. **Rev.Bras.Hematol.Hemoter** São Jose do Rio Preto..v.24, n.1, 2002.

SCURACCHIO, P.S.P.;POLI, M.C.C.; LEMOS,M.M.M. et al. Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid-amplification technology. **Transfusion Medicine**,São Paulo,v.17, p. 200-204,2007.

STRONG, M; KATZ, L. Blood-bank testing for infectious diseases: how safe is blood transfusion? **TRENDS in Molecular Biology**.v.8, n.7, 2002.

THORTEENSSON, R.S.; ANDERSON, S.; LINDBACK,F. et al .Evaluation of 14 commercial HIV1/HIV2 antibody assays using serum panels of different geographical origin and clinical stage including a unique seroconversion panel. **J.Virol.Methods** v.70,p.139-151,1998.

WANG, B.; HIGGINS, M.J.; KLEINMAN,S. et al. Comparison of demografic and donation profiles and transfusion-transmissible disease markers and risk rates in previously transfused and nontransfused bloood donors. **Transfusion**, v.44, n.8, p.1243-1251,2004.

WEBER,B.; THORTENSEN,R.;TRANPASERT, S. *et al.* Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency -1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. **Vox Sang.**Luxemburgo. v.85, p.73-79, 2003.

YEOM,J.S.; JUN,G.;CHANG,Y. *et al.* Evaluation of a new fourth generation enzyme- linked immunosorbent assay, the LG HIV Ag-Ab Plus, with a combined HIV p24

antigen and anti-HIV-1/2/O screening test.. **J.Virol.Methods .** Korea,v.137,p.292-297, 2006.

YILMAZ, G. Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy.**J.Clin. Virology.**Turquia, v.21, p.187-196,2001.

ZOLLA-PAZNER, S.; ZHONG, P.; REVESZ, K. *et al.* The Cross-Clade Neutralizing Activity of a human Monoclonal Antibody is Determined by the GPGR V3 Motif of HIV Type 1.**AIDS research and Human Retoviruses,** v.20, n.11, p.1254-1258, 2004.

ANEXOS



Comitê de Ética em Pesquisa

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL Nº 036/06 -A

Título do Projeto: Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase para o Diagnóstico do HIV em doadores de Sangue Discordantes nos Ensaios Imunoenzimáticos de Triagem.

Instituição Solicitante: UFPE

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação Hemope

Responsável: Maria Iraci Buarque Valença

Identidade: 1.307.323 – SSP-PE

CPF: 349.963.384 -15

Endereço: Rua Pereira Simões, 463/1201 – Bairro Novo - PE – CEP 53630-060.

Telefone: 81 – 3439-1212 / 8817-3833

Finalidade: Titulação de Pós-Graduação

2 – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope = CEP, em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº 036/06, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo..

3 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CNS Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- **Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.**

CEP hemope, 20 de novembro de 2006

Maria Emilia dos Santos
Coordenadora

FUNDAÇÃO HEMOPE
Rua Joaquim Nabuco,171
Recife-PE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____
RG:Nº _____,aceito participar do estudo:Aplicação de Testes Moleculares em Doadores de Sangue da Fundação Hemope, que tem como objetivo melhorar o serviço com métodos mais sensíveis e específicos, trazendo benefícios ao processo de doação.
Me foi esclarecido o seguinte:

- Que a minha colaboração consistirá em coletar amostras de sangue para serem utilizadas no novo procedimento técnico
- Que a minha participação não é obrigatória e que, a qualquer momento, poderei desistir ou retirar meu consentimento.
- Que durante a pesquisa poderei tirar qualquer dúvida, recebendo novos esclarecimentos por parte do pesquisador através dos telefones:34164658/34164654.
- Que o pesquisador assegurará o sigilo absoluto sobre minha identidade.

Recife,____ de _____ de 2006.

Assinatura do voluntário

Dados da pesquisadora
Nome:Maria Iraci Buarque Valença
Conselho Regional de Biomedicina Nº442
Fone:34164658/34164654