

Proc. Número: 91025  
R 13840 881/05 BES  
27/08/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

PAULO GERMANO DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE TESTE COMBINADO ANTÍGENO/ANTICORPO NA  
IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÃO RECENTE DE HIV-I/II EM DOADORES DE SANGUE

T 616.9792u  
C 327a

FORTALEZA  
2004



PAULO GERMANO DE CARVALHO

## AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE TESTE COMBINADO ANTÍGENO/ANTICORPO NA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÃO RECENTE DE HIV-I/II EM DOADORES DE SANGUE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

## FORTALEZA

2004



C327a Carvalho, Paulo Germano de  
Avaliação do emprego de teste combinado  
antígeno/anticorpo na identificação de infecção recente  
de HIV-I/II em doadores de sangue / Paulo Germano de  
Carvalho. - Fortaleza, 2004.  
94 f. : il.  
Orientador: Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz.  
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.  
Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de  
Patologia.  
1. Sorodiagnóstico da AIDS. 2. Doadores de sangue. 3.  
Soroconversão. I. Título.

CDD 616.9792

PAULO GERMANO DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE TESTE COMBINADO ANTÍGENO/ANTICORPO NA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÃO RECENTE DE HIV-I/II EM DOADORES DE SANGUE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Data da Aprovação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias

Prof. Dr. Herivaldo Ferreira da Silva

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paola Frassinetti Ferreira Torres da Costa

Aos meus Pais, em especial, ao meu pai, amigo...  
Exemplo de vida, digno do meu respeito e admiração.



A minha esposa, Denise, motivo de alegria em minha vida, presente na minha caminhada.



Ao meu amigo, Francisco Braga Andrade modelo de  
virtudes humanas e profissionais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todas as graças que têm me dado.

A minha esposa, **Denise**, pelo seu irrestrito apoio em todas as minhas decisões.

Aos meus pais, **Socorro e Carvalho**, exemplo vivo de amor, coragem, determinação e perseverança.

Aos meus irmãos, **Carlos, Fernando e Patrícia**, felizes por minhas conquistas.

Ao Dr. Francisco **Braga Andrade**, doutor em seus ensinamentos, amigo experiente e justo, a minha profunda gratidão.

Ao meu orientador, Dr. José **Ajax Nogueira Queiroz**, pela paciência e apoio que foram fundamentais para concretização desse trabalho.

Às diretoras do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), Dra. **Clara** e Dra. **Acy**, pela serenidade, disponibilidade e objetividade no transpor de desafios, o meu muito, muito obrigado.

A Dra. **Wania**, pessoa humana que despertou meu gosto pela hematologia e hemoterapia.

A Dra. **Aparecida**, pela ajuda inestimável e a certeza de uma amizade duradoura.

Aos meus colegas, **Lúcio e Elaine**, pela amizade, compreensão, colaboração e presteza em nosso ambiente de trabalho.

Ao Prof. **Jorg Heukelbach**, pelo precioso apoio estatístico e início de uma amizade.

A todos os funcionários do laboratório de sorologia do HEMOCE, em especial a **Lucia** e a **Paula** pela ajuda direta e incansável na organização da coleta de dados.

Aos meus amigos, Dra. **Romélia**, Dr. **Everardo**, Dr. **Fernando**, Dr. **Herivaldo**, Dra. **Paola**, Dra. **Sílvia**, **Ilka**, **Lenilton**, **Herene**, **Sandra**, **Nilton**, **Aline**, **Luiza**, ... pela certeza de que sempre torceram por mim.

Em especial, a Dra. **Alzira** que disponibilizou a aquisição dos testes HIV VIDAS DUO (Biomerieux), e também a todos os **doadores** de sangue do HEMOCE; colaboradores indispensáveis para realização de nossa pesquisa, verdadeiros motivos de nosso trabalho.

“A educação é um dos poucos bens que não se destrói com o seu consumo”

Júlio Jacob Waiselfisz

## RESUMO

Uma das vias de transmissão do HIV é através da transfusão de sangue. O emprego de testes em centros hemoterápicos capazes de detectar a infecção no período da janela imunológica, entre a viremia inicial e a soroconversão, continua sendo um desafio para a comunidade científica. A ocorrência de sinais e sintomas clínicos associados à doença e à conduta do doador pode indicar a presença da infecção. **Objetivo.** O principal objetivo do trabalho foi investigar a ocorrência de infecção recente de HIV através da utilização de teste combinado antígeno/anticorpo (HIV VIDAS DUO) e de dados epidemiológicos de doadores de banco de sangue. **Metodologia.** O estudo foi desenvolvido no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará de dezembro de 2000 a dezembro de 2003. Um novo ensaio que detectava antígeno p24 e IgG anti-HIV-1/2 no soro humano foi introduzido aos demais testes utilizados na rotina sorológica e realizado em 998 doadores. Amostras com resultados positivos ou inconclusivos, sejam nos testes convencionais (Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon e ICE HIV-1.0.2/Murex), ou no teste em estudo (VIDAS HIV DUO/BioMérieux), foram submetidas a provas de *Western Blot* (HIV Blot 2.2/Murex). Os doadores foram então convocados para nova coleta de sangue e novos ensaios de ELISA foram realizados. Testes de *Western Blot* foram novamente utilizados para confirmação dos resultados. **Resultados e discussão dos resultados.** A população de doadores de sangue era constituída, em sua maioria, por indivíduos voluntários do sexo masculino, com idades acima de 29 anos. As médias percentuais de rejeição clínica de doadores e de descarte de unidades hemoterápicas por inaptidão sorológica foram 21,3% e 8%, respectivamente. Entre os fatores freqüentes como causa de rejeição clínica estavam a relação sexual sem uso de preservativo, o estado gripal, níveis de hematócrito e hemoglobina abaixo dos valores aceitáveis e jejum prolongado. Sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança e o coeficiente Kappa foram calculados. Dentre os 998 doadores, 937 foram negativos nos três ensaios de ELISA e 61 (6,1%) apresentaram resultados positivos ou inconclusivos em pelo menos um teste. Entre os 61 doadores, 11 confirmaram-se positivos e 50 negativos no *Western Blot*. Nenhum caso de soroconversão foi verificado. A sensibilidade do teste combinado foi de 100%. As especificidades encontradas para os ensaios foram 99,0% (Vironostika HIV Uni-form II plus O), 99,3% (VIDAS HIV DUO) e 99,7% (ICE HIV-1.0.2). O coeficiente Kappa entre os testes de rotina foi de 60,4%. As concordâncias entre o teste combinado e os testes ICE HIV-1.0.2 e Vironostika HIV Uni-form II plus O foram Kappa=68,30% e Kappa=54,10%,  $p<0,0001$ , respectivamente. **Conclusões.** Os resultados mostraram que o desempenho do teste combinado é comparável aos métodos existentes no mercado. Entretanto, novos estudos são necessários para que se confirme sua utilidade na detecção de infecção recente de HIV em serviços de bancos de sangue.

Palavras-chave: doador, HIV, Soroconversão.

## ABSTRACT

Blood transfusions is one of ways to infecte people with HIV virus. The use of tests in blood banks able to detect the infection during the period of immunological window, between the initial viremia and the serumconversion, has been a challenge to the scientific community. The occurrence of clinical signs and symptoms associated to the disease, and the behaviour of the donors are also evidences of the presence of the infection. **Objective.** The main purpose of the study was investigate the occurrence of recent infection of HIV through the use of antigen / antibody combined test (HIV VIDAS DUO) and epidemiological data from blood bank donors. **Methodology.** The study was developed in the Center of Hematology and Hemotherapy of Ceará from december/2000 to december/2003. A recent trial that detected antigen p24 and IgG anti-HIV-1/2 in the human serum, was inserted in the serum routine and applied in 998 donors. Samples whose results were positive or inconclusive, whether in the conventional tests (Vironostika HIV Uni-form II plus O'Organon and ICE HIV-1.0.2/Murex), or in the study test (HIV VIDAS DUO/BioMérieux), were submitted to *Western Blot* essays (HIV Blot 2.2/Murex). The donors were then convoked to a new blood collection and new trials of ELISA were accomplished. The *Western Blot* tests were carried out again to confirm the results. **Results and discussion of the results.** The population of blood donors was constituted, in its majority, by male individual volunteers, with the age above 29 years old. The percentual mean of inaptness clinic of donors and serum inaptness were respectively, 21,3% and 8%. Among the most frequent factors as cause of clinical rejection were the sexual practice without the use of condom, the gripe state, hematocrite and hemoglobin levels under the acceptable values and prolonged fasting. Sensitivity, specificity, likelihood ratios, and the Kappa coefficients were calculated. Of the 998 blood donors, 937 had negative results for HIV in all three ELISA tests, and 61 (6,1%) had at least one positive or inconclusive result. Of these 61, 11 were confirmed to be positive by *Western Blot*. There was no case of seroconversion. The sensibility of the combined test was 100%. The specificities of the tests were 99,0% (Vironostika HIV Uni-form II plus 0), 99,3% (VIDAS HIV DUO) and 99,7% (ICE HIV-1.0.2). The Kappa coefficient between the routine tests was 60,4%. The agreement between the combined VIDAS HIV DUO test and the ICE HIV-1.2.0 and Vironostika HIV Uni-form II plus 0 tests were Kappa=68,3% and Kappa=54,1%;  $p<0,0001$ , respectively. **Conclusion.** This study shows that the performance of the combined VIDAS HIV DUO test is similar to commercially available routine tests. Further studies are needed to confirm the usefulness of the combined test for detecting recent HIV infection in sera of blood donors.

Key-words: donor, HIV, Seroconversion



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA-1.</b> Marcadores biológicos e sorológicos do HIV associados a infecção e doença .....	30
<b>FIGURA-2.</b> Fluxograma utilizado no HEMOCE para detecção de anti-HIV .....	38
<b>FIGURA-3.</b> Aparelho automatizado (Gênesis RMP 150) usado para realização do teste de ELISA.....	39
<b>FIGURA-4.</b> Princípio do teste de ELISA. Esquema do método de sanduíche em uma etapa.....	40
<b>FIGURA-5.</b> Automação do teste de ELISA para pesquisa de anti-HIV .....	41
<b>FIGURA-6.</b> Lavadora automatizada de placas de ELISA.....	41
<b>FIGURA-7.</b> Princípio do teste de ELISA. Esquema do método de captura.....	42
<b>FIGURA-8.</b> Lavadora e leitora automatizada utilizada para realização do teste de ELISA.....	43
<b>FIGURA-9.</b> Princípio do teste de <i>Western Blot</i> .....	44
<b>FIGURA-10.</b> Aparelho semi-automático (Profi-Blot II N V.2.08) para realização do teste de <i>Western Blot</i> .....	44
<b>FIGURA-11.</b> Bandeja de utilização no aparelho usado para realização de <i>Western Blot</i> .....	45
<b>FIGURA-12.</b> Padrão de reação com as proteínas e glicoproteínas estruturais .....	46
<b>FIGURA-13.</b> Aparelho automatizado utilizado para realização do teste combinado Ag/Ac HIV VIDAS DUO.....	48
<b>FIGURA-14.</b> Tira e cone - componentes do ensaio do teste combinado HIV DUO.....	49
<b>FIGURA-15.</b> Tira e cone no aparelho VIDAS PC .....	49
<b>FIGURA-16.</b> Princípio do teste combinado HIV VIDAS DUO.....	51
<b>FIGURA-17.</b> Algoritmo da análise sorológica para HIV na população de doadores em estudo.....	60

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO-1.</b> Distribuição dos doadores segundo o sexo .....	54
<b>GRÁFICO-2.</b> Distribuição dos doadores segundo a idade .....	54
<b>GRÁFICO-3.</b> Distribuição dos doadores segundo o tipo de doação .....	55
<b>GRÁFICO-4.</b> Distribuição dos doadores segundo o tipo de doador .....	55
<b>GRÁFICO-5.</b> Distribuição de taxa (%) de rejeição clínica em doadores do HEMOCE.....	56
<b>GRÁFICO-6.</b> Distribuição da freqüência de descarte de unidades hemoterápicas por inaptidão sorológica.....	57
<b>GRÁFICO-7.</b> Prevalência dos principais motivos de recusa clínica em doadores de sangue.....	57
<b>GRÁFICO-8.</b> Freqüência dos resultados sorológicos (ELISA/DUO) para HIV em doadores de rotina de do banco de sangue do HEMOCE.....	59
<b>GRÁFICO-9.</b> Prevalência de sorologia positiva para HIV dentre os 998 doadores .....	61

1.2.2 Motivos na negação da previsão de doação

TABELA-8. Especificidade da testagem para HIV entre os 998 doadores

respectivos intervalos de confiança

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA-1.</b> Distribuição das proteínas presentes na tira de nitrocelulose do teste de <i>Western Blot</i> , segundo o peso molecular, o gene, o antígeno e sua descrição.....	45
<b>TABELA-2.</b> Proteínas presentes na tira de nitrocelulose segundo critérios de reatividade.....	47
<b>TABELA-3.</b> Dados de interpretação dos resultados em função do valor do teste.....	52
<b>TABELA-4.</b> Distribuição da freqüência (%) dos principais motivos de recusa clínica em doadores de sangue .....	58
<b>TABELA-5.</b> Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste HIV VIDAS DUO na ausência ou presença de doença .....	62
<b>TABELA-6.</b> Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste Vironostika HIV Uni-form II plus O na ausência ou presença de doença .....	63
<b>TABELA-7.</b> Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste ICE HIV-1.0.2/Murex na ausência ou presença de doença .....	63
<b>TABELA-8.</b> Especificidade diagnóstica apresentada nos três testes enzimáticos e seus respectivos intervalos de confiança.....	64

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-HBc – Anticorpos contra o vírus da hepatite B

VDRL – Teste de fluorescência reagente de枣

HRP – Horseradish peroxidase reagent

TMB – Tetrametilbenzidina

BCIP/NBT – 3-Brindisídia e nitro-tetrazolium

ENV – Envelope protein

POL – Polimerase (polymerase chain reaction)

GAG – Grupo sulfato

ELISA – Detecção imunoabsorvente

ICTV – Valor reprodutor de 50% (50% Infectivity Concentration Value)

CMV – Citomegalovirus

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DST – Doenças sexualmente transmissíveis
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- HSV – Herpes simples vírus humano
- HBV – Vírus da hepatite B
- HPV- Vírus do papiloma humano
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- CDC – Centers for Diseases Control
- LAV – Linfadenopatia associada a vírus
- HTLV – Vírus linfotrópicos de células T humanas
- PCR – Reação em cadeia de polimerase
- MS – Ministério da Saúde
- ONG – Organizações Não-Governamentais
- FDA – Food and Drugs Administration
- ELISA - Enzimaimunoensaio
- NAT – Testes de ácidos nucléicos
- NCI – Instituto Nacional do Câncer
- HBsAg – Antígeno de superfície do vírus B da hepatite
- Anti-HBc – Anticorpos contra o antígeno core do vírus B da hepatite
- VDRL – Veneral diseases research laboratory
- HRP – Horseradish peroxidase (enzima)
- TMB - Tetrametilbenzidina
- BCIP/NBT – 5-Bromo-4-cloro-3-indolfosfato/tetrazólio nitroazul
- ENV – Envelope (antígenos derivados)
- POL – Polimerase (proteínas associadas ao gene)
- GAG – Grupo antígeno específico
- ELFA – Detecção final de fluorescência
- RFV – Valor relativo de fluorescência
- CNTS – Centro Nacional de Transfusão Sangüínea

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE GRÁFICOS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) .....</b>	<b>17</b>
1.1.1 Origem .....	17
1.1.2 Epidemiologia .....	18
1.1.3 AIDS e transfusão .....	21
1.1.4 Diversidade genotípica do HIV .....	24
1.1.5 Evolução dos testes imunológicos .....	26
1.1.6 Uso de testes combinados antígeno/anticorpo.....	29
1.1.7 Testes laboratoriais, sinais e sintomas clínicos, tempo de retorno do doador- identificação de infecção primária .....	32
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Realização dos Exames .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Testes de ELISA .....	39
3.1.2 Teste complementar para pesquisa de anti-HIV ( <i>Western Blot</i> ) .....	43
3.1.3 Teste combinado antígeno/anticorpo .....	48
<b>3.2 Comparação do ensaio .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Legitimidade .....</b>	<b>53</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Caracterização da população de doadores.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Provas sorológicas nas amostras .....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Análise sorológica da primeira amostra .....	59



<b>4.2.2 Análise sorológica da segunda amostra .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Investigação de soroconversão .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Prevalência da doença .....</b>	<b>61</b>
<b>4.5 Determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica e dos valores preditivos negativo e positivo dos testes enzimáticos .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.1 Teste combinado (HIV VIDAS DUO) .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.2 Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon .....</b>	<b>63</b>
<b>4.5.2 ICE HIV-1.0.2/Murex .....</b>	<b>63</b>
<b>5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) ocupam destaque entre as doenças infecciosas que acometem a população sexualmente ativa. A ênfase dada nos últimos anos à importância do contato sexual na aquisição dessas e de outras infecções promoveu o agrupamento do grande número de doenças (AMATO NETO et al, 1989).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a incidência global de DST curáveis seja de aproximadamente 333 milhões/casos por ano, sendo que nos países em desenvolvimento, elas se encontram entre doenças para as quais indivíduos em idade adulta mais procuram atenção médica. Nos países economicamente emergentes e nos subdesenvolvidos, as complicações maternas diretamente relacionadas a DST não tratadas são uma importante causa de morbi-mortalidade materna e infantil (DALLABETTA et al, 1997). No Brasil, segundo a OMS ocorrem cerca de 12 milhões de casos de DST ao ano, sendo que apenas 200 mil são notificados (Dados, 2004b).

Segundo Samuelson (2001), os patógenos transmitidos sexualmente podem ser bactérias, vírus, fungos, protozoários ou ectoparasitas. Dentre as bactérias pode-se citar, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Ureaplasma urealyticum*, *Calymmatobacterium donovani*, bacilos Gram-negativos, estreptococo do grupo B, e organismos associados; de origem viral, Herpes simples vírus humano 1 e 2 (HSV), o herpesvírus (beta) 5 humano - citomegalovírus (CMV), o vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus do papiloma humano (HPV), o vírus *Molluscum contagiosum* e o vírus da Imunodeficiência humana (HIV). Entre os agentes protozoários o *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*; entre os fúngicos a *Candida albicans* e, entre os ectoparasitas, o *Phthirus pubis* e *Sarcoptes scabiei*.

No passado, essas doenças predominavam em indivíduos com baixo nível sócio-econômico e hábitos sexuais promíscuos; na atualidade têm sido diagnosticadas em pessoas de vários segmentos sócio-econômicos (BUCHALLA, 1995; DALLABETTA et al, 1997).

Independente da origem dos agentes infecciosos, a dinâmica das DST evidencia características demográficas, culturais e comportamentais das populações e possibilita o estabelecimento de correlações entre as mesmas (BUCHALLA, 1995; DALLABETTA et al, 1997).

Recentemente, novos agentes infecciosos, incluindo vírus emergentes, tem sido descritos e somado as DSTs clássicas. A AIDS se configurou rapidamente como uma das maiores ameaças à saúde pública em todo o mundo (BUCHALLA, 1995; DALLABETTA et al, 1997).

## 1.1 Vírus da Imunodeficiência Adquirida

### 1.1.1 Origem

Casos individuais de imunossupressão acompanhados por infecções oportunistas eram conhecidos em sociedades industrializadas desde as décadas de 60 e 70. Entretanto, em junho de 1981 foram reportados ao *Centers for Diseases Control* (CDC) cinco casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* ocorrendo em jovens do sexo masculino da cidade de Los Angeles. Desde então, várias outras afecções oportunistas e neoplásicas passaram a ser descrita em homossexuais ou usuários de drogas injetáveis que apresentavam comprometimento do sistema imunológico com disfunção de linfócitos T (THULER;VAZ, 1994).

Em 1982, 65% dos casos de AIDS notificados em todo mundo eram de homossexuais/bissexuais e usuários de drogas injetáveis (16% a 23%) residentes em grandes centros urbanos. Outros casos, entre hemofílicos, pacientes hemotransfundidos, imigrantes da África e do Caribe e algumas crianças nascidas de mães pertencentes a esses grupos foram descritos em vários locais do mundo. Isso sugeriu que a transmissão viral não se fazia apenas pelo contato sexual, mas também através do sangue e secreções do indivíduo contaminado (IDSA, 1988; SIDA, 2000).

O primeiro relato de isolamento do retrovírus foi feito por pesquisadores franceses a partir de um gânglio linfático retirado de um homem homossexual com linfadenopatia múltipla, tendo sido a enfermidade denominada linfadenopatia associada a vírus (LAV) (CHERMANN et al, 1984). Na mesma época, cientistas americanos do Instituto Nacional do Câncer (NCI) isolaram um retrovírus de um paciente com AIDS, denominando-o de HTLV-III (vírus linfotrópicos de células T humanas tipo III) (GALLO et al, 1984). Posteriormente, o termo HIV substituiu ambas denominações, obedecendo à proposta do Comitê Internacional de Taxonomia das Viroses (COFFIN et al, 1986).

Após a descoberta do HIV, um subtipo diferente foi isolado de amostras enviadas ao Instituto Pasteur por médicos portugueses obtidas de dois pacientes do leste da África com AIDS e que apresentavam sorologia repetidamente negativa (CLAVEL et al, 1986). Foi então denominado HIV-2. Estes vírus (HIV-1 e HIV-2) pertencem à família dos lentivírus do grupo dos retrovírus e possuem o material genético envolto por um envelope. Trata-se de um vírus RNA que utiliza a enzima transcriptase reversa para a síntese de cópias de DNA complementar a partir do genoma de RNA. Atualmente, com a descoberta de novas técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) a amplificação de partes do genoma viral tem sido realizada permitindo a detecção e o estudo do vírus e seus subtipos (AMATO NETO, 1996).

### 1.1.2 Epidemiologia

O número de pessoas portadoras de HIV continua aumentando anualmente. Neste ano, a pandemia da AIDS completa 24 anos, e os modos de transmissão viral parecem ser os mesmos daqueles vistos inicialmente, ou seja, através da prática sexual desprotegida, do uso de drogas injetáveis, da transfusão de sangue de hemocomponentes, da transmissão materno-fetal e do contato direto com sangue contaminado (STEINBROOK, 2004).

Segundo estimativas da OMS, até o final de 2003, entre 34,6 milhões a 42,3 milhões de pessoas foram consideradas portadoras de HIV/AIDS em todo o mundo. Durante o ano corrente, cerca de 4,8 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus e 2,9 milhões morreram

devido à doença. Quando a infecção surgiu na década de 80, dois terços da população infectada residia na África. Embora represente apenas 11% da população mundial, o continente africano continua sendo responsável pelo maior número de pessoas infectadas pelo HIV. Dentre os nove países que têm a maior prevalência do vírus no mundo, oito pertencem à região da África Sahariana: África do Sul (5,3 milhões), Nigéria (3,6 milhões), Zimbábue (1,8 milhões), Tanzânia (1,6 milhões), e os quatro restantes têm mais de 1 milhão de indivíduos doentes (Congo, Etiópia, Quênia, e Moçambique). Em grande parte da região, a prevalência de HIV tem permanecido com níveis elevados, embora estáveis. Isso justifica a persistência de novas infecções, associadas a uma alta mortalidade devido a AIDS. Atualmente, a relação heterossexual tem sido considerada o principal meio de transmissão. As mulheres são as mais atingidas e respondem por 58% dos casos. Sem cuidados e medicação, a sobrevida do paciente infectado é de 9 a 11 anos. Cerca de 2,2 milhões de pessoas morreram com AIDS na África Sahariana em 2003, correspondendo a 76% do total global. No entanto, somente 6000 pessoas foram a óbito por causa da doença na Europa, devido ao tratamento contínuo e amplamente disponível (ALDEN, 2000; ONUSIDA, 2003; STEINBROOK, 2004).

A prevalência da AIDS em crianças permanece elevada na África Sahariana. Mais de dois milhões de mulheres com HIV concebem crianças com risco de infecção a cada ano. Apesar da disponibilidade de tratamento anti-retroviral para essas mulheres, cerca de 630.000 crianças contraem o HIV das mães, sendo 550.000 residentes na África Sahariana. A estimativa era que houvesse 2,1 milhões de jovens portadores da doença entre 0-15 anos de idade até o final de 2003, sendo que 90% vivem na África, 290.000 na Nigéria e 230.000 na África do Sul. Em 2003, cerca de 490.000 crianças morreram de AIDS, incluindo 440.000 da África Sahariana (STEINBROOK, 2004).

A prevalência da AIDS não está aumentada apenas na África; aproximadamente nove milhões de asiáticos estão infectados com o vírus. Na Índia há meio milhão de pessoas infectadas. Na Europa quase dois milhões de adultos e crianças são portadoras da síndrome. Nos Estados Unidos da América (EUA), a estimativa é de que 950.000 pessoas convivem com a doença. Na América Latina houve 70.000 mortes associadas ao vírus, tendo ocorrido 120.000 a 180.000 novos casos em 2003, somando-se aos 1,9 milhões de pessoas portadoras da doença. Em outros

países, mais recentemente na China, Indonésia, algumas repúblicas da Ásia Central e nos Estados Bálticos a doença continua a se expandir, principalmente devido ao crescente consumo de drogas endovenosas. As relações homossexuais entre homens representam uma realidade em todas as partes do mundo e apesar das constantes campanhas de prevenção da AIDS direcionadas a esses grupos continuam responsáveis por muitas das epidemias que se propagam nas Américas, Ásia, África e Europa (ONUSIDA, 2003; STEINBROOK, 2004).

No Brasil não existem estudos populacionais para a determinação da prevalência de HIV e as informações existentes sobre disseminação do vírus restringem-se às notificações dos casos de AIDS e a estudos em grupos populacionais específicos. De acordo com os dados do Ministério da Saúde (MS), até dezembro de 2002, 257.780 casos de AIDS foram notificados, sendo 185.061 homens e 72.719 mulheres. Esses números já somam 277.154 casos em setembro de 2003, sendo 197.340 em homens e 79.814 em mulheres. Quanto aos novos casos foram contabilizadas 9495 casos – 6031 observados em homens e 3464 em mulheres. Somente no ano de 2003 foram notificados 5.762 novos casos da epidemia e, desses, 3693 foram verificados em homens e 2069 em mulheres, mostrando que a incidência está aumentando entre as mulheres. A incidência da AIDS por 100.000 habitantes é de aproximadamente 5,4% no Nordeste do país, sendo que o Ceará responde por 1,6% desse percentual. A média anual de casos de AIDS nos últimos cinco anos é de 526. Em Fortaleza, somam-se 2856 pacientes. Atualmente o Brasil tem aproximadamente 680 mil portadores do vírus, incluindo pessoas que já desenvolveram AIDS e excluindo-se os óbitos. A incidência da doença ocorre em todas as faixas etárias, havendo maior prevalência entre indivíduos com idade entre 25 e 49 anos, o que representa cerca de 70% da população atingida (BRASIL, 2004; CASOS, 2004; DADOS, 2004a, DADOS, 2004c).

Profundas transformações no perfil epidemiológico da infecção foram observadas no Brasil. Sua imagem intrinsecamente associada à homossexualidade masculina, ao sexo com múltiplos parceiros, ao uso de drogas injetáveis e/ou ao alto nível sócio-econômico, foi reconstruída a partir de um complexo quadro de relações heterossexuais, da elevação da taxa de infecção entre indivíduos com baixa escolaridade e baixa renda e do aumento de casos em cidades pequenas do interior do país (AMATO NETO, 1996, BRASIL, 1998).

Apesar de tudo o Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento que lançou um projeto de prevenção e tratamento da doença. O número de medicamentos distribuídos pelo Ministério da Saúde representa mais da metade dos remédios concedidos a doentes de AIDS entre os países mais pobres. Ocorreu um controle e diminuição da evolução da epidemia, resultado de uma série de fatores como os programas de prevenção e um esforço conjunto entre Organizações Não Governamentais (ONG), veículos de propaganda e governo para combater o avanço do HIV (BRASIL, 1997).

### 1.1.3 AIDS e transfusão

A síndrome da imunodeficiência adquirida foi descrita nos Estados Unidos em 1981. A princípio, se apresentava distribuída principalmente entre grupos específicos: homossexuais/bissexuais masculinos, usuários de drogas injetáveis e população do Haiti. Em 1982, foi evidenciada a primeira descrição da doença semelhante à AIDS em hemofílicos e receptores de hemoderivados. Através desses relatos, levantou-se a hipótese de transmissão sanguínea do agente etiológico da AIDS, tendo-se iniciado esforços para excluir das doações de sangue indivíduos com sintomas e/ou sinais ou que apresentavam fatores de risco associados com a AIDS. Os pacientes hemofílicos apresentavam maior risco de infecção pelo HIV do que a população em geral devido à maior exposição aos produtos sanguíneos (crioprecipitado) freqüentemente administrados. Assim, a partir das evidências epidemiológicas, mesmo antes da identificação do vírus da AIDS, já se tornara potente essa forma de transmissão (COVAS, 1998).

Desde o primeiro caso de AIDS associado a uma transfusão ocorrida em 1978, até janeiro de 1988, 463 casos de AIDS em hemofílicos haviam sido notificados ao CDC, o que poderia representar somente 25% do total de hemofílicos infectados pelo HIV. Um estudo publicado em 1991 estimou para o ano de 1982, cerca de 1,1% de contaminação das unidades transfundidas. Após o desenvolvimento dos testes sorológicos de triagem ocorreu declínio progressivo das taxas de incidência de HIV pós-transfusional (BUSCH et al, 1991).

A partir da observação do sangue como vetor do agente causador da AIDS, até então desconhecido, bem como de uma maior ocorrência de casos em determinados grupos de risco, foram adotadas medidas que visavam à recusa de doadores de sangue considerados de alto risco pelos serviços hemoterápicos. Dessa forma, desde 1985, quando testes para a detecção de anticorpos anti-HIV já estavam disponíveis, a triagem sorológica de doadores tornou-se obrigatória. Essas medidas mudaram o perfil epidemiológico desse modo de transmissão da AIDS nos Estados Unidos. Em 1993, a publicação de um trabalho avaliando a eficácia dessas medidas, observou, por ano de transfusão, 56 casos em 1978, 714 em 1984 e 288 no ano seguinte, quando os testes sorológicos já eram realizados. De 1986 a 1991, foram registrados em média 20 casos por ano, sendo sugerido em investigação posterior que somente 25% deles estariam associados à transfusão depois de 1985. Até setembro de 1993, 6.311 casos de AIDS pós-transfusional foram notificados, dos quais, apenas 29 deles teriam sido de indivíduos infectados após a implantação de testes sorológicos (SELIK;WARD;BUEHLER, 1993).

O decréscimo dos casos de AIDS associados à transfusão nos EUA demonstrado após 1982 e, igualmente em outros países desenvolvidos, aconteceu a partir do conhecimento desse modo de transmissão, com a realização de uma triagem clínica mais rigorosa dos doadores, e o desenvolvimento de testes sorológicos cada vez mais sensíveis com capacidade de diminuição da janela imunológica, ou seja, da variação do tempo entre a exposição e a soroconversão, quando anticorpos podem ser detectados (PETERSEN; DOLL, 1991).

Em um estudo realizado nos EUA em 4,1 milhões de doações obtidas entre 1992 e 1993 em 19 regiões dos EUA, o risco de se infectar com hemocomponentes transfundidos foi estimado entre 1 em 450.000 e 1 em 660.000 doações por ano. Isso representaria uma estimativa de 18 a 27 doadores infectados avaliados nos centros hemoterápicos dentre os 12 milhões de doadores/ano relacionados naquele país. (LACKRITZ et al., 1995; SCHREIBER et al., 1996). Em outro trabalho, Weber et al. (1999) determinaram o risco de 1/493.000 utilizando-se testes de terceira geração.

O risco residual representa a possibilidade remanescente de uma unidade hemoterápica transmitir doença, mesmo após triagem clínica e sorológica adequadas. Nos EUA, a

introdução da pesquisa do antígeno p24 em 1996 representou redução do risco residual para 1/677.000 unidades demonstrando resultados satisfatórios em estudos de painéis de soroconversão. A partir desses dados, a Food and Drugs Administration (FDA) determinou como rotina, além dos testes de triagem para a detecção de anticorpos anti-HIV, já utilizados, a realização de testes para a detecção da antigenemia p24 em todas as doações de sangue (COVAS, 1998).

No Brasil, os primeiros casos de AIDS foram registrados e diagnosticados em 1982. Até 1985, a maior parte deles (89%) se concentrava nos grandes centros urbanos, e como nos países industrializados, ocorria predominantemente em homossexuais e bissexuais masculinos (74%). Mesmo assim, a transmissão da doença através da transfusão sanguínea também era alta e representava 4,7% dos casos (BRASIL, 1997).

Em 1988, o Ministério da Saúde determinou a realização de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HIV em todas as doações de sangue (BRASIL, 1988). Além disso, outras medidas como a proibição da comercialização do sangue e a recusa de doadores com comportamento de risco também foram adotadas (BRASIL, 1989). Tais providências repercutiram em uma nova diretriz nos bancos de sangue com a diminuição do potencial risco de infecção viral pós-transfusional e uma melhor qualidade dos hemocomponentes disponíveis (FERNANDES, 2001).

Não existem estudos epidemiológicos de grandes proporções para a avaliação do risco transfusional no Brasil. Existem alguns exercícios baseados em modelos matemáticos que ampliam dados limitados restritos a um único local. Sabendo-se que nos EUA a prevalência de doadores de sangue soropositivos para anti-HIV é 15 vezes menor que a encontrada nos Brasil, e admitindo-se que as falhas de diagnóstico da infecção pelo fato do indivíduo se encontrar na "janela imunológica" são iguais nos dois países, estima-se que o risco de contrair uma infecção pelo HIV através de uma unidade hemoterápica testada negativa é de 1/2533 a 1/15000. (HAMERSCHLAK; PASTEMAK; AMATO NETO, 1993). Em um estudo realizado em Marília, São Paulo, com 5.688 pessoas que doaram sangue entre 1994 e 1997, 34 indivíduos apresentaram soroconversão confirmada para pelo menos um dos testes sorológicos, representando um risco de

transmissão de 1 em 10.333 transfusões (CANUTTI JUNIOR, 1998). Em Ribeirão Preto, entre 1996 e 1998, Covas (1998) encontrou o risco de transmissão de 1 em 77.000 unidades. Outro trabalho conduzido entre 1996 e 1998 com doadores de repetição da Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo, publicado em 1999, estimou um risco de transmissão de 1 em 64.000 doações (SABINO et al., 1999).

De qualquer modo, também como nos países industrializados, ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde promoveram uma diminuição dos casos de AIDS associados à transfusão de sangue desde o início da epidemia. Além disso, o surgimento de testes cada vez mais sensíveis tem garantido melhor qualidade ao sangue testado e diminuído o risco residual real ocorrido nos hemocentros. A contaminação por transfusão entre 1999 e 2003 foi praticamente zero, diferentemente de dados registrados na década de 90 de até 1,4% (BRASIL, 2004, Dados, 2004a, FERNANDES, 2001).

#### 1.1.4 Diversidade genotípica do HIV

Existem 2 tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2. O primeiro disseminado por todo o mundo é considerado um dos patógenos que apresentam maior variabilidade genética. Atualmente foi possível identificar 10 subtipos do HIV-1 (A-J) compondo o grupo chamado principal (grupo M). Um outro grupo, constituído na qual se encaixam as cepas ANT70 (a primeira a ser isolada), MVP5180 e HIV-1 vau, foi designado de grupo O (*outliers*). A similaridade entre os vírus ANT70 com os vírus do grupo M, em nível de composição de aminoácidos, é de 70%, 75% e 50%, respectivamente, para as regiões gag, pol e env. Atualmente, um grupo N (linhagem YBF30) foi identificado, em 1998, em um paciente em Camarões (BARIN et al., 1997; CONSIDERAÇÕES...[1998?]; SIMONETTI, 2001).

Os vírus do grupo M são responsáveis pela pandemia da AIDS em todo o mundo, por outro lado, os vírus do grupo O são raramente isolados e somente são encontrados na parte oeste da África equatorial, como por exemplo em Camarões e Gabão (BARIN et al., 1997; SIMONETTI, 2001).

Os subtipos genéticos estão distribuídos de forma heterogênea. Vírus com subtipos B são mais prevalentes na América do Norte, América Latina, Caribe, Europa, Japão e Austrália. Quase todos os subtipos estão presentes na África e particularmente na região do Subsaara, havendo predominância dos subtipos A e D na África Central e Oriental, e o subtipo C no sul da África. O subtipo C também é prevalente na Índia e recentemente foi identificado no Brasil. O subtipo E foi inicialmente encontrado na Tailândia, estando presente também na República da África Central. O subtipo F foi inicialmente descrito no Brasil e Romênia. O subtipo G foi encontrado na Rússia e Gabão e o subtipo H no Zaire e Camarões. Por outro lado, reações cruzadas têm sido observadas entre os subtipos B e D e entre os subtipos A e C, sugerindo que estes variantes genéticos possam ser relatados como um sorotipo único (SIMONETTI, 2001).

Embora os dados relacionados à distribuição dos diferentes subtipos genéticos sejam ainda limitados, pode-se prever importantes consequências imediatas dessa diversidade, como por exemplo, as possíveis diferenças na patogênese e taxa de transmissão nos vários subtipos, a incapacidade de detectar todos os subtipos diferentes utilizando as ferramentas moleculares atuais e as distintas sensibilidades encontradas pelos diferentes ensaios para pesquisa de anticorpo dependente dos subtipos. Além disso, a variação genética observada na região V3 de vírus de subtipo B, em diferentes regiões geográficas tais como América do Norte, Europa, Tailândia, e Brasil (mais prevalente) refletem na reatividade sorológica para o peptídeo V3 e pode identificar estes vírus como pertencentes a sorotipos distintos (BARIN et al., 1997; SIMONETTI, 2001).

Os ensaios de primeira geração apresentavam um grande número de resultados falso positivos para todos os subtipos virais, os de segunda geração tinham especificidade muito superior, porém ainda forneciam falso reativos. Os primeiros ensaios utilizando testes de terceira geração eram extremamente específicos e muito sensíveis na fase inicial da doença, principalmente de infecções causadas por vírus do grupo M; alguns trabalhos relatavam pobre detecção para os subtipos B. A partir de 1995, para ampliar uma maior segurança nos serviços de bancos de sangue, tais problemas foram resolvidos e a identificação do grupo O foi introduzida. De qualquer modo, o desenvolvimento de testes de triagem (*screening*) é sempre baseado no antígeno viral ou na seqüência genética derivada do modelo do vírus ou do anticorpo de captura.

Por conseguinte, a situação quando um indivíduo é infectado por um vírus pode ser genética e antigenicamente distante ao daquele utilizado no desenvolvimento do teste. Atualmente dificuldades no diagnóstico da infecção pelo subtipo N têm sido observadas em diversos ensaios sorológicos (BRUST et al, 2000; BARIN; LAPERCHE; COUROUCE, 2000; CONSIDERAÇÕES..., [19998?]; WEBER et al., 2003).

O uso de testes de última geração utilizando pesquisa combinada de antígeno e anticorpo tem sido empregado e parece não conter problemas para a investigação dos principais subtipos do grupo M, grupo O e também para o HIV-2. Entretanto, segundo Weber et al (2002), a detecção do antígeno nessas provas mostram uma variável sensibilidade para identificação de diferentes subtipos. Alguns podem falhar para a detecção de baixos níveis de antígenos, embora anticorpos monoclonais sejam utilizados para detectar antígeno p24 presente nos vários tipos e subtipos de HIV (FRANSEN; BEELAERT; GROEN, 2001).

De fato, a alta diversidade genética do HIV atribuída ao crescente aumento da infecção em todo mundo, comprova a incansável necessidade de testes cada vez melhores. A melhor sensibilidade desses ensaios depende das propriedades intrínsecas desses vírus e devem ser otimizadas a partir de um amplo número de partículas estudadas (WEBER; DEVARE, 2002; WEBER et al., 2002).

### 1.1.5 Evolução dos testes imunológicos

A transmissão do HIV através da transfusão e o diagnóstico da infecção em hospitais e órgãos de Saúde Pública continuam a ser uma preocupação em todo mundo. A comercialização das técnicas de ELISA (ensaioimunoenzimáticos) para determinação de anti-HIV ocorre desde 1985 e se usa de modo rotineiro em laboratórios e em grandes centros hemoterápicos (MÉTODOS..., 1998).

Os ensaios de primeira geração para o HIV detectavam a presença de anticorpos para a proteína viral. Vírus HIV obtidos por propagação de linhagem de células purificadas, rompidas,

e inativadas são utilizados para sensibilização da fase sólida dos ensaios; anticorpos anti-imunoglobulina humana policlonais conjugados a uma enzima são usados para detecção de anticorpos específicos (BARRETT et al., 1986; LY et al., 2001). A segunda geração de testes utilizava抗ígenos do core (p24) e do envelope (gp41) do HIV preparados por técnicas de DNA recombinante. Estes ensaios apresentavam melhor especificidade, embora a sensibilidade se mantivesse similar aos testes de primeira geração (CROWL et al., 1985; LY et al., 2001). Atualmente, os ensaios de terceira geração detectam simultaneamente ambos os retrovírus (HIV-1 e HIV-2) e usam na fase sólida抗ígenos recombinantes e/ou peptídeos; estes, podem ser conjugados e são utilizados para a detecção enzimática de anticorpos específicos para HIV. Esses testes podem detectar IgM e IgG, resultando na redução da janela imunológica (BRUST et al., 2000).

O ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA), em geral apresenta alta sensibilidade. Pequenas detecções de quantidades de anticorpos conduzem a resultados falso positivos devido à reatividade cruzada. Estudo em populações onde existe baixa prevalência da doença pode conduzir a um valor preditivo positivo baixo na ocorrência de falso positivos. Na prática habitual dos centros, utiliza-se ao menos outra técnica ELISA para reafirmar a positividade; quando o resultado continua positivo, uma técnica de alta especificidade é utilizada, como por exemplo *imunoblot* ou *imunofluorescência* para confirmação (MÉTODOS..., 1998).

Infecção recente compreende o período entre a exposição e a soroconversão. O diagnóstico durante a janela imunológica tem sido feito através de estudo de抗ígenos virais, principalmente o p24. Nas primeiras semanas após a infecção, o抗ígeno p24 está presente no soro, antes da detecção dos anticorpos. Com o aparecimento desses, o抗ígeno torna-se indetectável. Para tanto, foram desenvolvidos testes usando anticorpo anti-p24 (policlonal e monoclonal) na fase sólida como anticorpos de captura e anticorpo específico conjugado com enzima (JANSSEN et al., 1998).

Muitos estudos demonstraram que a detecção de抗ígenos tem resultado no maior encurtamento da janela imunológica (WEBER et al., 1998). Courouce (1999) usando 65 amostras de painéis que incluíam抗ígenos de HIV-2 e HIV-1 para o grupo M e O, constatou a diminuição

da janela imune com o uso de testes para pesquisa somente do antígeno p24. Em estudo elaborado por Fransen et al. (1997), o teste demonstrou uma elevada sensibilidade e especificidade (acima de 99%) em doadores de sangue, contudo trabalhos realizados em populações específicas e utilizando tecnologias diferentes evidenciaram amplas variações percentuais nos resultados (WEBER et al., 1999).

Alguns trabalhos feitos em vários centros hemoterápicos demonstraram resultados comparáveis aos testes de terceira geração; outros revelaram não ter encontrado nenhum doador em estado de soroconversão após a implantação da pesquisa do antígeno p24 (SARKODIE et al., 2001; ALAMAWI et al., 2003). Webert et al. (2003) estimaram um risco de transmissão por transfusão de sangue testado, de um em 4,7 milhões de unidades transplantadas. Durante sete anos, 5,9 milhões de unidades foram testadas e apenas um caso ocorreu. No Brasil, estudos feitos por Wendel et al. (2002) também apresentaram baixo rendimento (sensibilidade e especificidade inferior a 99%) com a utilização da pesquisa do p24 para *screening* em doadores de sangue. Segundo Schreiber et al. (2002), resultados da mesma natureza poderiam ser esperados com a introdução do teste de ácidos nucléicos (NAT) em rotina sorológica.

Fenouillet et al. (1993) especulavam a ocorrência de dois fenômenos distintos: níveis de Agp24 inversamente proporcionais aos níveis de anticorpos e possíveis coexistência do Agp24 e baixos níveis de anticorpo. Atualmente, ambos fenômenos são encontrados. Além disso, muitos vieses podem influenciar os resultados, como população em estudo, momento do teste, comportamento de risco e outros.

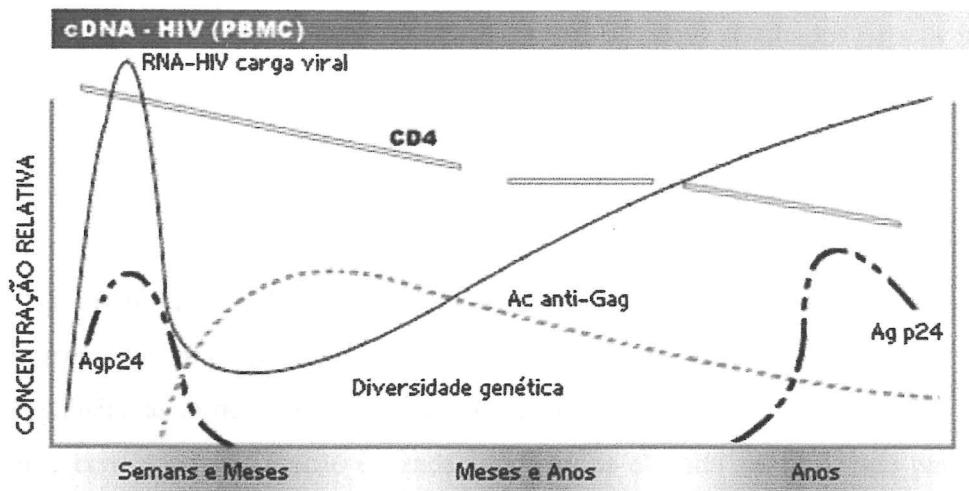
Ensaios utilizando técnicas de biologia molecular têm permitido o surgimento de testes de maior acurácia na determinação de抗ígenos. Reações como a PCR ainda têm seu uso restrito a centros especializados e não são utilizados para triagem em doadores de bancos de sangue. Testes de quarta geração com capacidade de detectar simultaneamente antígeno e anticorpo representam uma alternativa e podem ser empregados em rotina sorológica para melhorar a sensibilidade na detecção do HIV (BRUST et al., 2000).

### 1.1.6 Uso de testes combinados antígeno/anticorpo

Informação obtida através da identificação de indivíduos com infecção recente é importante para estimar a incidência de HIV, para estudos da patogênese, e o melhor entendimento da história natural da infecção. Além disso, populações de alto risco, quando precocemente diagnosticadas, podem se favorecer com programas de intervenção, mudanças no comportamento e vacinas (CONSTANTINE et al., 2003).

O monitoramento sorológico da epidemia do HIV tem sido geralmente limitado a soroprevalência, compreendendo infecções agudas e crônicas. A estimativa da incidência seria uma importante ferramenta na determinação da taxa de soroconversão e também do risco residual. No entanto, trabalhos dessa natureza, são normalmente realizados em estudos de coortes, estudo longitudinal em pessoas de risco que realizam repetidos testes para HIV, e outras pesquisas em soros. Estes trabalhos utilizam metodologias complexas, requerem um acompanhamento do paciente e podem levar apenas a resultados parciais (JANSSEN et al., 1998).

Desde a introdução em 1985, o desempenho dos ensaios de triagem (*screening*) para o HIV tem sido objeto de constante estudo na comunidade científica. A dinâmica da produção de anticorpos depende de uma série de fatores, tais como a via de infecção, a quantidade do inóculo, o tipo de vírus considerado e a resposta imunológica do hospedeiro. Anticorpos podem ser detectáveis em uma a duas semanas após a infecção. Entretanto, esse não é o caso para a maior parte das circunstâncias. De uma maneira geral, são detectáveis entre 30 a 90 dias após o evento que levou ao contágio, em aproximadamente 95% dos indivíduos (GRANATO, 2001). Segundo, Weber et al. (1998) e Ly, Laperche e Courouce (2001) durante a janela imunológica, representada pela presença de HIV no sangue do paciente e a soroconversão, a presença do antígeno p24 pode ser detectada. Janssen et al. (1998) acreditam que o período de duração da antigenemia é muito breve, em torno de 22 dias, e é aproximadamente o limite da situação em que grande número de pessoas são testadas (Figura-1).



Fonte: Simionetti (2001)

**FIGURA-1.** Marcadores biológicos e sorológicos de HIV associados a infecção e doença.

Indiscutivelmente, a detecção do antígeno depende principalmente do momento da realização do teste durante a infecção do HIV. Na fase inicial, altos níveis de replicação viral estão ocorrendo e o antígeno p24 pode ser detectado. Posteriormente, durante a fase latente, somente 10-20% de indivíduos infectados teriam antígeno em quantidade detectável, embora a antigenemia apareça em mais de 70% dos pacientes com AIDS (MARTINEZ et al., 1999). Segundo Weber (2003), testes de quarta geração poderiam ter um potencial risco de uma segunda janela imunológica, na fase de transição entre o declínio do nível de antígeno e o começo da soroconversão. Nesses ensaios, os anticorpos anti-p24 monoclonais ocupam um terço da fase sólida, limitando a capacidade de ligação do anticorpo livre do paciente aos sítios antigênicos.

De fato, os ensaios de testes combinados têm o forte propósito de reduzir a janela imunológica, justifica Yerly, Simon e Perrin (1999) em seu trabalho realizado em 236 amostras de pacientes confirmados por *Western Blot*. Martinez et al. (1999) encontraram uma sensibilidade de 99,5% e especificidade de 94,8% utilizando ensaios de quarta geração. Laperche, Maniez-Montreuil e Courouce (2000) usando 58 painéis comerciais demonstraram melhor sensibilidade com o uso de testes combinados em relação aos testes de terceira geração, mesmo quando o

rendimento em termos de redução de janela imunológica tinha sido moderado. Brust et al. (2000), usando painéis de amostras positivas para se estimar a sensibilidade e amostras negativas de doadores de sangue para calcular a especificidade, mostraram bons resultados para os ensaios de quarta geração. Schreiber et al. (1996) também encontraram resultados positivos em uma pesquisa feita em 586.507 doadores em 5 centros hemoterápicos entre o ano de 1991 e 1993.

No entanto, outros pesquisadores não encontraram resultados favoráveis aos testes combinados. Mukadi et al. (2002) observaram uma maior sensibilidade em testes que pesquisavam somente anticorpo ou antígeno. Em um estudo feito por Weber et al. (2002) utilizando 16 painéis de soroconversão, 15 culturas de células infectadas com diferentes subtipos e 257 amostras com potencial reação cruzada verificou-se elevada sensibilidade para os testes combinados, mas especificidade equivalente aos testes de terceira geração. Delforge et al. (2002) verificaram uma maior sensibilidade para os testes de terceira geração em um paciente com altos títulos de抗ígenos quantificados por técnicas moleculares.

Embora o novo ensaio represente um maior progresso em comparação com os testes anteriores, eles podem conduzir a um potencial risco de reatividade não específica, inclusive superior aos testes de terceira geração (WEBER et al., 1998). Hayashi et al. (1999) em seu estudo, usando painéis e amostras de mulheres grávidas e pacientes com hepatite, somaram 30 casos de reações falso positivas. Weber et al. (1998, 1999) encontraram 08 casos de falsas reações em indivíduos acometidos por herpes e mononucleose infecciosa. Reatividade cruzada foi também demonstrada em amostras de pessoas infectadas com hepatite C.

Em bancos de sangue, altas taxas de testes falso positivos podem ser esperadas, haja vista a possibilidade de uma menor especificidade, em consequência da baixa prevalência na população de doadores (PARK; KIM, M; KIM, H, 2001). Segundo Weber et al. (2002) a taxa estimada foi de 0,3 a 0,8% versus 0,2% para outros ensaios. Em estudos feitos por Meier et al. (2001), amostras positivas em triagem de doadores não tiveram seus resultados reproduzidos em nova amostra, representando percentual de 0,28% de testes falso positivos. Djossou et al. (1999) determinando o custo-benefício do emprego do teste combinado em um centro de hematologia na França, não justificaram a sua utilização após a verificação do incremento de falsos resultados.

Entretanto, segundo Park, Kim, M. e Kim, H. (2001) a prevalência de resultados falso positivos e falso negativos parece ser comparável aos testes de terceira geração na população de doadores.

É importante analisar o custo de prevenir a ocorrência de resultados falsos negativos. A análise deve considerar os efeitos adversos gerados pelos resultados falsos positivos. Os inúmeros resultados apresentados sugerem a inovação tecnológica das técnicas imunológicas para triagem em bancos de sangue (PILCHER; WOHL; HICKS, 2002).

#### 1.1.7 Testes laboratoriais, sinais e sintomas clínicos, tempo de retorno do doador - identificação de infecção primária.

A associação de sinais e sintomas clínicos à presença de infecção primária de HIV sugere, em algum momento, a presença de características clínicas específicas no período inicial da doença. No entanto, o diagnóstico definitivo deve ser pautado em testes de laboratório (MÉTODOS..., 1998).

Após exposição ao HIV, cerca de metade dos pacientes desenvolvem nas primeiras semanas de infecção um quadro pseudo-gripal, que coincide com o aparecimento do primeiro marcador sorológico detectável, o antígeno p24. Algumas semanas depois aparecem os anticorpos reativos contra o HIV e que se podem detectar pelas técnicas atuais de rotina (MÉTODOS..., 1998; HECHT et al., 2002).

Segundo Quinn (1997), embora alguns pacientes com infecção aguda de HIV sejam assintomáticos, a maioria desenvolve sinais febris lembrando quadro de mononucleose. Em estudos realizados em pacientes de alto risco, usuários de drogas injetáveis, homossexuais e heterossexuais com múltiplos parceiros foram identificados muitos sintomas e sinais relacionados com o período de soroconversão como febre, fadiga, mialgia, artralgia, adenopatia, faringite, diarréia, dor de cabeça, “rash”, náuseas, vômitos, perda de peso, ulcerações mucocutâneas. De qualquer modo, os sinais e sintomas clínicos não são específicos, mas podem ser importantes

evidências em população de alto risco capazes de elucidar a evolução da infecção, o desempenho dos ensaios laboratoriais e a influência do comportamento do indivíduo.

Estudos desenvolvidos em todo o mundo procuram elucidar a freqüência de sinais e sintomas que podem servir como diferencial de outras doenças. Em um trabalho realizado por Bollinger et al. (1997) para triagem de HIV em pacientes com doenças sexualmente transmissíveis, incluindo indivíduos profissionais do sexo com contato sexual desprotegido, demonstrou-se a presença de febre, sudorese noturna, artralgia, linfadenopatia, diarréia, faringite, rash, aftas e parastesia. Dentre os indivíduos com antigenemia para p24, 81% apresentavam um ou mais desses sintomas e sinais. Lavreys et al. (2000) encontraram em um estudo feito na África sintomas como vômito, diarréia, artralgia, mialgia, “rash” e adenopatia. Em uma pesquisa realizada por Hecht et al. (2002) com 258 pessoas com infecção primária por HIV os sintomas mais significativos, dentre outros, foram à febre e o “rash”. Em bancos de sangue, há uma grande dificuldade de identificar pessoas com provável infecção primária quando avaliamos apenas o comportamento de risco, devido à baixa prevalência de infecção nessa população. Embora uma menor freqüência de sinais e sintomas possam ser esperados, casos confirmados de infecção recente têm sido diagnosticados sorologicamente após presença de sintomatologia evidente associada à infecção aguda do HIV (FIEBIG et al., 2003). Por outro lado, Schreiber et al. (2002) acreditam que há um baixo rendimento do teste devido à demora de retorno do doador, seja pela recente prática do comportamento de risco, seja pela presença de sinais e sintomas associados à infecção primária que poderiam retardar a volta do indivíduo ao banco de sangue.

Trabalho realizado por Fiebig et al. (2003), em doadores de plasma, demonstraram uma seqüência emergente de marcadores reativos na classificação da infecção primária de HIV em diferentes estágios permitindo o diagnóstico de infecção recente e a estratificação de pacientes associados à clínica. No estudo foi observado pico de carga viral durante a soroconversão, quando ocorria apenas a presença do antígeno. Posteriormente, ocorreu declínio progressivo da antigenemia e níveis detectáveis de anticorpo até completa marcação das bandas em teste de *Western Blot*. Durante o pico foi encontrado antigenemia para p24, que desapareceu subseqüentemente com a formação de complexos imunes. Sintomatologia característica acompanhou as diferentes fases dessa evolução.

Djossou et al. (1999) e Aubuchon, Birkmayer e Busch (1997) acreditam que o implemento do teste para pesquisa do antígeno p24 pode gerar um alto custo, inviabilizando sua implantação em rotina dos centros hemoterápicos. Korelitz, Busch e Williams (1996) estimaram um aumento de 5,7% no total de candidatos à doação de sangue devido a facilidade de se obter resultados de HIV em ensaios de maior acurácia. Contudo, segundo eles, uma provável redução da janela imunológica (27%) superaria este potencial efeito.

Pilcher, Wohl e Hicks (2002) acreditam na ocorrência de sintomatologia evidente, embora não se pudesse afirmar com certeza a presença de infecção primária, haja visto o grande número de patologias também apresentarem sinais e sintomas clínicos semelhantes. Em seu trabalho, o teste de quarta geração apresentou sensibilidade de 88%, valor dependente do ensaio empregado e do intervalo entre a sintomatologia inicial e o retorno do indivíduo para realização da prova. Weber, Meier e Enders (2002) confirmaram a existência do início dos sintomas dois dias antes da positividade dos testes para a pesquisa de antígeno e onze dias mais cedo que os testes de terceira geração. Contudo, algum tempo depois, o antígeno não pôde mais ser detectado. Testes elaborados por Hecht et al. (2002) também demonstraram positividade antigênica depois do início dos sintomas, mas não foram mais detectáveis três semanas depois. De fato, parece que os sintomas sempre estiveram presentes durante a infecção do HIV, mas não a antigenemia.

Outra ferramenta importante relacionada ao diagnóstico precoce da doença, é o tempo de retorno do doador. Petersen et al. (1994) utilizando dados obtidos de investigação tipo "lookback" (olhar para trás) estimaram o número de transmissões de HIV-1 que ocorreram a partir de doadores que doaram no período de janela imune. Identificando-se os pacientes que receberam hemocomponentes de doadores que posteriormente soroconverteram, eles determinaram a taxa de infecção nesses receptores que receberam produtos em soroconversão. Em 179 doadores, cujo intervalo entre a doação soropositiva e a doação anterior negativa foi inferior a 180 dias, 36 (20%) foram positivos. A taxa de infecção no receptor correlacionou-se com o intervalo de tempo entre as doações soronegativas e soropositivas (< 90 dias = 76%; de 91 a 180 dias = 28%; > 180 dias = 11%). Quando este intervalo era superior a 540 dias apenas 02 (1,1%) eram reagentes para o HIV. Ownby et al. (1999), em estudos realizados em cinco centros

hemoterápicos de várias áreas dos Estados Unidos, analisando dados epidemiológicos da população e o tempo de retorno do indivíduo para realizar nova doação, demonstraram a influência da conduta do doador nos resultados dos testes sorológicos.

No período inicial da doença, identificar pessoas em potencial risco de se encontrarem em fase de soroconversão, favorece a prevenção da transmissão do HIV no momento que altos títulos do vírus estão presentes. A presença de sinais e sintomas presuntivos de infecção aguda, juntamente com a utilização de testes que pesquisam antígeno p24, são importantes ferramentas no diagnóstico de infecção recente de HIV (BOLLINGER et al., 1997).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o emprego do teste combinado antígeno/anticorpo na identificação de infecção recente de HIV-I/II em doadores do HEMOCE.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características epidemiológicas da população de doadores.
- Determinar a prevalência de HIV na população em estudo.
- Estimar os parâmetros de sensibilidade diagnóstica, especificidade diagnóstica, valores preditivo negativo e positivo, para os testes imunoenzimáticos.
- Comparar os métodos convencionais de triagem (ELISA) e o teste combinado HIV VIDAS DUO utilizando coeficiente Kappa e razão de verossimilhança.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

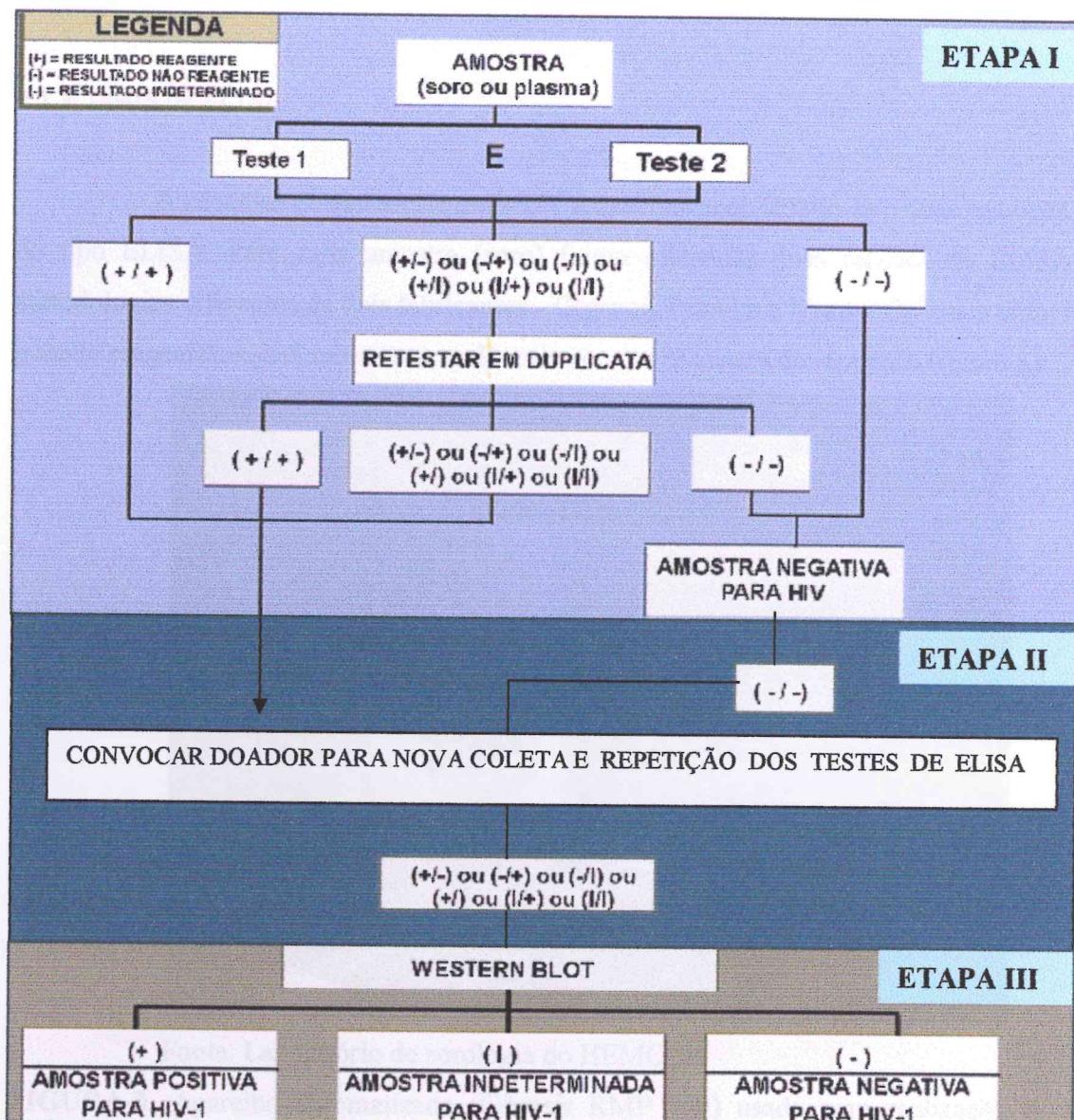
O estudo foi desenvolvido no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2003. A instituição pertence à Secretaria de Saúde do Estado.

A inclusão de indivíduos na população de doadores depende de aprovação clínica e sorológica (Anexo A). Inicialmente, é realizada uma entrevista ao candidato à doação através de um questionário epidemiológico (Anexo B). Se aprovado clinicamente, a doação de sangue é realizada devendo uma amostra de sangue ser investigada em rotina sorológica.

A rotina estabelecida em bancos de sangue exige a realização de provas imunológicas (VDRL, HBsAg, anti-HBc, anti-HCV, anti-HTLV, anti-HIV e anti-T.cruzi) em amostra de soro obtido do sangue centrifugado do doador. A pesquisa do anti-HIV é realizada através de dois testes imunoenzimáticos do tipo ELISA com princípios metodológicos distintos (Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon e ICE HIV-1.0.2/Murex).

Neste trabalho, incluímos algumas modificações ao fluxograma (Portaria nº 488, de 17 jun. 1998) utilizado no HEMOCE (Figura 2). Um novo teste que detectava simultaneamente antígeno p24 e IgG (imunoglobulina G) anti-HIV-1 e anti-HIV-2 por tecnologia automatizada, foi introduzido na rotina sorológica e realizado em 998 indivíduos. Amostras cujos resultados foram positivos/indeterminados, sejam nos testes convencionais ou no teste em estudo (VIDAS HIV DUO/BioMérieux), foram submetidos a provas de *Western Blot* (HIV Blot 2.2/Murex). Os doadores eram então solicitados para nova coleta de sangue e novas provas de ELISA realizadas. Quando necessário, testes de *Western Blot* foram novamente utilizados para confirmação dos resultados.

Para análise dos ensaios foram considerados os parâmetros sorológicos: sensibilidade e especificidade diagnóstica, valores preditivo positivo e negativo, razão de verossimilhança e o índice de coeficiente Kappa calculado pelo programa estatístico “stata versão 7”.



Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 488, de 17 jun. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/seach.php>> acesso em: 03 jul. 2004.

**FIGURA-2.** Fluxograma utilizado no HEMOCE para detecção de anticorpos anti-HIV.

### 3.1 Realização dos Exames

#### 3.1.1 Testes de ELISA

A pesquisa de anticorpos anti-HIV foi realizada aplicando-se o teste imunoenzimático do tipo ELISA. Para cada amostra (soro) foram efetuadas duas reações de ELISA usando metodologias diferentes de dois fabricantes - Organon Teknika e Murex. Os testes eram repetidos quando reagentes, sejam nas amostras de rotina ou nas amostras de repetição (figura 3).



Fonte: Laboratório de sorologia do HEMOCE

**FIGURA-3.** Aparelho automatizado (Gênesis RMP 150) usado para realização do teste de ELISA.

#### a) Teste de ELISA - (fabricante: organon - Vironostika HIV Uni-form II plus O)

O teste se baseia no princípio do "sanduíche" em uma etapa (figura 4) e é realizado por equipamento automatizado. As cavidades são sensibilizadas com uma mistura de抗ígenos de HIV:p24 de HIV-1, gp 160 de HIV-1, peptídeo ANT70 de HIV-1 e peptídeo de env de HIV-2. Cada cavidade microelisa contém uma esfera da mesma mistura de抗ígenos de HIV, marcado

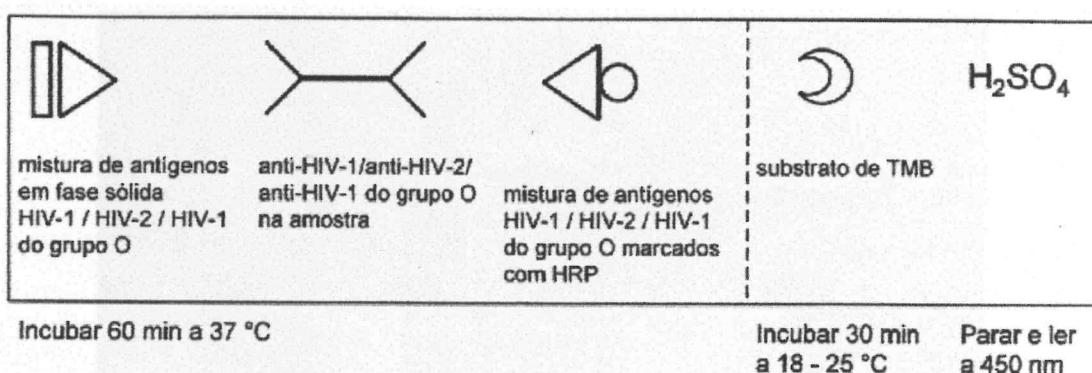
com HRP (horseradish peroxidase). Na presença de anticorpos contra o HIV forma-se um complexo de antígeno em fase sólida/anti-HIV/antígeno marcado com a enzima. Depois de um procedimento de lavagem e incubação (Figura 6) com o substrato de TMB (tetrametilbenzidina) e o peróxido de uréia, desenvolve uma cor que se torna amarela quando a reação é interrompida com ácido sulfúrico. A presença de anticorpos contra o HIV-1, HIV-2 e/ou HIV-1 do grupo O se traduz pela formação de uma cor "intensa", enquanto o desenvolvimento de pouca ou nenhuma cor sugere ausência de anticorpos específicos. Posteriormente após o ajuste da leitora de ELISA, é realizada a leitura da absorbância da solução em cada cavidade a 450 nm. O resultado quantitativo é comparado ao limiar de reatividade (Cut off) gerado a partir da leitura dos controles do teste (VIRONOSTIKA, 1996).

#### Leitura:

Teste negativo: absorbância da amostra inferior a 20% do valor cut off.

Teste positivo: absorbância da amostra superior a 20% do valor cut off

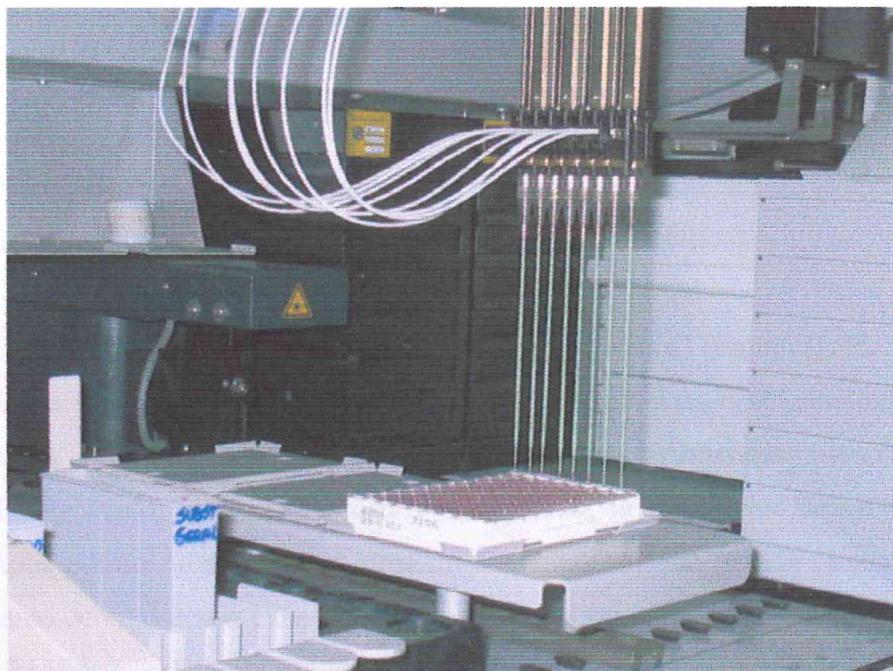
Teste indeterminado: absorbância da amostra variando entre +/- 20% do valor do cut off.



**FIGURA-4.** Princípio do teste de ELISA. Esquema do método de sanduíche em uma etapa.

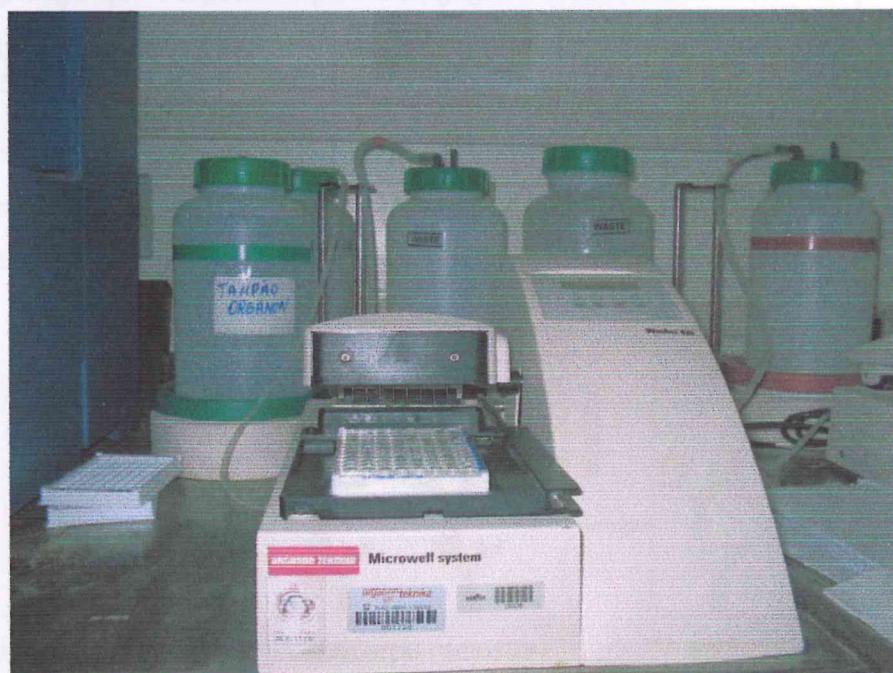
Reação: Ag-HRP + peróxido  $\rightarrow$  Ag-HRP + O<sub>2</sub>





Fonte: Laboratório de sorologia do HEMOCE.

**FIGURA-5.** Automação do teste de ELISA para pesquisa de anti-HIV.



Fonte: Laboratório de sorologia do HEMOCE.

**FIGURA-6.** Lavadora automatizada de placas de ELISA.

b) Teste de ELISA - (fabricante: Murex - ICE HIV-1.0.2)

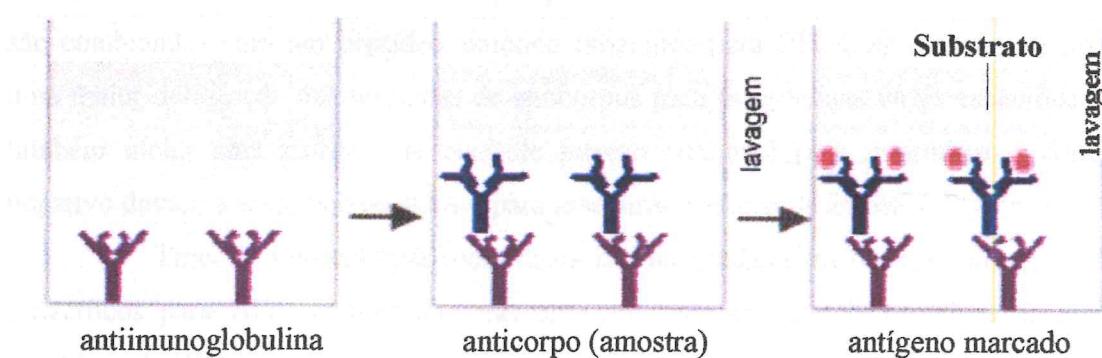
O ensaio é baseado em proteínas recombinantes que contem antígeno de core e do envelope isolado do HIV-1, determinantes antigênicos dominante do HIV-1 do grupo O e imunodominante do HIV-2 preparado por técnica de peptídeos sintéticos.

O teste se baseia no princípio de ELISA por "captura" (figura 7). Placas recobertas com uma mistura de imunoglobulinas monoclonais específicas para IgM (imunoglobulina M) e IgG humanas são incubadas com amostra (soro) do paciente. Anticorpos presentes são então capturados. O conjugado, antígenos marcados com enzima, deverá se unir somente ao anticorpo capturado. Após adição do substrato e posteriormente solução de parada (ácido sulfúrico), o desenvolvimento de cor intensa é mostrado se a amostra é positiva. Posteriormente após o ajuste da leitora de ELISA, é realizada a leitura da absorbância da solução em cada cavidade a 450 nm. O resultado quantitativo é comparado ao limiar de reatividade (Cut off) gerado a partir da leitura dos controles do teste. A sensibilidade do ensaio é diretamente relacionada à proporção de anticorpos IgM/IgG que é específico para o conjugado. A máxima sensibilidade para detecção de anti-HIV em soroconversão é adquirida por ensaio que responde a ambos IgM e IgG (ABBOTT, 2000).

Leituras: Teste negativo: absorbância da amostra inferior a 20% do valor cut off.

Teste positivo: absorbância da amostra superior a 20% do valor cut off

Teste indeterminado: absorbância da amostra entre +/- 20% do valor do cut off.



**FIGURA-7.** Princípio do teste de ELISA. Esquema do método de captura.

Reação:  $\text{Ag-HRP} + \text{peróxido} \rightarrow \text{Ag-HRP} + \text{O}_2$





Fonte: Laboratório de sorologia do HEMOCE.

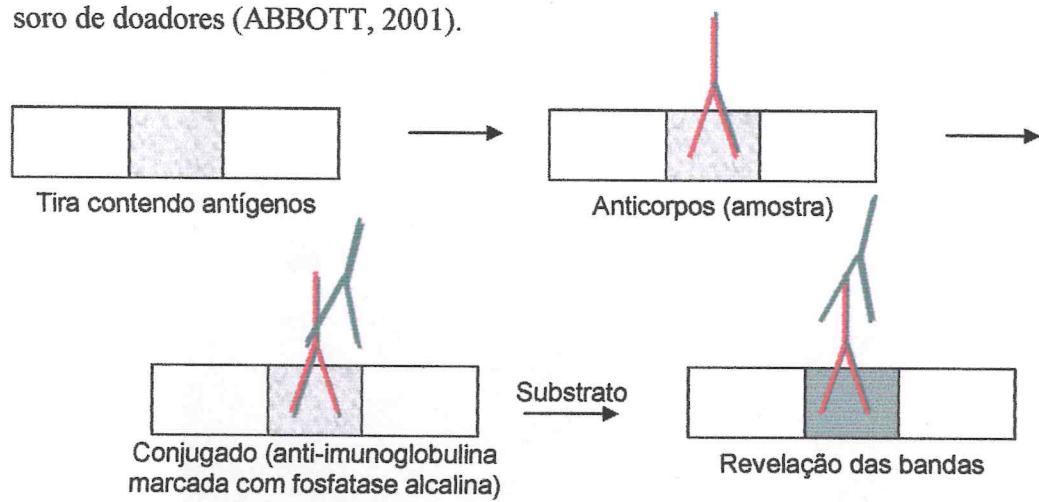
**FIGURA-8.** Lavadora e leitora automatizada utilizada para realização de testes de ELISA.

### 3.1.2 Teste complementar para pesquisa de anti-HIV - *Western Blot* (fabricante: Abbott murex - HIV Blot 2.2)

O HIV Blot 2.2 é usado como teste suplementar mais específico em amostra de soro repetidamente reativos usando o ensaio de ELISA. Os抗ígenos virais específicos para o HIV-1 incorporados separadamente nas tiras por procedimentos eletroforéticos e de eletrotransferência são combinados com um peptídeo sintético específico para HIV-2 na mesma tira para permitir uma maior delineação das respostas de anticorpos para as proteínas virais específicas. Cada tira também inclui uma amostra de controle interno adicional para minimizar o risco de falso negativo devido a erros operacionais e para assegurar a adição da amostra.

Tiras de nitrocelulose individuais são incubadas com soros e controles. Anticorpos específicos para HIV, se presentes nas amostras, vão se ligar às proteínas de HIV-1 e aos peptídeos de HIV-2 nas tiras. As tiras são lavadas para remover materiais não ligados. Anticorpos que se ligam especificamente às proteínas podem ser visualizados usando uma série de reações com anti-IgG humana (de cabra) conjugado com fosfatase alcalina e o substrato BCIP/NBT (5bromo-4cloro-3indolfosfato/tetrazólio nitroazul). O BCIP é desfosforilado pela enzima e

oxidado enquanto o NBT se reduz, dando origem a um produto de cor roxa. Este método (Figura 9) tem a sensibilidade para detectar quantidades pequenas de anticorpos específicos para HIV em soro de doadores (ABBOTT, 2001).



**FIGURA-9.** Princípio do teste de *Western Blot*.



Fonte: Laboratório de sorologia do HEMOCE.

**FIGURA-10.** Aparelho semi-automático (ProfiBlot II N V.2.08) utilizado para realização do teste de *Western Blot*.

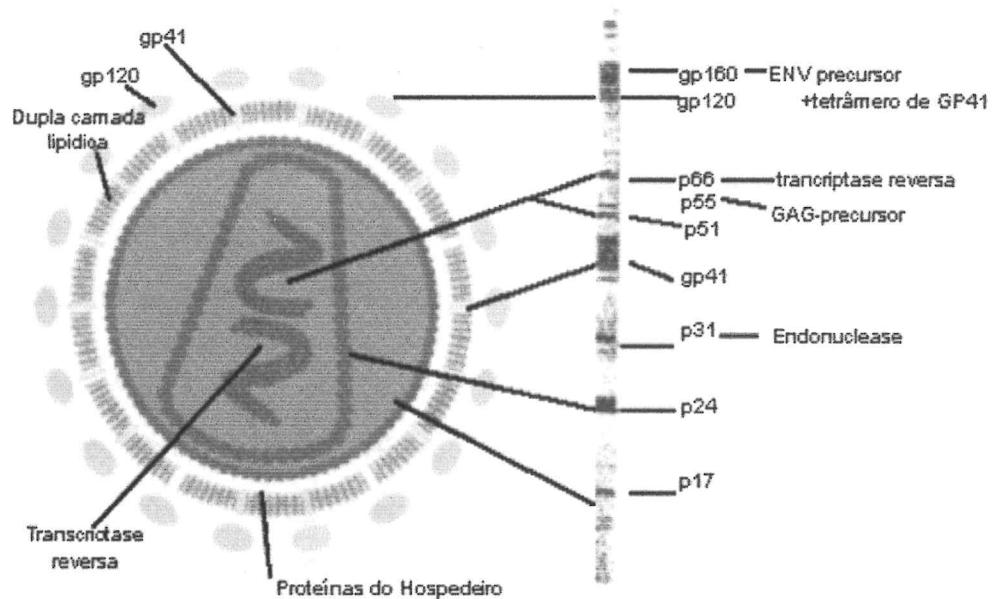


Fonte: Laboratório de sorologia do HEMOCE.

**FIGURA-11.** Bandeja de utilização no aparelho usado para realização de *Western Blot*.

**TABELA-1.** Distribuição das proteínas presente na tira de nitrocelulose do teste de *Western Blot*, segundo peso molecular, gene, antígeno e descrição.

Peso Molecular	Gene	Antígeno	Descrição
gp160	ENV	Forma polimérica da gp41	Glicoproteína extensa difusa
gp120	ENV	Membrana externa	Glicoproteína difusa
p66	POL	Transcriptase reversa	Banda discreta
p55	GAG	Proteína precursora	Banda discreta
p51	POL	Transcriptase reversa	Banda discreta
p39	GAG	Fragmento do p55	Banda discreta
gp41	ENV	Transmembrana	Glicoproteína difusa
p31	POL	Endonuclease	Em par
p24	GAG	Proteína core	Banda extensa
p17	GAG	Proteína core	Banda extensa



**FIGURA-12.** Padrão de reação com proteínas e glicoproteínas estruturais.

**TABELA 2.** Proteínas presentes na tira de nitrocelulose segundo critérios de reatividade.

Padrão	Interpretação
Nenhuma banda viral específica presente	NEGATIVO
Detecção de anticorpos somente para p17	NEGATIVO
Detecção de duas bandas ENV (gp160/gp41 e gp120) e uma GAG (p17, p24, p55) ou pol (p31, p51, p66)	POSITIVO PARA HIV-1
Detecção de duas bandas ENV (gp160/gp41 e gp120) e uma GAG (p17, p24, p55) ou pol (p31, p51, p66) e a banda específica para HIV-2 é visível.	POSITIVO PARA HIV-1 E INDICADO PARA HIV-2
Qualquer banda viral específica presente mas o padrão não corresponde ao critério de positivo.	INDETERMINADO
Qualquer banda viral específica presente mas o padrão não corresponde ao critério de positivo mas a banda específica para HIV-2 é visível.	INDETERMINADO E INDICADO PARA HIV-2

Importante : *Western Blot* interpretado de acordo com o Centro Nacional de Transfusão Sangüínea (CNTS) e critérios previstos.

### 3.1.3 Teste combinado - Antígeno/Anticorpo - HIV VIDAS DUO (Fabricante: Biomérieux)

O princípio do teste associa duas reações imunoenzimáticas com uma detecção final em fluorescência (ELFA) (figura 16). O cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem. Os outros reagentes estão prontos a serem usados e pré-repartidos na barrete/tira. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente.

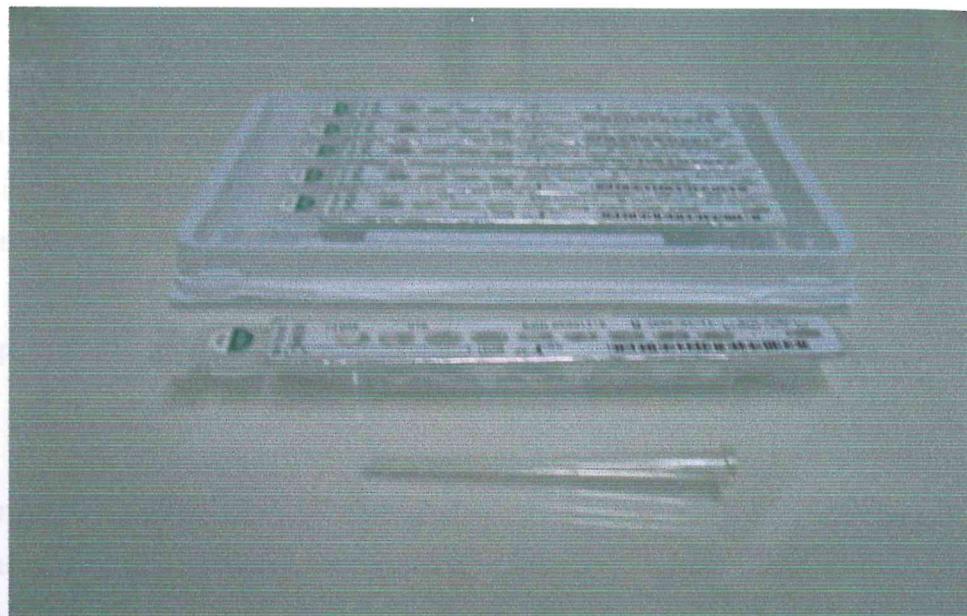
O cone é sensibilizado com três peptídeos de síntese (1 peptídeo ENV HIV-1, gp41 + 1 peptídeo ENV HIV-2, gp36 + 1 peptídeo específico HIV-1 grupo O) e três anticorpos monoclonais anti-p24. Os peptídeos permitem a captura do IgG anti-HIV-1 ou anti-HIV-2 e os anticorpos monoclonais anti-p24.

A tira ou barrete é de polipropileno sendo composta por 10 poços cobertos por uma folha de alumínio selada e etiquetada. A impressão tem um código de barras correspondente ao tipo de teste realizado. O primeiro poço apresenta uma parte perfurada para facilitar a introdução da amostra. O último poço é uma cubeta que permite a leitura em fluorimetria. Os oito poços intermediários contêm os diferentes reagentes necessários à análise.



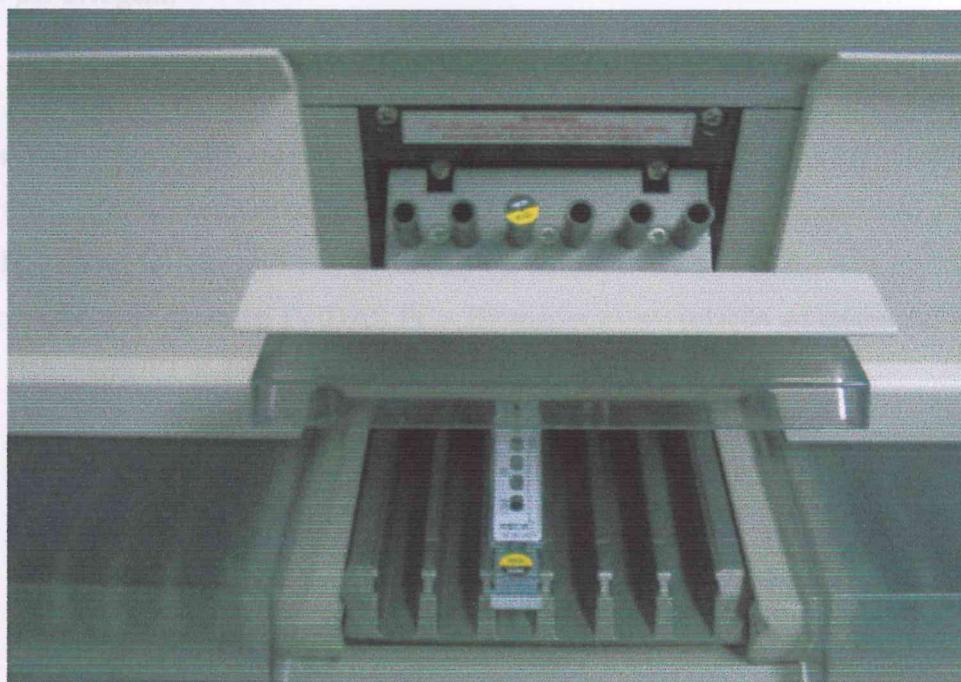
Fonte: Laboratório Clementino Fraga.

**FIGURA-13.** Aparelho automatizado utilizado para realização do teste combinado Ag/Ac HIV VIDAS DUO.



Fonte: Laboratório Clementino Fraga.

**FIGURA-14.** Tira e cone – componentes do ensaio do teste combinado HIV DUO.



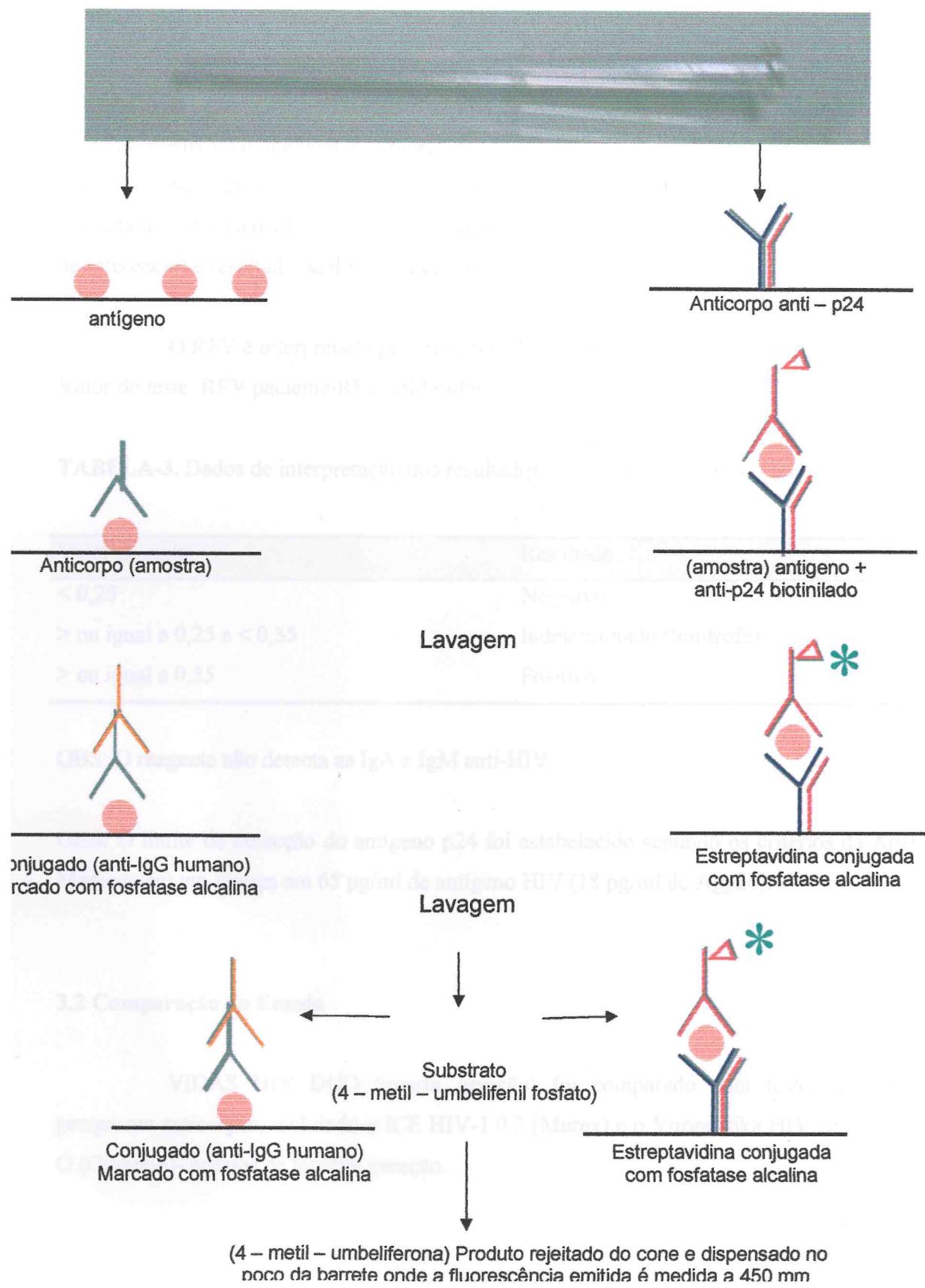
Fonte: Laboratório Clementino Fraga.

**FIGURA-15.** Tira e cone no aparelho VIDAS PC.

Na reação 1 há a detecção das imunoglobulinas G anti-HIV-1 (incluindo as do subtipo O) e anti-HIV-2. Após uma etapa de diluição, a amostra é aspirada e rejeitada várias vezes na parte inferior do cone. Esta operação permite que as IgG anti-HIV da amostra se liguem aos peptídios de síntese gp41 e/ou subtipo O e/ou gp36 fixados no cone. Os componentes não ligados são eliminados por lavagem. O conjugado anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina é então incubado no cone onde se fixa as IgG anti-HIV. As etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado.

Na reação 2 ocorre a detecção do antígeno p24. A amostra é previamente diluída e os anticorpos de coelho anti-p24 biotinilados são aspirados e rejeitados no cone. Durante a incubação, o vírus é lisado e os antígenos p24 libertados vão se ligar, por um lado, aos anticorpos monoclonais anti-p24 de rato fixados na parte superior do cone e, por outro lado, aos anticorpos anti-p24 biotinilados. Os componentes não fixados são eliminados por lavagem. O complexo formado é marcado pela estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina, sendo o excesso eliminado por lavagem.

Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferol fosfato) é aspirado e rejeitado pelo cone; a enzima dos conjugados catalisa este substrato em um produto (4-metil-umbeliferona), cuja fluorescência emitida é medida a 450 nm. Esta é proporcional à presença de IgG anti-HIV e/ou de antígeno p24 presentes na amostra. Os resultados são então calculados automaticamente pelo aparelho (VIDAS PC - Biomérieux) em relação ao calibrador e impressos (figura 1) (BIOMÉRIEUX,1998).



**FIGURA 16.** Princípio do teste combinado HIV VIDAS DUO

## Resultados

Os resultados são analisados automaticamente através do sistema informatizado. O aparelho efetua duas medidas de fluorescência na cuvete de leitura para cada teste. A primeira leitura corresponde ao branco da cubeta antes do substrato estar em contato com o cone. A segunda leitura é efetuada após incubação do substrato no cone. O cálculo do RFV (valor relativo de referência) é resultado da diferença das duas medidas.

O RFV é interpretado pelo sistema VIDAS da seguinte maneira:

Valor do teste: RFV paciente/RFV calibrador

**TABELA-3.** Dados de interpretação dos resultados em função do valor do teste.

Valor do teste	Resultado
< 0,25	Negativo
> ou igual a 0,25 e < 0,35	Indeterminado (limítrofe)
> ou igual a 0,35	Positivo

OBS: O reagente não detecta as IgA e IgM anti-HIV.

OBS: O limite de detecção do antígeno p24 foi estabelecido segundo os critérios da Agence du Médicament em França em 65 pg/ml de antígeno HIV (18 pg/ml de Agp24).

## 3.2 Comparação do Ensaio

VIDAS HIV DUO (quarta geração) foi comparado com testes de rotina que pesquisam anticorpos, incluindo o ICE HIV-1.0.2 (Murex) e o Vironostika HIV Uni-form II plus O (Organon)- ensaios de terceira geração.

### 3.3 Legitimidade

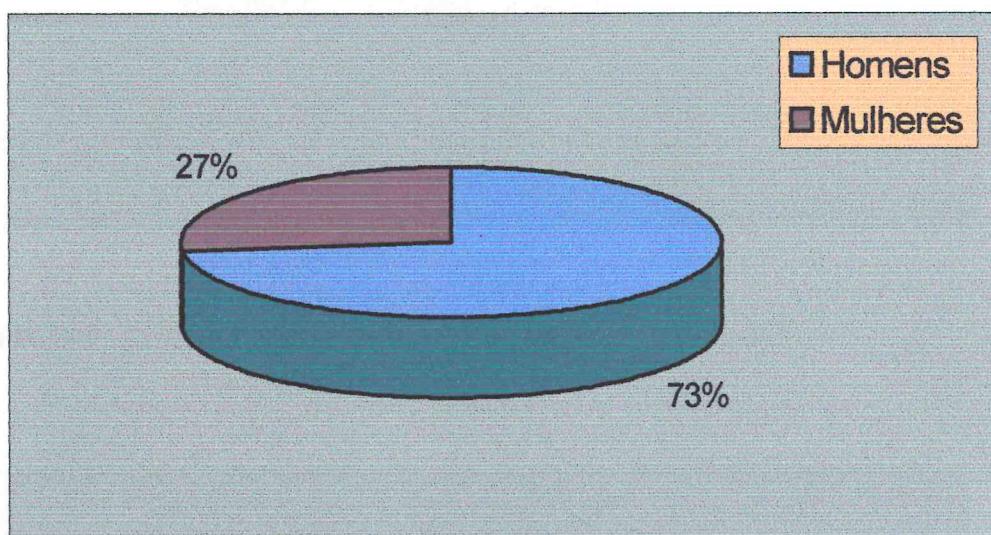
Atualmente, nenhuma prova que determine diretamente o antígeno viral (HIV) foi aprovada pelo FDA como teste definitivo para a doença. O diagnóstico da infecção deste vírus se estabelece quando o ELISA ocorre duplamente positivo e é confirmado mediante um ensaio mais específico, como por exemplo o *Western Blot* (QUESADA et al., 2003).



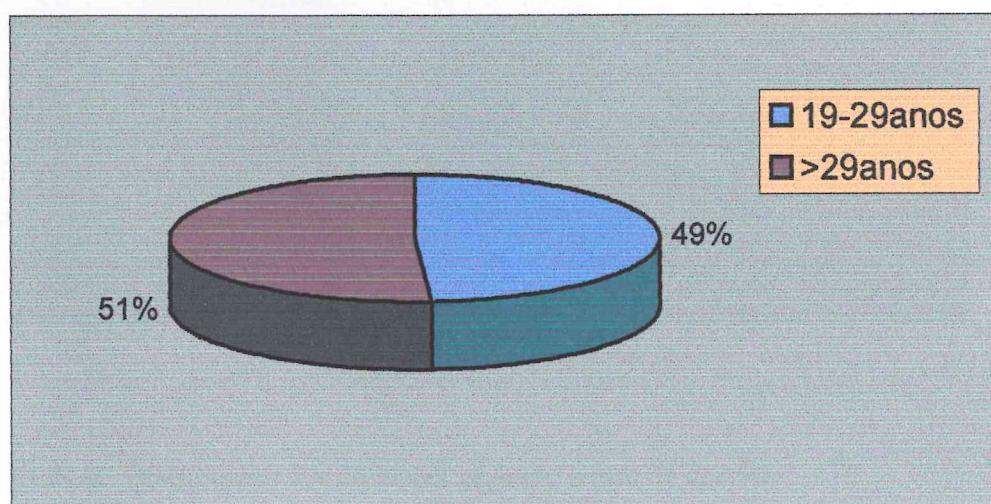
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da população de doadores.

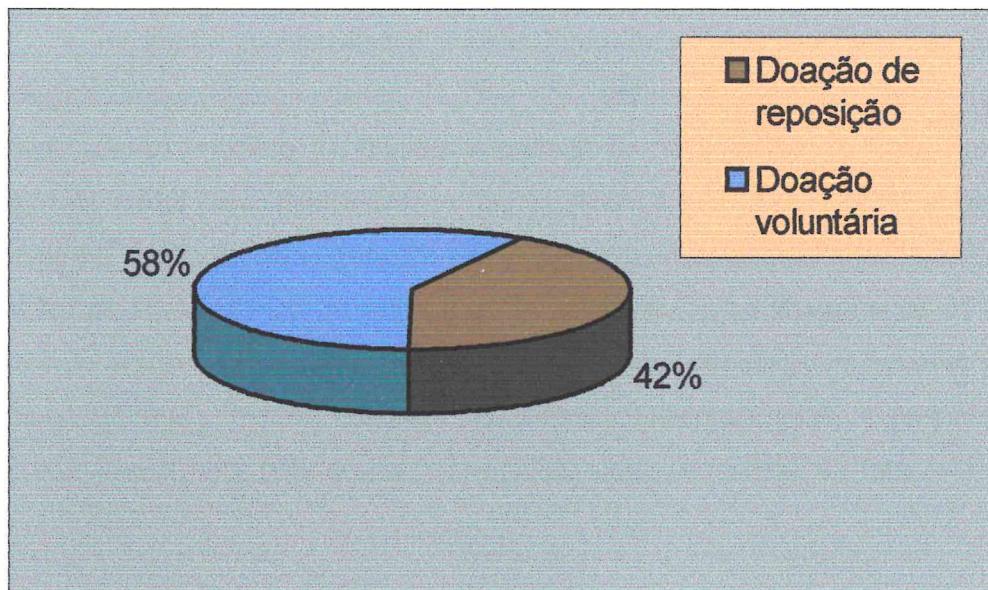
No período de 2001 a 2003, um total de 295.746 candidatos à doação foram avaliados em triagem clínica e/ou sorológica. Em sua maioria, a população de doadores de sangue era constituída por indivíduos do sexo masculino (gráfico 1), com idades acima de 29 anos (gráfico 2) e que realizavam doação como voluntários (gráfico 3), pela primeira vez (gráfico 4).



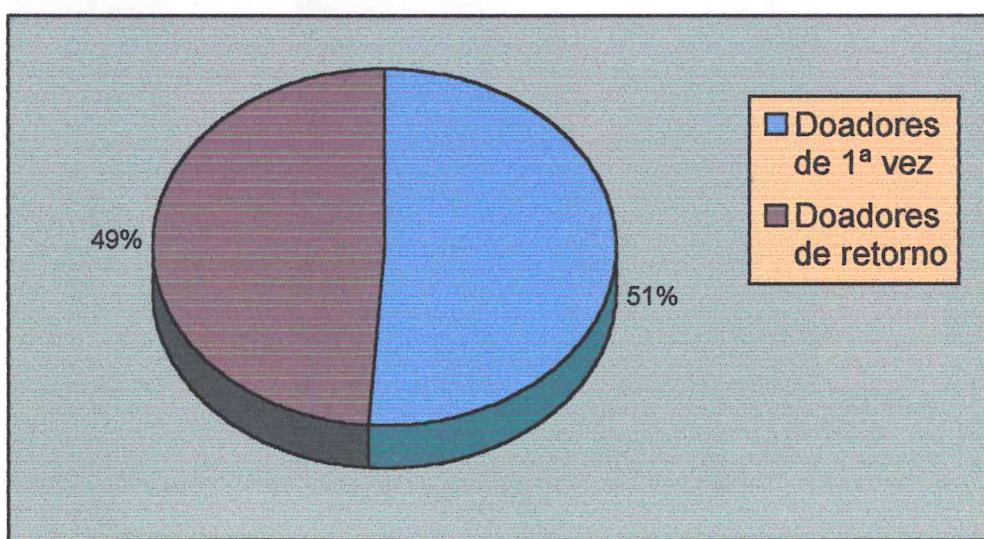
**GRÁFICO-1.** Distribuição dos doadores segundo o sexo.



**GRÁFICO-2.** Distribuição dos doadores segundo a idade.

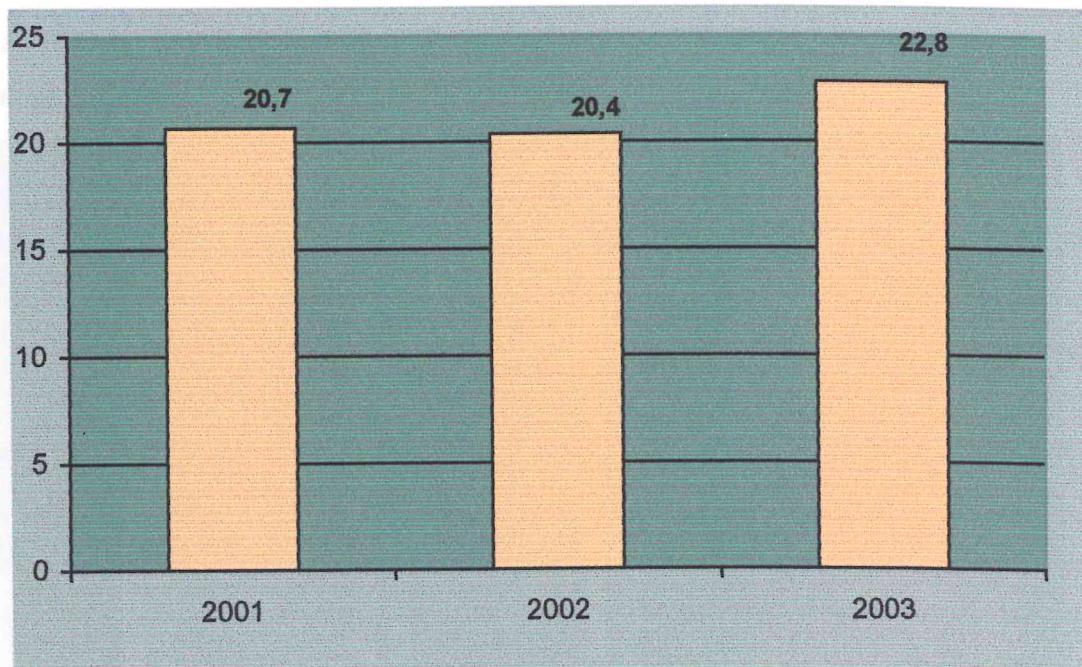


**GRÁFICO-3.** Distribuição dos doadores segundo o tipo de doação.

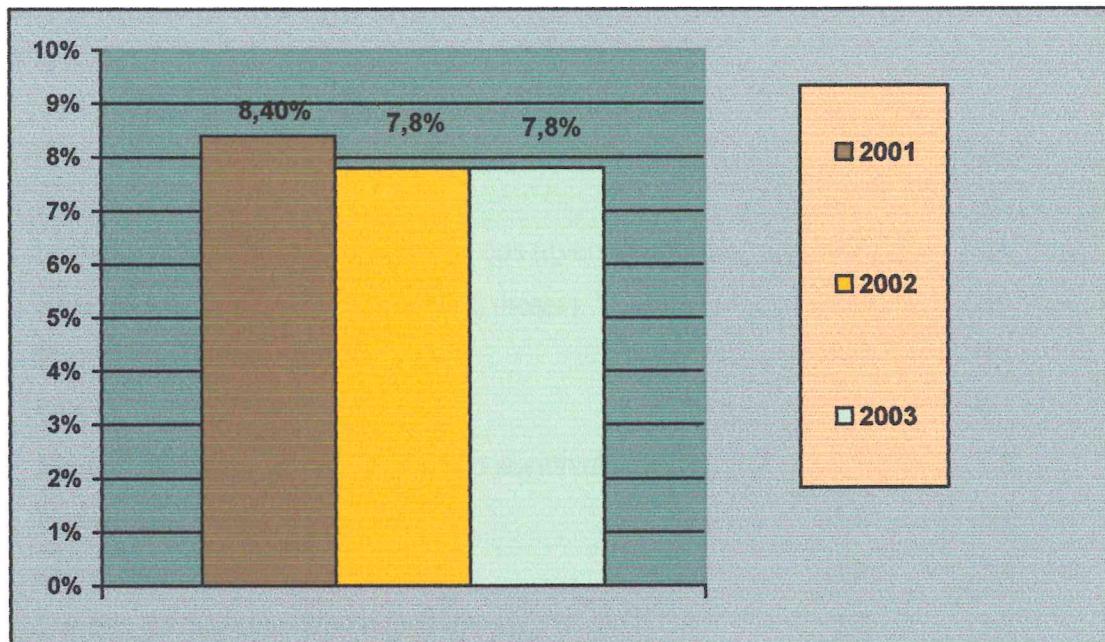


**GRÁFICO-4.** Distribuição dos doadores segundo o tipo de doador.

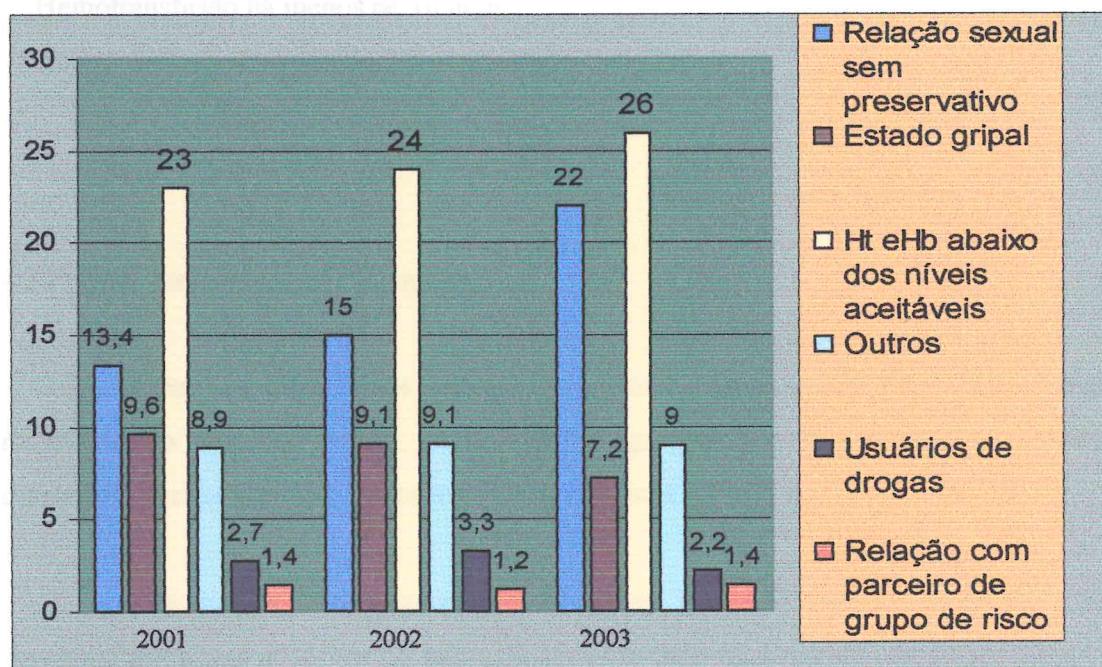
As médias percentuais nos últimos 3 anos de rejeição do doador por inaptidão clínica e sorológica foram, respectivamente, 21,3% e 8% (gráficos 5 e 6). Dentre os fatores que levaram à rejeição clínica (gráficos 7), durante o período de realização do trabalho, observou-se um aumento da média percentual anual no que se refere à prática de relação sexual sem uso de preservativos. Sintomas como gripe foi citado em aproximadamente 9% dos indivíduos. Também foi evidenciada uma elevada prevalência de doadores que apresentavam taxas de hemoglobina e hematócrito abaixo do valor aceitável, mostrando uma população vulnerável à presença de anemia. Além disso, 9% dos doadores não foram enquadrados entre os principais motivos de recusa e/ou investigação referidos na ficha epidemiológica em anexo A (Tabela-4).



**GRÁFICO 5.** Distribuição de taxa (%) de rejeição clínica em doadores do HEMOCE.



**GRÁFICO-6.** Distribuição da freqüência de descarte de unidades hemoterápicos por inaptidão sorológica.



**GRÁFICO-7.** Prevalência dos principais motivos de recusa clínica em doadores de sangue.

**TABELA-4.** Distribuição da freqüência dos principais motivos de recusa clínica em doadores de sangue.

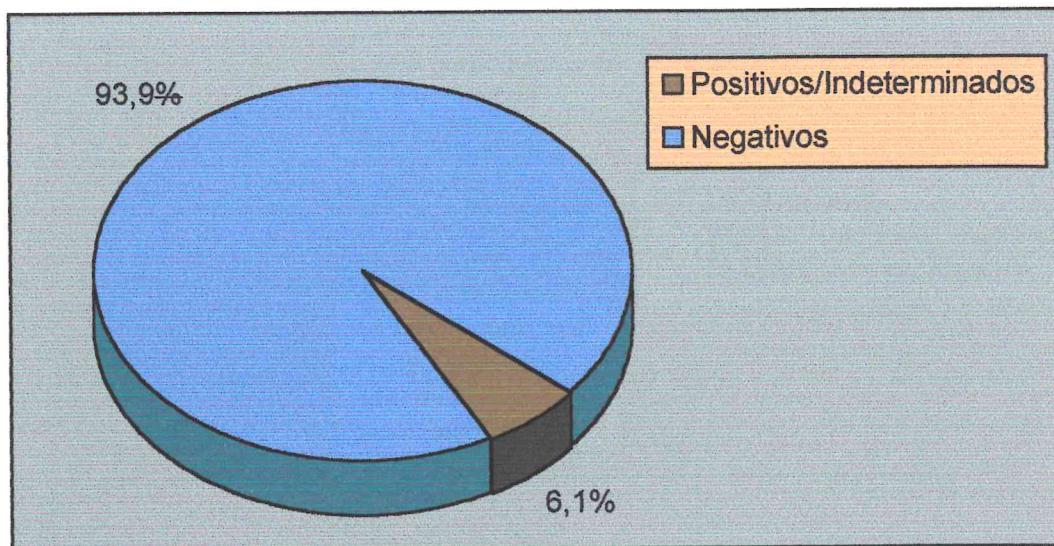
Motivo de Recusa	2001 (%)	2002 (%)	2003 (%)
Hematórito e hemoglobina abaixo dos níveis aceitáveis.	23	24	26
Relação sexual sem preservativo (6 meses)	13,4	15	22
Estado gripal	9,6	9,1	7,2
Outros	8,9	9,1	9,0
Medida de pressão arterial acima do aceitável	7,8	7,8	5,1
Uso de medicamentos	5,8	6,2	2,6
Jejum prolongado	4,0	3,4	2,6
Usuário de maconha e/ou outras drogas	2,7	3,3	2,2
Ingestão de bebida alcoólica	1,6	1,4	1,2
Relação sexual com parceiro de grupo de risco	1,4	1,2	1,4
Hemotransfusão há menos de 10 anos	1,2	1,0	0,5
Heterossexual com mais de 3 parceiros/ano	1,2	1,0	2,2

#### 4.2 Provas sorológicas nas amostras

Fonte: Anexo A - Anexo A - Anexo A

Dentre os indivíduos aceitos para a doação foram selecionados 998 doadores para a realização do presente estudo. Desses, 2,1% apresentaram provas sorológicas positivas ou indeterminadas para HIV e outros testes imunológicos (Anexo A).

Dentre os 998 doadores, verificou-se que 937 foram negativos e 61 (6,1%) apresentaram testes positivos ou inconclusivos em pelo menos uma reação sorológica de rotina (gráfico 8).



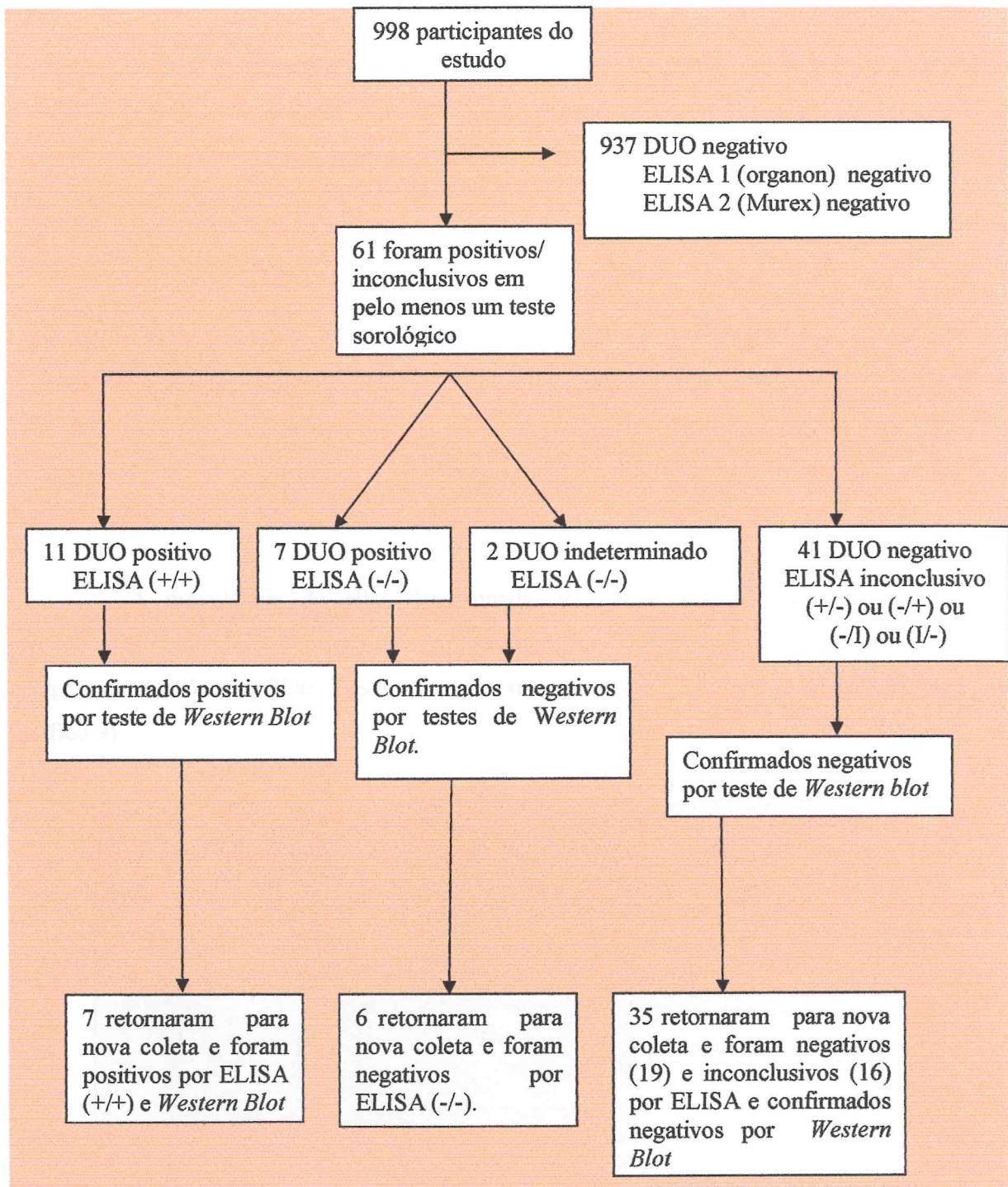
**GRÁFICO-8.** Freqüência de resultados sorológicos (ELISA/DUO) para HIV em doadores de rotina do banco de sangue do HEMOCE.

#### 4.2.1 Análise sorológica da primeira amostra

Dentre os 61 doadores, cujos resultados foram positivos ou inconclusivos na prova sorológica, 11 apresentaram amostras reagentes pelo DUO e pelas provas de ELISA, tendo sido confirmados positivos pelo teste de *Western Blot*. Entre as 50 amostras restantes, 41 apresentaram DUO negativo e testes de ELISA inconclusivos, e foram confirmados negativos pelo *Western Blot*. As 9 amostras restantes que obtiveram resultados DUO positivo e testes de ELISA negativos foram também confirmadas negativas no teste de *Western Blot* (figura 17).

#### 4.2.2 Análise sorológica da segunda amostra

Dos 61 doadores que apresentaram inicialmente testes positivos ou inconclusivos na prova sorológica, 48 retornaram para realizar repetição dos testes. Dentre os doadores que foram positivos nos testes de ELISA, no DUO e no *Western Blot*, 7 retornaram e foram também positivos para o ELISA e *Western Blot*. Dos que foram DUO positivo/indeterminado e ELISA (-/-), 6 retornaram e foram negativos para o ELISA. Entre os que apresentaram DUO negativo e ELISA inconclusivos, 35 retornaram e foram negativos (figura 17).



**FIGURA-17.** Algoritmo da análise sorológica para HIV na população de doadores em estudo.

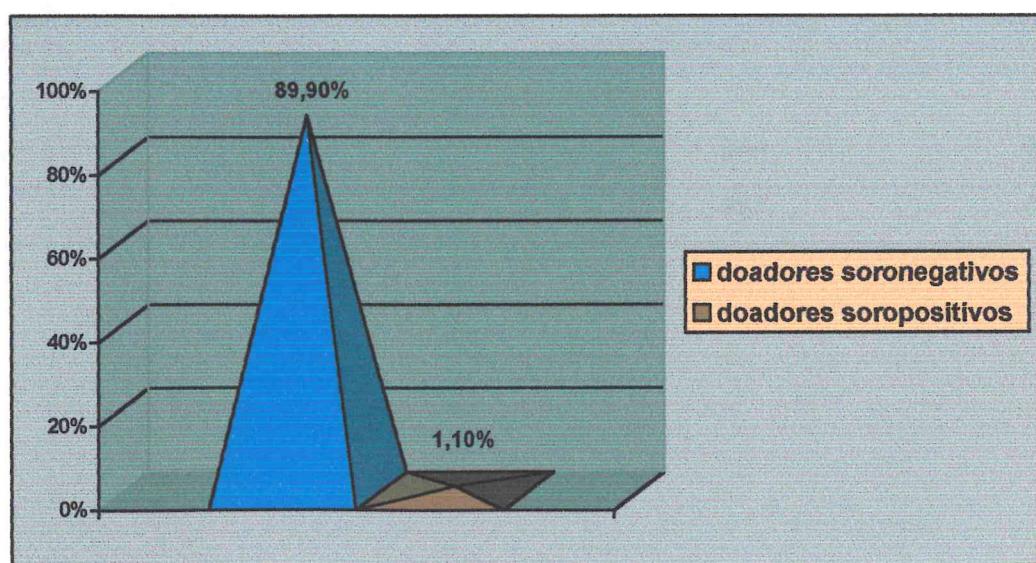
#### 4.3 Investigação de soroconversão

A taxa de soroconversão relaciona doadores negativos que se tornaram positivos durante a evolução da doença. A possibilidade remanescente de uma unidade hemoterápica transmitir uma determinada patologia, mesmo após triagem clínica e sorológica adequadas representa o risco residual.

Dentre a população estudada, nenhum caso de soroconversão foi verificado. Doadores que apresentaram amostras inicialmente negativas nos exames de rotina sorológica (ELISA), permaneceram negativos em novas doações. Dessa forma, o risco residual não pôde ser calculado.

#### 4.4 Prevalência da doença

A prevalência de HIV determinada no estudo foi de 1,1%. Doadores eram considerados soropositivos se os testes imunoenzimáticos eram confirmados positivos por teste complementar (*Western Blot*). Dessa forma, foram verificadas 11 amostras verdadeiras positivas (gráfico 9).



**GRÁFICO-9.** Prevalência de sorologia positiva para HIV dentre os 998 doadores.

#### 4.5 Determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica e dos valores preditivos negativo e positivo dos testes enzimáticos

A partir dos dados obtidos na população estudada, foram calculadas as sensibilidades e especificidades diagnósticas, bem como os valores preditivos positivos e negativos. Para o cálculo, foram considerados como doentes, os indivíduos que apresentavam resultados positivos em pelo menos 2 testes imunoenzimáticos de ELISA e confirmados por *Western Blot*. Foram considerados não doentes, indivíduos negativos ou inconclusivos no ELISA e confirmados negativos por *Western Blot*.

##### 4.5.1 Teste combinado (HIV VIDAS DUO)

A sensibilidade e especificidade encontrada para o VIDAS HIV DUO foi de 100% e 99,3%, respectivamente (tabela 5).

**TABELA-5.** Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste HIV VIDAS DUO na ausência ou presença de doença.

Teste	Doença		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	11	7	18
Negativo	0	980	980
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>987</b>	<b>998</b>

#### 4.5.2 Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon

**TABELA-6.** Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste Vironostika HIV Uni-form II plus O na ausência ou presença de doença.

Teste	Doença		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	11	10	21
Negativo	0	977	977
Total	11	987	998

#### 4.5.3 ICE HIV-1.0.2/Murex

**TABELA-7.** Resultado da análise sorológica em 998 amostras de doadores pelo teste ICE HIV-1.0.2/Murex na ausência ou presença de doença.

Teste	Doença		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	11	03	14
Negativo	0	984	984
Total	11	987	998

As especificidades encontradas nos testes estão apresentadas na tabela 8. O teste VIDAS HIV DUO/Biomerieux apresentou especificidade comparável às provas de triagem. Além disso, o intervalo de confiança mostra a semelhança existente entre os três ensaios.

**TABELA-8.** Especificidade diagnóstica apresentada nos três testes enzimáticos e seus respectivos intervalos de confiança.

Teste	Especificidade	Intervalo de confiança
ICE HIV-1.0.2/Murex	99,7	(99,0-99,9)
VIDAS HIV DUO/Biomerieux	99,3	(98,5-99,7)
Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon	99,0	(98,4-99,6)

A Razão de verossimilhança (RV) foi calculada para o teste VIDAS HIV DUO. Essa relação não depende da prevalência da doença e é a razão entre a probabilidade de um determinado resultado do teste VIDAS HIV DUO em indivíduos soropositivo e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos HIV negativos.

A RV calculada para o teste positivo foi de 142, 86. Isso significa que a chance do teste positivo ser verdadeiro é 143 vezes maior do que ser falso, ou seja, expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes. Como a sensibilidade encontrada foi de 100%, o RV para o teste negativo foi zero, indicando que a chance de um teste negativo ser falso é nula.

O coeficiente de Kappa foi utilizado para verificar a concordância entre dois testes diagnósticos. Esse índice leva em consideração a proporção total de concordâncias observadas e a proporção de concordâncias que seriam esperadas por pura casualidade. O coeficiente Kappa achado entre os dois testes convencionais foi de 60,4% ( $p<0,0001$ ). A concordância entre o teste VIDAS HIV DUO/Biomerieux e o teste ICE HIV-1.0.2/Murex demonstrou-se maior do que a encontrada entre VIDAS HIV DUO/Biomerieux e o teste Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon (Kappa=68,30% *versus* Kappa=54,10%,  $p<0,0001$ ).

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A população de doadores de sangue do HEMOCE é formada principalmente por homens, com idade acima de 29 anos e doadores de primeira vez. Macedo (2002) atribui a maior prevalência de doadores do sexo masculino, devido ao menor número de mulheres aptas à doação. A desproporção peso/altura, período de gravidez, puerpérios, a falta de informação e principalmente a dupla jornada de trabalho contribuem para essa realidade. A proporção de indivíduos com idades de 19 a 29 anos e indivíduos acima de 29 anos foi semelhante. Sampaio et al. (2002) constataram que a solidariedade, a triagem clínica como meio de avaliação de saúde ou mesmo a dispensa no trabalho influencia no aumento do número de doadores em faixa etária acima de 29 anos. Embora, políticas atuais visando aumentar a segurança do sangue transfundido, proponham a fidelidade do doador à prática da doação, a maioria dos indivíduos eram doadores de primeira vez, em sua maioria voluntários, características dos grandes centros urbanos. No trabalho realizado em 998 doadores, verificou-se que 578, 339, 282 doadores retornaram para segunda, terceira e quarta doações, respectivamente. Observa-se uma redução crescente no número de doadores. Trabalho feito por Ownby et al.(1999) em 5 centros de várias áreas dos Estados Unidos demonstraram forte influência da conduta do doador nos resultados dos testes sorológicos. O entusiasmo na primeira doação parece evidente, mas decresce nas doações subsequentes, permanecendo em indivíduos maduros e de maior nível educacional. De fato, o conhecimento dos principais fatores que podem influenciar a conduta de retorno do doador ao banco de sangue e a forma de recrutamento para fidelidade desses indivíduos, tem utilidade na tentativa de assegurar a qualidade do sangue testado, podendo dessa forma, minimizar taxas de rejeição clínica e sorológica, disponibilizando mais unidades hemoterápicas para as transfusões.

A preocupação constante na prevenção de transmissão parenteral de HIV tem permitido novas associações que podem contribuir na evidencia de infecção precoce do vírus. Sinais e sintomas clínicos característicos do processo inicial da doença, durante a presença de antigenemia para p24, estão sendo caracterizados dentre os muitos apresentados por pacientes com AIDS ou com patologias distintas. Em nosso trabalho, dentre os doadores confirmados positivos, 14% relataram queixas em outras doações nas quais não estavam definidas no questionário de trabalho, justificando a necessidade de uma melhor investigação e caracterização

da sintomatologia desses doadores. Quinn (1997), avaliando pacientes com conduta de risco e sintomatologia evidente de HIV, dentre os muitos exames realizados nessa população, encontrou teste positivo para p24 tendo sido confirmado posteriormente por *Western Blot*. Bollinger et al. (1997) também associaram a ocorrência de alguns sinais e sintomas como febre, mialgias à presença de infecção inicial de HIV. Segundo Hecht et al. (2002) após a exposição de HIV a presença de um quadro pseudo-gripal pode ocorrer, muitas vezes coincidindo com o aparecimento do primeiro marcador sorológico que se detecta, o antígeno p24. Contudo, de acordo com Fiebig et al. (2003) uma menor freqüência desses sinais e sintomas pode ser esperada em populações de baixo risco, principalmente em doadores de sangue. De qualquer modo, a realização criteriosa da triagem clínica, valorizando principalmente sinais e sintomas clínicos característicos de infecção aguda de HIV podem ser importantes para indicação de infecção recente.

No nosso trabalho, os principais motivos de rejeição clínica apresentados pelos candidatos à doação demonstraram sinais e sintomas encontrados mais freqüentemente em indivíduos de classe sócio-econômica menos privilegiada, e alguns associados à conduta de risco e a sintomatologia evidente de infecção recente de HIV, como: relação sexual sem uso de preservativo, estado gripal, hematócrito e hemoglobina abaixo dos níveis aceitáveis, jejum prolongado, relação sexual com parceiro de grupo de risco, e usuários de drogas. De fato, alguns desses fatores estão diretamente relacionados à qualidade de vida desses indivíduos e contribuem para um aumento da taxa de inaptidão clínica.

No entanto, avaliações precisas do risco da transmissão dos principais agentes veiculados por transfusão são necessárias para a monitorização do suprimento de sangue. Análises de custo-benefício e custo efetividade de implantação de novas tecnologias de triagem sorológica em bancos de sangue pressupõem o conhecimento da magnitude do risco residual desses agentes.

Há pelo menos quatro razões pelas quais a transmissão de agentes infecciosos continua ocorrendo: 1) doador no período de janela imunológica; 2) resultado falso negativo decorrente de títulos de anticorpos abaixo do limite de detecção do teste; 3) resultado falso

negativo decorrente de uma menor sensibilidade do teste, consequente às variações genéticas do agente; 4) resultados falso negativos decorrentes de erros laboratoriais (CANUTTI JÚNIOR, 1999).

A contribuição de cada uma dessas possibilidades de transmissão de agentes infecciosos através da transfusão de sangue, cujas provas sorológicas foram negativas pode ser determinada com a realização de estudos prospectivos e controlados em indivíduos transfundidos. Nesse tipo de estudo, amostras de sangue são obtidas antes da transfusão e após em intervalos regulares, avaliando a ocorrência de soroconversão. Contudo, devido a redução do risco transfusional observada atualmente, após a introdução de novos testes, há necessidade de um tamanho de amostragem impraticável para verificação desse evento (CANUTTI JÚNIOR, 1999).

Um outro método que utiliza a mensuração indireta de risco, ou seja, que estima risco através de uma hipótese que possa ser aplicada a populações específicas e bem definida, pode ser usado para esse tipo de estudo. Este modelo, chamado de incidência ajustada/periodo de janela imunológica, tem como princípio a utilização de medidas comuns de risco em pesquisa médica, como a prevalência e incidência. A taxa de incidência é definida como o número de doadores novos infectados soropositivos, dividido pelo número de “pessoas-tempo” sob risco. Para ser incluído como um caso incidente, o doador deve ter doado sangue e apresentado o teste sorológico, em avaliação negativo num dado momento e, então, numa doação subseqüentemente apresentar o mesmo teste positivo, ou seja uma soroconversão. No estudo de incidência ajustada, a contribuição dos doadores como “pessoas-tempo” deve ser ajustada àqueles doadores que se tornaram positivos no acompanhamento, ou seja, deve-se assumir que a soroconversão tenha se dado no ponto médio de tempo, desde a sua entrada até a sua soroconversão, devendo ao fato de que após a soroconversão o doador soropositivo passa a ser identificável pelos testes, deixando assim de oferecer risco. Esse método apresenta como vantagem expressar o risco residual com base no número de unidades hemoterápicas transfundidas, e não no número de receptores que se tornam positivos. Além disso, permite a formulação de estimativas para diferentes agentes infecciosos, utilizando-se do mesmo banco de dados que pode ser obtido a partir da avaliação de rotina executada nos serviços de hemoterapia (CANUTTI JÚNIOR, 1999).

Recentemente, um modelo alternativo para o estudo da soroconversão e o cálculo do risco residual tem sido proposto através do emprego de testes de maior acurácia que habitualmente não são utilizados na rotina sorológica dos centros hemoterápicos, embora permita identificar mais precocemente a infecção. São testes de quarta geração com capacidade de detectar simultaneamente antígeno e anticorpo. A necessidade de um grande número de amostras para serem testadas em tempo real, torna essas pesquisas difíceis e trabalhosas (CANUTTI JÚNIOR, 1999). Como ocorreu nos EUA, a introdução desses testes mais eficientes em centros hemoterápicos, resultou na diminuição do risco residual (COVAS, 1998). Schreiber et al. (1996) sugerem a distinção das populações de doadores de primeira vez, daqueles que retornam para novas doações, quando no cálculo do risco residual em bancos de sangue. Contudo, trabalho realizado por Ferreira et al. (2001) não encontraram diferenças estatísticas significativas entre estas populações.

Em nosso trabalho, nenhum caso de soroconversão foi verificado. Dentre os 946 doadores incluídos na pesquisa, cujos resultados foram negativos para o ELISA na primeira doação, 542 retornaram para novas doações e continuaram negativos. Não houve casos de pacientes doentes com resultado de teste negativo, repercutindo numa elevada sensibilidade diagnóstica e valor preditivo negativo para os ensaios imunoenzimáticos (100%). Dados similares foram encontrados por Alamawi et al. (2003). Capra et al. (2001) avaliando o impacto da adoção do teste combinado em triagem de doadores do Hospital São Lucas-RS, também não registraram caso de conversão sorológica em 10.000 doações. Segundo eles, a utilidade do teste deve ser avaliada de acordo com a incidência de sorologia positiva local. Schreiber et al. (2002) prevêem um baixo rendimento do teste para a pesquisa do antígeno p24. Eles acreditam que indivíduos com recente prática de comportamento de risco, ou mesmo, com sintomatologia associada à infecção aguda do HIV poderiam retardar a volta ao banco de sangue, quando os anticorpos já deveriam ser detectáveis por testes de terceira geração. Diferentemente Courouce (1999), Yerly, Simon e Perrin (1999) e Laperche, Maniez-Montreuil e Couroucé (2000) justificaram a redução da janela imune e a importância do teste na avaliação de infecção recente.

A especificidade diagnóstica encontrada para os testes imunoenzimáticos foram 99,0% (Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon), 99,3% (HIV VIDAS DUO/Biomerieux),

99,7% (ICE HIV-1.0.2/Murex). Fransen et al. (1997) e Brust et al. (2000) também verificaram especificidades superiores a 99% após o uso de ensaio combinado em doadores de sangue. Nossos resultados demonstraram que o desempenho do teste combinado é pelo menos igual ou superior aos métodos existentes no mercado. Além disso, a concordância entre os testes VIDAS HIV DUO/Biomerieux e ICE HIV-1.0.2/Murex (Kappa=68,30%,  $p<0,0001$ ) demonstrou ser melhor do que entre VIDAS HIV DUO/Biomerieux e Vironostika HIV Uni-form II plus O/Organon (Kappa=54,10%,  $p<0,0001$ ) e a encontrada entre os dois testes convencionais de ELISA (60,4%,  $p<0,0001$ ). No entanto, novos estudos em doadores são necessários numa amostragem maior para que se confirme a utilidade do teste combinado na detecção de infecção recente de HIV em serviços de bancos de sangue.

Embora o novo ensaio represente um maior progresso em comparação com os testes anteriores, a ocorrência de provas falso positivas podem ser esperadas. Segundo Weber et al. (1998) taxas de testes falsos positivos podem ser inclusive, superiores aos ensaios de terceira geração. Em nossa pesquisa este percentual estimado para o HIV VIDAS DUO foi de 0,7%, índice semelhante aos citados por Weber et al. (2002) e superior aos achados por Meier et al. (2001). Muitos estudos têm criticado o uso de teste combinado devido o aumento de reações falso positivas, quando otimistas, julgam apenas equivalentes aos testes de terceira geração. De qualquer modo, em população de doadores onde o uso de provas extremamente sensíveis são realizadas, é inevitável o grande número de testes indeterminados e também falso positivos, sejam nos ensaios de terceira ou de quarta geração. Dentre as causas associadas a esse evento está a presença de reatividade cruzada, principalmente com doenças como hepatite B, hepatite C, herpes e mononucleose infecciosa. Algumas dessas inclusive investigadas na rotina sorológica dos centros hemoterápicos.

De fato, muitos são os fatores que podem interferir na sensibilidade e especificidade de uma prova. A variabilidade dos subtipos genéticos, as propriedades intrínsecas desse vírus, o caminho da infecção, via de contaminação e, principalmente, em se tratando do teste combinado, do momento de realização da prova durante a infecção pelo HIV. Janssen et al. (1998) acreditam que o período de duração da antigenemia é muito breve, em torno de 22 dias. Weber (2003) discute a possibilidade de uma segunda janela imunológica para o teste

combinado durante a soroconversão, quando ocorre queda na antigenemia e o nível de anticorpo ainda se encontra indetectável. Determinar as conseqüências da provável presença da segunda janela imunológica em doadores de sangue, requer pesquisas muito complexas e dispendiosas, em um grande número de doadores.

De forma geral, as técnicas empregadas apresentaram alta sensibilidade e especificidade, porém, em bancos de sangue, o valor preditivo positivo foi baixo para os testes enzimáticos e decorre da baixa prevalência (1,1%) da doença. Candidatos que procuram o hemocentro para fazer doações, são indivíduos teoricamente sadios, o que diminui a chance da presença da doença quando o resultado do teste é positivo. Segundo Martinez et al. (1999) o teste combinado antígeno/anticorpo é mais bem empregado para fins diagnóstico, onde a conduta do indivíduo ou a sintomatologia presente estão relacionadas a suspeita clínica do médico. É indicado para pacientes com história sugestiva de fatores de risco, em pessoas que se contaminaram accidentalmente, em amostras de indivíduos que apresentaram testes inconclusivos e em amostras de doadores anônimos de órgãos. Nessa população ocorre uma maior prevalência da doença e um maior valor preditivo positivo pode ser esperado. Por outro lado, estudos feitos por Park; Kim, M; Kim, H. (2001), revelaram que a sensibilidade e especificidade apresentada pelo teste combinado mantém-se estável mesmo em populações de baixo risco, e é comparável aos achados na literatura. No entanto, o aperfeiçoamento da especificidade do teste pode ser importante para minimizar a restestagem desnecessária.

De qualquer modo, mesmo com a utilização de testes imunológicos de quarta geração, que de certo modo propõem a redução da janela imunológica, o risco das transfusões de sangue realizadas no Brasil continua vulneráveis aos vírus da AIDS. A proposta de implantação de tecnologia de detecção de ácidos nucléicos, motivada pela necessidade de se evitar o risco transfusional de doações soronegativas em populações de baixo risco, tem sido apresentada com a finalidade de detectar ácidos nucléicos virais em unidades com viremia e sem anticorpos, ou ainda não detectáveis, isto é, com elevada sensibilidade e especificidade. Por outro lado, testes de biologia molecular têm seu uso restrito a centros especializados e

segundo o FDA não são indicados para diagnóstico de infecção primária (ANGULO, 2004; GRANATO, 2001; VULNERABILIDADE..., 2004).

Passados dois anos, a portaria nº 262/GM do Ministério da Saúde de 5 de fevereiro de 2002, que determinava a disponibilização de novas tecnologias que utilizam técnicas de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) para o HIV em bancos de sangue, não conseguiu ser cumprida. Estudos feitos pela ANVISA em 2001 previam uma redução de 11 dias da janela imunológica e uma potencial capacidade de se evitar um total de 355 casos por ano de infecção por transfusão de sangue. O objetivo era substituir os testes atuais usados nos hemocentros (BRASIL, 2002; VULNERABILIDADE..., 2004).

Por outro lado, além do alto custo na implantação do teste, inúmeros problemas seriam gerados, exigindo uma cuidadosa análise na relação custo/benefício. Dentre estes, a alta sensibilidade atribuída ao teste não confere um poder ilimitado na identificação de unidades infectantes. A realização do teste utilizando-se *pools* poderia reduzir a sensibilidade diagnóstica. Um doador soronegativo seria considerado inapto com NAT reagente. Critérios muitos exigentes no processamento da amostra seriam necessários para se evitar provas falso negativas, e há possibilidade de contaminação cruzada e outras interferências que podem gerar falso positivos. Além disso, outros fatores de risco não eliminados pelo uso dessa tecnologia, como a presença de variantes virais, a soroconversão atípica, e os diferentes graus de eficiência nas diversas fases que compõem os testes poderiam comprometer o resultado dos testes (ÂNGULO, 2004).

Em nosso trabalho, técnicas de detecção de biologia molecular, como o PCR ou NAT poderiam ter sido realizadas para identificação do RNA viral do HIV. Entretanto, o nosso serviço não dispõe de testes de biologia molecular. Por outro lado, por se tratar de uma técnica extremamente sensível e que não há outras técnicas que possa confirmar o resultado, o FDA não indica o uso da PCR para diagnóstico de infecção primária (GRANATO, 2001).

Dessa forma, testes de quarta geração com capacidade de detectar antígeno e anticorpo são ainda uma alternativa que podem ser empregados em rotina de bancos de sangue. A segurança transfusional, não depende apenas de elementos de caráter imunológico. Outros fatores como a educação, e a seleção cuidadosa de doadores por meio de entrevista e outros métodos com orientação e supervisão médica podem ser decisivos na garantia de qualidade do sangue a ser transfundido (ÂNGULO, 2004; BRUST et al., 2000).

## 6 CONCLUSÕES

- A população de doadores era constituída, em sua maioria, por indivíduos do sexo masculino e que realizavam doações voluntárias pela primeira vez. Verificou-se ainda que o número de doadores aptos que voltavam ao hemocentro diminuía à medida que aumentava o número de retorno para novas doações.
- Achados de anemia na população atribuída à taxa de hemoglobina e hematócrito abaixo dos níveis aceitáveis, a prática da relação sexual sem uso de preservativo e o estado gripal do indivíduo representavam os principais motivos de rejeição clínica, correspondendo por quase 50% dos candidatos à doação.
- A prevalência de HIV encontrada entre doadores de sangue foi de 1,1%.
- A ocorrência de provas falso positivas nos testes de ELISA interferiram nos parâmetros de especificidade diagnóstica e valor preditivo positivo. De qualquer modo, a especificidade demonstrada por ambos os testes de terceira e quarta geração foi igual ou superior a 99%.
- A sensibilidade diagnóstica e o valor preditivo negativo dos testes de ELISA foi de 100%, uma vez que não foram observados resultados falso negativos nas amostras testadas por ambos os métodos de terceira e quarta geração. Nenhum caso de soroconversão foi verificado na população em estudo.
- Novos estudos em doadores são necessários numa amostragem maior para que se confirme a utilidade do teste combinado na evidencia de infecção recente de HIV em serviços de bancos de sangue.
- Além da realização dos testes imunológicos, o conhecimento de outros parâmetros relacionados ao perfil e conduta do doador, pode representar estratégia importante para garantir uma maior qualidade do sangue disponibilizado em centros hemoterápicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT. **Murex HIV Blot 2.2.** São Paulo, 2001.

ABBOTT. **Murex ICE HIV-1.0.2.** Germany, 2000.

ALAMAWI, S.; ABUTALED, A.; QASEM, L.; MASOUD, S.; MEMISH, Z.; AL KHAIRY KHEIR, O.; BERNVIL, S.; HAJEER, A.H. HIV-1 p24 antigen testing in blood banks: results from Saudi Arabia. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 60, n. 2, p. 102-104, 2003.

ALDEN, P. **La pandemia global del SIDA.** Disponível em: <http://www.virtualizar.com/php/novedades/notas.php3?id=z380flf72a904a&base=%2Fusr%2Flocal%2Fetc%2Fhttpd%2Fhtdocs%2F%6.> Acesso em: 19 fev. 2000.

AMATO NETO, V.; BALDY, J. L. S. **Doenças transmissíveis.** 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1989.

AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. A .S.; KALLAS, E. G.; LEVI, G. C.; BALDY, J. L. S.; MEDEIROS, R. S. S. **AIDS na prática médica.** São Paulo: Sarvier, 1996. 153p.

ANGULO, L.I. Detecção de agentes infecciosos pela tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos. Hemocentro de Ribeirão Preto. Disponível em: [www.pegasus.fmrp.usp.br?educação/doeninfctrans/testamplcidos.pdf.resultadoadicional](http://www.pegasus.fmrp.usp.br?educação/doeninfctrans/testamplcidos.pdf.resultadoadicional). Acesso em 20 ago. 2004.

AUBUCHON, J. P.; BIRKMAYER, J. D.; BUSCH, M. P. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood. **Transfusion**, v. 37, n. 1, p. 45-49, 1997.

BARIN, F.; COUROUCE, A. M.; PILLONEL, J.; BUZELAY, L. Increasing diversity of HIV-1 serotypes in french blood donors over a 10-year period (1985-1995) Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion. **AIDS**, v. 11, n. 12, p. 1503-1508, 1997.

BARIN, F.; LAPERCHE, S.; COUROUCE, A. M. Genetic diversity of viruses. Consequences for screening and prevention. **Transf. Clin. Biol.**, v. 7, n. 5, p. 472-478, 2000.

BARRETT, J. E.; DAWSON, G.; HELLER, J.; BAIRSTOW, C.; FICO, R.; WEBBER, J. S.; GUTIERREZ, R. Performance evaluation of the Abbott HTLV III EIA, a test for antibody to HTLV-III in donor blood. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 86, p. 180-185, 1986.

BINSBERGEN, J. V.; SIEBELINK, A.; JACOBS, A.; KEUR, W.; BRUYNIS, F.; VAN DE GRAAF, M.; VAN DER HEIJDEN, J.; KAMBEL, D.; TOONEN, J. Improved performance of seroconversion with a 4<sup>th</sup> generation HIV Antigen/Antibody assay. **J. Virol. Methods**, v. 82, p. 77-84, 1999.

**BIOMÉRIEUX. VIDAS HIV DUO.** Lyon, 1998.

BOLLINGER, R. C.; BROOKMEYER, R. S.; MEHENDALE, S. M.; PARANJAPE, R. S.; SHEPHERD, M. E.; GADKARI, D. A.; QUINN, T. C. Risk factors and clinical presentation of acute primary HIV infection in India. **JAMA**, v. 278, n. 23, p. 2085-2089, 1997.

BRASIL. Lei 7649, de 25 de janeiro de 1988. Estabelece a obrigatoriedade do cadastramento dos doadores de sangue, bem como a realização de exames laboratoriais no sangue coletado, visando a prevenir a propagação de doenças, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 jan 1988. Seção 1, p. 1609.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A epidemia da AIDS no Brasil: situação e tendência.** Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aids no Brasil: um esforço conjunto, governo e sociedade.** Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico AIDS - Ano XVI**, n.1, abr./dez. 2000. Disponível em: [http://www.aids.gov.br?final/biblioteca/bol\\_dezembro\\_2002/boletim.asp](http://www.aids.gov.br?final/biblioteca/bol_dezembro_2002/boletim.asp). Acesso em: 25 mar. 2004.

BRASIL. Portaria nº 262/GM, em 05 de fevereiro de 2002. Torna obrigatório, no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão nos serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e privados, os testes de amplificação e detecção de ácidos nucléicos – NAT, para HIV e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores. Fev 2002. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002/Gm/GM -262.htm>. Acesso em: 31 ago 2004.

BRASIL. Resolução CFM 1331, de 21 de setembro de 1989. O prontuário médico é documento de manutenção permanente dos estabelecimentos de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 set. 1989. Seção 1, p. 17145.

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

BUCHALLA, C.M. AIDS: o surgimento e a evolução da doença. In: MONTEIRO, C. A. **Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças**. São Paulo: Hucitec, 1995.

BUSCH, M. P.; YOUNG, M. J.; SAMSON, S. M.; MOSLEY, J. W.; WARD, J. W.; PERKINS, H. A. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by blood transfusions before the implementation of HIV-1 antibody screening. **Transfusion**, v. 31, p. 4-11, 1991.

CANUTTI JÚNIOR, V. Risco transfusional: metodologia e estudo. In: ESCOLA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA. **Atualização em hemoterapia**. São Paulo, 1998. p. 90-99. (Série de Monografias, v. 5)

CAPRA, M.E.Z.; FASSINA, K.; BENDER, A.L.; MELO, K.F., LARANGEIRA, M.L., WINCKLER, M.A. Triagem para HIV em doadores de sangue com teste combinado (anticorpos + antigenemia p240 no hospital São Lucas da PUC-RS. In: ESCOLA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA. **Atualização em hemoterapia**. São Paulo, 2001, p. 536 (Série de Monografias, v. 8, supl. Abst.)

CASOS de aids e taxas de incidência (por 1000000 hab.), segundo ano de diagnóstico e local de residência, Brasil 1987. Disponível em: [http://www.Aids.gov.br/final/dados/dados\\_coletiva/tabela.htm](http://www.Aids.gov.br/final/dados/dados_coletiva/tabela.htm). Acesso em: 20 maio 2004.

CHERMANN, J. C.; BARRE-SINOUSSI, F.; DAUGUET, C.; BRUN-VESINET, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. **Antibiot. Chemother.**, v. 32, p. 48-53, 1984.

CLAVEL, F.; GUÉTARD, D.; BRUN-VÉZINET, F.; CHAMARET, S.; REY, M. A.; SANTOS-FERREIRA, M. O.; LAURENT, A. G.; DAUGUET, C.; KATLAMA, C.; ROUZIOUX, C. Isolation of a new retrovirus from west African patients with AIDS. **Science**, v. 233, p.343-346, 1986.

COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H.; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, H.; VOGT, P. Human immunodeficiency virus. *Science*, v. 232, n. 4751, p. 697-700, 1986.

CONSIDERAÇÕES gerais diagnóstico sorológico: vírus da imunodeficiência adquirida. [S.I.]. Abbott Diagnostica, [1998?].

CONSTANTINE, N. T.; SILL, A. M.; JACK, N.; KRISTEN, K.; EDWARDS, J.; CAFARELLA, T.; SMITH, H.; BARTHOLOMEW, C.; CLEGHORN, F. R.; BLATTNER, W.A. Improved classification of recent HIV-1 infection by employing a two-stage sensitive/less-sensitive test strategy. *J. Acquir. Immune Defic. Sindr.*, v. 32, p. 94-103, 2003.

COUROUCE, A. M. Sensitivity of screening kits for anti-HIV antibodies. 1999 update. Retrovirus Working Group of the French Society for Blood Transfusion. *Transf. Clin. Biol.*, v. 6, n. 6, p. 381-394, 1999.

COVAS, D. T. Risco de transmissão do HIV-1 pelas transfusões de sangue. ESCOLA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA. *Atualização em hemoterapia*. Local, 1998. p. 100-106. (Série de Monografias, v. 5)

CROWL, R.; GANGULY, K.; GORDON, M.; CONROY, R.; SCHABER, M.; KRAMER, R.; SHAW, G.; WONG-STAAL, F.; REDDY, E. P. HTLV-III env gene products synthesize in *E. coli* are recognized by antibodies present in the sera of AIDS patients. *Cell*, v. 41, p. 979-986, 1985.

DADOS e pesquisas em DST e Aids: dados de Aids. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/final/dados/aids.htm> Acesso em: 20 maio 2004a.

DADOS e pesquisas em DST e Aids: dados de DST. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/final/dados/dst.htm> Acesso em: 20 maio 2004b.

DADOS e pesquisas em DST e Aids: dados de HIV. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/final/dados/hiv.htm> Acesso em: 20 maio 2004c.

DALLABETTA, G.; LAGA, M.; LAMPEY, P. **Controle de doenças sexualmente transmissíveis:** manual de planejamento e coordenação de programas. Rio de Janeiro: Te corá, 1997.

DELFORGE, M. L.; DOLLÉ, N.; PHILIPPE, H.; CORINNE, L. Delayed HIV primary infection diagnosis with a four-generation HIV assay. *AIDS*, v. 16, n. 1, p. 128-130, 2002.

DJOSSOU, F.; SALMI, L. R.; LAWSON-AYAYI, S.; HUET, C.; PEREZ, P.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; SALAMON, R. Cost-benefit analysis of screening strategies by human immunodeficiency virus in French blood donors. *Transf. Clin. Biol.*, v. 6, n. 3, p. 180-188, 1999.

FENOUILLET, E.; BLANES, N.; COUTELLIER, A.; GLUCKMAN, J. C. Relationship between anti-p24 antibody levels and p24 antigenemia in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, v. 9, n. 12, p. 1251-11255, 1993.

FERNANDES, M. F. A. **Hemovigilância:** análises das informações disponíveis para a 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.

FERREIRA JUNIOR, O.C.; POLITE, M.; AMABILE, C.; ARAI, Y.; FARINHA, M.L.; GUERRA, C.; KUTNER, J.M. Prevalência e incidência de HIV em doadores de sangue de repetição freqüentes e esporádicos. In: XVIII CONGRESSO NACIONAL DO COLÉGIO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, Fortaleza, Série de monografias...v.8, p.186, 2001. *Abst*

FIEBIG, E. W.; WRIGHT, D. J.; RAWAL, B. D.; GARRETT, P. E.; SCHUMACHER, R. T.; PEDDADA, L.; HELDEBRANT, C.; SMITH, R.; CONRAD, A.; KLEINMAN, S. H.; BUSCH, M. P. Dinamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, v. 17, n. 13, p. 1871-1879, 2003.

FRANSEN, K.; BEELAERT, G.; GROEN, V. D. G. Evaluation of four HIV antigen tests. *J. Virol. Methods*, v. 93, p. 189-193, 2001.

FRANSEN, K.; MERTENS, G.; STYNEN, D.; GORIS, A.; NYS, P.; NKENGASONG, J.; HEYNDRICKX, L.; JANSSENS, W.; GROEN, V. D. G. Evaluation of a newly developed HIV antigen test. *J. Med. Virol.*, v. 53, n. 1, p. 31-35, 1997.

GALLO, R. C.; SALAHUDDIN, S. Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G. M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B. F.; PALKER, T. J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, v. 224, n. 4648, p. 500-503, 1984.

GRANATO, C. Interpretação das técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-HIV. São Paulo, abril 2001. Disponível em: [www.fleury.com.br/mednews/0401/curso\\_hiv.htm](http://www.fleury.com.br/mednews/0401/curso_hiv.htm). Acesso em: 15 dez. 2001.

HAMERSCHLAK, N.; PASTEMAK, J.; AMATO NETO, V. Risco atual de transmissão de AIDS por transfusão. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo*, v. 48, n. 4, p. 183-185, 1993.

HAYASHI, T.; WATANABE, S.; KONDO, M.; SAITO, T.; IMAI, M. Evaluation of a new screening assay kit for the combined detection of HIV p24 antigen and antibody-comparison of the performance of the new kit and HIV antibody assay kits. *Kansenshogaku Zasshi*, v. 73, n. 7, p. 681-688, 1999.

HECHT, F. M.; BUSCH, M. P.; RAWAL, B.; WEBB, M.; ROSENBERG, E.; MELINDA, S.; CHESNEY, M.; ANDERSON, J.; LEVY, J.; KAHN, J. O. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS*, v. 16, n. 8, p. 1119-1129, 2002.

INFECTION DISEASES SOCIETY OF AMÉRICA.(IDSA). The acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and infection with the Human Immunodeficiency Virus. *J. Infect. Dis.*, v.158, n. 2, p. 273-285, 1988.

JANSSEN, R. S.; SATTEN, G. A.; STRAMER, S. L.; RAWAL, B. D.; O'BRIEN, T. R.; WEIBLEN, B. J.; HECHT, F. M.; JACK, N.; CLEGHORN, F. R.; KAHN, J. O.; CHESNEY, M. A.; BUSCH, M. P. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA*, v. 280, n. 1, p. 42-48, 1998.

KORELITZ, J. J.; BUSCH, M. P.; WILLIAMS, A. E. Antigen testing for human immunodeficiency virus and the magnet effect: will the benefit of a new HIV test be offset by the numbers of higher risk, test-seeking donors attracted to blood centers? Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion*, v. 36, n. 3, p. 203- 208, 1996.

LACKRITZ, E. M.; SATTEN, G. A.; ABERLE-GRASSE, J.; DODD, R. Y.; RAIMONDI, V. P.; JANSSEN, R. S.; LEWIS, F.; NOTARI IV, E. P.; PETERSEN, L. R. Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl. J. Med.*, v. 333, n. 26, p. 1721-1725, 1995.

LAPERCHE, S.; MANIEZ-MONTREUIL, M.; COUROUÇÉ, A. M. Les tests de dépistage combiné de l'antigène p24 et des anticorps anti-VIH dans l'infection précoce à VIH-I. *Transf. Clin. Biol.*, v. 7, suppl. 1, p. 18-24, 2000.

LAVREYS, L.; THOMPSON, M. L.; MARTIN, H. L. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: clinical manifestations among women in Mombasa, Kenia. *Clin. Infect. Dis.*, v. 30, p. 486-490, 2000.

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

LY, T. D.; MARTIN, L.; DAGHFAL, D.; SANDRIDGE, A.; WEST, D.; BRISTOW, R.; CHALOUAS, L.; QIU, X.; LOU, S. C.; HUNT, J. C.; SCHOCHETMAN, G.; DEVARE, S. G. Seven human immunodeficiency virus antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 9, p. 3122-3128, 2001.

MACEDO, S.R.M. As representações sociais das mulheres sobre sangue e doação de sangue. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 25., *Anais...* Salvador, p. 41, 2002.

MARTINEZ-MARTINEZ, P.; MARTIN, B. E.; DE BENITO, J.; LANDINEZ, R. New lineal immunoenzymatic assay for simultaneous detection of p24 antigen and HIV antibodies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 18, n. 8, p. 591-594, 1999.

MEIER, T.; KNOLL, E.; HENKES, M.; ENDERS, G.; BRAUN, R. Evidence for a diagnostic window in fourth generation assays for HIV. *J. Clin. Virol.*, v. 23, p. 113-116, 2001.

MÉTODOS de detección del VIH-1: revisión. set. 1998. Disponible em: <http://www.ctv.es/USERS/FPARDO/VIH4.HTM>. Acesso em: 19 fev. 2000.

MUKADI, B. K.; VANDERCAM, B.; BODEUS, M.; MOREAU, M.; GOUBAU, P. An HIV seroconversion case: unequal performance of combined antigen/antibodies assays. *AIDS*, v. 16, n. 1, p. 127-128, 2002.

ONUSIDA. Organización Mundial de la Salud. **Situación de la epidemia de SIDA: 2003.** Ginebra, 2003.

OWNBY, H. E.; KONG, F.; WATANABE, K.; TU, Y. Analysis of donor return behavior. Nassau for the Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion*, v. 39, n. 10, p. 1128-1131, 1999.

PARK, K. I.; KIM, J. M.; KIM, H. S. Evaluation of a simultaneous HIV antigen and antibody detection test in Korean population. **Yonsei Med. J.**, v. 42, n. 2, p. 185-193, 2001.

PETERSEN, L. R.; DOLL, L. S. HIV-1 infected blood donors: epidemiologic, laboratory and donation characteristics. **Transfusion**, v. 31, p. 698-703, 1991.

PETERSEN, L. R.; SATTEN, G. A.; DODD, R.; BUSCH, M.; KLINMAN, S.; GRINDON, A.; LENES, B. Duration of time from onset of human immunodeficiency virus type 1 infectiousness to development of detectable antibody. The HIV seroconversion study group. **Transfusion**, v. 34, n. 4, p. 283-287, 1994.

PILCHER, C. D.; WOHL, D. A.; HICHS, C. B. Diagnosing primary HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, v. 136, n. 6, p. 488-491, 2002.

QUESADA, M. D.; MATAS, L.; ALMEDA, J.; CASABONA, J. Diagnóstico postesposicional precoz de la infección por VIH. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.**, v. 21, n. 6, p. 320-323, 2003.

QUINN, T. C. Acute primary HIV infection. **JAMA**, v. 278, n. 1, p. 58-62, 1997.

SABINO, E. C.; SALLS, N.; SAÉZ-ALQUÉZAR, A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; CHAMONE, D. F.; BUSCH, M. P. Estimated risk of transfusion-transmitted HIV infection in São Paulo, Brazil. **Transfusion**, v. 39, n. 10, p. 1152-1153, 1999.

SAMPAIO, D.A.; LOPES, J.M.E.; FONTE, M.V.; KERBAUY, J. Estudo comparativo da motivação para a doação de sangue entre doadores idosos (50 a 60 anos) e doadores jovens (18 a 28 anos). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 25., anais..., Salvador, p. 42, 2002.

SAMUELSON, J. Doenças infecciosas. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 9, p. 296-360.

SARKODIE, F.; ADARKWA, M.; ADU-SARKODIE, Y.; CANDOTTI, D.; ACHEAMPONG, J. W.; ALLAIN, J. P. Screening for viral markers in volunteer and replacement blood donors in West Africa. **Vox Sang.**, v. 80, n. 3, p. 142-147, 2001.

SCHREIBER, G. B.; BUSCH, M. P.; KLEINMAN, S. H.; KORELITZ, J. J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N. Engl. J. Med.*, v. 334, n. 26, p. 1685-1690, 1996.

SCHREIBER, G. B.; GLYNN, S. A.; SATTEN, G. A.; KONG, F.; WRIGHT, D.; BUSCH, M. P.; TU, Y.; KLEINMAN, S. H. HIV seroconverting donors delay their return: screening test implications. *Transfusion*, v. 42, n. 4, p. 414-421, 2002.

SELIK, R. M.; WARD, J. W.; BUEHLER, J. W. Trends in transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome in the United States, 1982 through 1991. *Transfusion*, v. 33, n. 11, p. 890-893, 1993.

SIDA: Historia de una epidemia. Disponível em: <[http://www.virtualizar.com/php/novedades/notas.php3?id=z389b0f3ed045d&base=%2Fusr%2Flocal%2Fetc%2Fhttpd%2Fhtdocs%2F%](http://www.virtualizar.com/php/novedades/notas.php3?id=z389b0f3ed045d&base=%2Fusr%2Flocal%2Fetc%2Fhttpd%2Fhtdocs%2F%>)> . Acesso em: 19 fev. 2000.

SIMONETTI, S.R.R.; SIMONETTI,J.P. Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. In: FERREIRA, W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 92-100.

STEINBROOK, R. The AIDS epidemic in 2004. *N. Engl. J. Med.*, v. 351, n.2, p. 115-117, 2004.

THULER, L. C. S.; VAZ, L. F. G. Infecção pelo HIV. *JBM*, v. 66, n. 3, p. 85-108, 1994.

VIRONOSTIKA: HIV uni-form II plus O. São Paulo: Akzo Nobel, 1996.

VULNERABILIDADE nos bancos de sangue brasileiros persiste. **Folha de São Paulo**, São Paulo, São Paulo, 17 abril 2004. Disponível em: [www.agenciaaids.com.br/noticias-resultado.asp?Codigo=756](http://www.agenciaaids.com.br/noticias-resultado.asp?Codigo=756) . Acesso em: 20 ago 2004.

WEBER, B. Hiv seroconversion: performance of combined antigen/antibody assays. *AIDS*, v. 17, n. 6, p. 931-933, 2003.

WEBER, B.; BERGER, A.; RABENAU, H.; DOERR, H. W. Evaluation of a new combined antigen and antibody human immunodeficiency virus screening assay, VIDAS HIV DUO Ultra. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 4, p. 1420-1426, 2002.

WEBER, B.; DEVARE, S. G. Human immunodeficiency virus (HIV) antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 11, p. 4402-4404, 2002.

WEBER, B.; FALL, H. M. B.; BERGER, A.; DOERR, H. W. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, n. 8, p. 2235-2239, 1998.

WEBER, B.; MEIER, T; ENDERS, G. Fourth generation human immunodeficiency virus (HIV) screening assays with an improved sensitivity for p24 antigen close the second diagnostic window in primary HIV infection. *J. Clin. Virol.*, v. 25, p. 357-359, 2002.

WEBER, B.; MUHLBACHER, A.; MICHL, U.; PAGGI, G.; BOSSI, V.; SARGENTO, C.; CAMACHO, R.; FALL, H. M. B.; BERGER, A.; SCHMITT, U.; MELCHIOR, W. Multicenter evaluation of a new rapid automated human immunodeficiency virus antigen detection assay. *J. Virol. Methods*, v. 78, p. 61-70, 1999.

WEBER, B.; THORSTENSSON, R.; TANPRASERT, S.; SCHITT, U.; MELCHIOR, W. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sang.*, v. 85, n. 2, p. 73-74, 2003.

WEBERT, K. E.; CHIAVETTA, J. A.; DISTEFANO, L.; BLAJCHMAN, M. A. Window period HIV in a test-seeking blood donor: first p24 antigen positive donor in Canada without detectable anti-HIV antibodies. *Transfusion*, v. 43, suppl. 1, p.118, 2003. Abs.

WENDEL, S.; FACHINI, R. M.; LEVI, J. E.; GHANAME, J N.; MENDONÇA, M. C.; ALMEIDA NETO, C.; BRAGA, M. C.; DI PIETRO, A. E. A single window-period donation detected by human immunodeficiency virus p24 antigen after 5 years of routine screening in a group of Brazilian blood banks. *Vox Sang.*, v. 83, n. 4, p. 309-312, 2002.

YERLY, S.; SIMON, F.; PERRIN, L. Early diagnosis of primary HIV infections: using a combined screening test (p24 antigen and anti-HIV antibodies). *Schweiz. Med. Wochenschr.*, v. 129, n. 8, p. 319-322, 1999.

## ANEXO A- RESOLUÇÃO - RDC Nº 153, DE 14 DE JUNHO DE 2004.

Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de sua atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, art. 111, inciso I, alínea "b", § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no D.O.U. de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 7 de junho de 2004, considerando a competência atribuída a esta Agência, a teor do artigo 8º, § 1º, VII e VIII da lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999; considerando as disposições contidas nos artigos 2º e 3º da lei nº 10.205 de 21 de março de 2001; considerando que o sangue e seus componentes, incluindo as células progenitoras hematopoéticas, devem ser submetidos a procedimentos de coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte e utilização visando a mais elevada qualidade e segurança; considerando que a padronização dos procedimentos em hemoterapia, acima descritos, é imprescindível para a garantia da qualidade do sangue e componentes utilizados no país; considerando a necessidade de regulamentar a padronização dos procedimentos em hemoterapia; considerando a necessidade de regulamentar o funcionamento dos serviços de hemoterapia e de bancos de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo (BSCUPA); considerando a importância de compatibilizar, integralmente, a legislação nacional com os instrumentos harmonizados no âmbito do Mercosul, Res. GMC nº 42/00, resolve: adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o regulamento técnico para os procedimentos de hemoterapia para coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte, utilização e controle de qualidade do sangue e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea, para uso humano.

Parágrafo único. A execução das análises de controle de qualidade no território nacional, sempre que exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, obedecerá ao disposto no inciso XXXI, Art. 3º do Decreto 79094/77 (Análise Fiscal).

Art. 2º O não cumprimento das normas estabelecidas nesta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando o infrator às penalidades previstas na Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977.

Art. 3º As instituições terão um prazo de 12 meses para se adequar, para o cumprimento dos itens B.6.1, B.7.3, E.2.10, F.2.3 e N.3.

Art. 4º Essa Resolução e seus anexos devem ser revistos, no mínimo, a cada 02 (dois) anos.

Art. 5º Revogam-se as disposições em contrário, incluindo a RDC 343 de 13 de dezembro de 2002 e a RDC 190 de 18 de julho de 2003.

Art. 6º Esta Resolução entra em vigor na data da sua publicação.

CLÁUDIO MAIEROVITCH PESSANHA HENRIQUES

### B - DOAÇÃO DE SANGUE

B.1 - A doação de sangue deve ser voluntária, anônima, altruista e não remunerada, direta ou indiretamente. Por anonimato da doação entende-se a garantia de que nem os receptores saibam de qual doador veio o sangue que ele recebeu e nem os doadores saibam o nome do paciente que foi transfundido com componentes obtidos a partir da sua doação, exceto em situações tecnicamente justificadas.

B.2 - O sigilo das informações prestadas pelo doador antes, durante e depois do processo de doação de sangue deve ser absolutamente preservado.

B.3 -- Todo candidato à doação de sangue deve assinar um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual declara expressamente consentir em doar o seu sangue para utilização em qualquer paciente que dele necessite e consentir, também, na realização de todos os testes de laboratório exigidos pelas leis e normas técnicas vigentes. O doador deve, ainda, consentir que o seu nome seja incorporado a um arquivo de doadores potenciais, se for o caso.

Deve constar do termo de consentimento a autorização para que o seu sangue, quando não utilizado em transfusão, possa ser utilizado em produção de insumos e hemoderivados, autorizados legalmente.

Antes que o candidato assine esse termo, devem ser-lhe prestadas informações, com linguagem compreensível, sobre as características do processo de doação, os riscos associados ao mesmo, os testes que serão realizados em seu sangue para detectar doenças infecciosas e a possibilidade da ocorrência de resultados falsos-positivos nesses testes de triagem.

Deve ser oferecida ao candidato à doação a oportunidade de fazer todas as perguntas que julgar necessárias para esclarecer suas dúvidas a respeito do procedimento e de negar seu consentimento, se assim lhe aprouver.

**B.4** -- É obrigatório que seja entregue, ao candidato à doação, material informativo sobre as condições básicas para a doação e sobre as doenças transmissíveis pelo sangue.

Este material deve também mostrar ao candidato a importância de suas respostas na triagem clínica e os riscos de transmissão de enfermidades infecciosas pelas transfusões de sangue e componentes.

#### **B.5 - Critérios para a seleção dos doadores**

No dia da doação, sob supervisão médica, um profissional de saúde de nível superior, qualificado, capacitado e conhecedor destas normas, avaliará os antecedentes e o estado atual do candidato a doador, para determinar se a coleta pode ser realizada sem causar-lhe prejuízo, e se a transfusão dos hemocomponentes preparados a partir desta doação pode vir a causar problemas nos receptores. Esta avaliação deve ser feita por meio de entrevista individual, em ambiente que garanta a privacidade e o sigilo das informações prestadas.

##### **B.5.1 - Critérios que visam a proteção do doador**

###### **B.5.1.1 - Idade**

O doador de sangue ou componentes deve ter idade de, no mínimo, 18 anos completos e, no máximo, 65 anos 11 meses e 29 dias.

O candidato cuja idade não esteja dentro destes limites só pode ser aceito em circunstâncias especiais. Para esta aceitação, deve ser previamente avaliado por um médico do serviço; caso este concorde com a doação deve fazer uma justificativa escrita, que deve ser anexada à ficha do doador.

No caso de doador com idade inferior a 18 anos, deve ser exigida ainda uma autorização escrita do responsável legal pelo menor.

###### **B.5.1.2 - Freqüência e intervalo entre as doações**

Exceto em circunstâncias especiais, que devem ser avaliadas e aprovadas pelo responsável técnico, a freqüência máxima admitida é de 4 (quatro) doações anuais, para os homens, e de 3 (três) doações anuais, para as mulheres.

O intervalo mínimo entre duas doações deve ser de 2 (dois) meses, para os homens, e de 3 (três) meses, para as mulheres, respeitados os limites descritos no parágrafo anterior.

Em caso de doador autólogo, a freqüência das doações pode ser programada de acordo com o protocolo aprovado pelo responsável técnico pelo serviço.

###### **B.5.1.3 - Doenças atuais ou anteriores**

Candidatos com doença hematológica, cardíaca, renal, pulmonar, hepática, auto-imune, diabetes tipo I, diabetes tipo II com lesão vascular, hipertireoidismo, hanseníase, tuberculose, câncer, sangramento anormal, convulsão após os dois anos de idade, epilepsia, ou que informem outras doenças, devem ser convenientemente avaliados e podem ser excluídos temporária ou definitivamente da doação.

###### **B.5.1.4 - Medicamentos**

A história terapêutica recente deve merecer avaliação especial por parte de um médico, uma vez que tanto a indicação do tratamento, assim como o próprio tratamento, pode motivar a rejeição do candidato à doação. Cada medicamento deve ser avaliado individualmente e em conjunto, e registrado na ficha de triagem, sempre que possa apresentar alguma correlação com a doação de sangue.

A lista detalhada de medicamentos que contra-indicam a doação ou exigem cuidados especiais, está descrita no Anexo III.

**B.5.1.4.1** - A ingestão do ácido acetilsalicílico (aspirina) dentro de 5 dias anteriores à doação exclui a preparação de plaquetas a partir desta doação, mas não implica na rejeição do candidato.

###### **B.5.1.5 - Anemia**

Devem ser determinados a concentração de hemoglobina ou o hematócrito, em amostra de sangue do candidato à doação obtida por punção digital ou por venopunção. A concentração de hemoglobina não deve ser inferior a 12,5 g/dL para as mulheres e o hematócrito não deve ser menor que 38%. Para os homens, estes limites são de 13,0 g/dL e 39%, respectivamente.

#### B.5.1.6 - Pulso

O pulso deve apresentar características normais, ser regular, e a sua freqüência não deve ser menor que 60 nem maior que 100 batimentos por minuto.

A aceitação de doadores com freqüências fora destes limites dependerá de avaliação médica.

#### B.5.1.7 - Pressão arterial

A pressão sistólica não deve ser maior que 180 mmHg e nem inferior a 90 mmHg, e a pressão diastólica não deve ser menor que 60 mmHg nem maior que 100 mmHg.

Os candidatos à doação com pressão arterial não compreendida dentro dos valores mencionados só podem ser aceitos após avaliação e aprovação de médico do serviço de hemoterapia.

#### B.5.1.8 - Gravidez e menstruação

As candidatas à doação que estiverem grávidas devem ser impedidas de doar. Este impedimento se mantém até 12 semanas após o parto. Em caso de doença hemolítica peri-natal, em que não seja possível encontrar sangue compatível para a transfusão do recém-nascido, a mãe pode ser autorizada a realizar a doação de sangue, desde que haja consentimento escrito do hemoterapeuta e do médico obstetra.

A candidata deve ser excluída por 12 semanas após um abortamento.

Não podem ser aceitas como doadoras as mulheres em período de lactação, a menos que o parto tenha ocorrido há mais de 12 meses.

A doação autóloga de gestantes pode ser aceita se contar com a aprovação do obstetra da gestante e do médico do serviço de hemoterapia.

A menstruação não contra-indica a doação. A hipermenorréia, ou outras patologias da menstruação, deve ser avaliada pelo médico.

#### B.5.1.9 - Peso

O peso mínimo para um candidato ser aceito para a doação é de 50 kg. Indivíduos com peso abaixo deste limite podem ser aceitos, após avaliação médica, desde que a quantidade de anticoagulante na bolsa de coleta seja proporcional ao volume a ser coletado.

Não devem ser aceitos como doadores os candidatos que refiram perda de peso inexplicável e superior a 10% do peso corporal, nos três meses que antecedem a doação.

#### B.5.1.10 - Volume a ser coletado

O volume de sangue total a ser coletado não pode exceder 8 ml/kg de peso para as mulheres e 9 ml/kg de peso para os homens. O volume admitido por doação é de 450 ml  $\pm$  50 ml, aos quais podem ser acrescidos até 30 ml para a realização dos exames laboratoriais exigidos pelas leis e normas técnicas.

#### B.5.1.11 - Jejum e alimentação

Não deve ser colhido sangue de candidatos que estejam em jejum prolongado. Como é comum aos candidatos à doação comparecerem em jejum, o serviço deve oferecer um pequeno lanche antes da doação para os candidatos que estejam em jejum e que não tenham nenhum outro motivo para serem considerados inaptos.

Não deve ser coletado sangue de candidatos que tenham feito refeição copiosa e rica em substâncias gordurosas ou que tenham ingerido bebida alcoólica há menos de 4 (quatro) horas.

Após a doação, é obrigatória a oferta de lanche e hidratação oral adequada ao doador.

Deve-se recomendar ao doador que permaneça, pelo menos, 15 minutos no serviço após a doação.

#### B.5.1.12 Alcoolismo

Qualquer evidência de alcoolismo agudo ou crônico é causa de rejeição. O alcoolismo agudo contra-indica a doação por 12 horas. O alcoolismo crônico é causa de inaptidão definitiva.



#### B.5.1.13 - Alergia

O doador alérgico somente será aceito se estiver assintomático no momento da doação. São inaptos definitivos aqueles que padecem de enfermidades atópicas graves, como por exemplo, asma brônquica grave.

Os tratamentos dessensibilizantes devem postergar a doação por até 72 horas depois da última aplicação.

#### B.5.1.14 - Atividades

Não devem ser aceitos para doação candidatos que não tenham condições de interromper, por pelo menos 12 horas após a doação, atividades que apresentem risco para si e para outros. Entre as atividades consideradas de risco estão: pilotar avião ou helicóptero, conduzir ônibus ou caminhões de grande porte, subir em andaimes e praticar pára-quedismo ou mergulho.

#### B.5.2 - Critérios que visam a proteção do receptor

##### B.5.2.1 - Aspecto geral

O doador deve ter aspecto saudável e manifestar sentir-se bem.

##### B.5.2.2 - Temperatura

A temperatura axilar não deve ser superior a 37 °C.

##### B.5.2.3 - Imunizações e vacinações

A inabilitação dos candidatos para a doação depende de cada tipo de vacina.

##### B.5.2.4 - Local da punção venosa

A pele do doador na área da punção venosa deve estar livre de lesões.

##### B.5.2.5 - Transfusões

Os candidatos que tenham recebido transfusões de sangue, componentes sanguíneos ou hemoderivados nos últimos 12 meses devem ser excluídos da doação.

##### B.5.2.6 - Doenças Infecciosas

O doador potencial não deve apresentar nenhuma enfermidade infecciosa aguda, nem deve ter antecedentes de doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue.

##### B.5.2.6.1 - Enfermidades virais

Não podem ser aceitos como doadores os candidatos que estejam gripados, ou que tenham tido sintomas de gripe nos 7 (sete) dias anteriores à doação.

São definitivamente inaptas para a doação de sangue as pessoas que:

- tenham antecedentes de hepatite viral após os 10 anos de idade.
- tenham antecedentes clínicos, ou de laboratório, ou história atual de infecção pelos vírus HBV, HCV, HIV ou HTLV.

##### B.5.2.6.2 - Paludismo (malária)

A inabilitação para o ato de doar sangue deve ocorrer segundo os critérios estabelecidos a partir da incidência da doença no local, usando-se como critério de referência o índice parasitário anual - IPA - fornecido por órgão oficial.

##### a) Em áreas endêmicas

##### Antecedentes de malária

Rejeitar o candidato que tenha tido malária nos 12 meses que antecedem a doação;

Rejeitar o candidato com febre ou suspeita de malária nos últimos 30 dias.

##### Deslocamento para área de risco

Rejeitar o candidato procedente de área de alto risco de malária de acordo com o IPA;

Aceitar os candidatos procedentes de área de médio e baixo risco, e submetê-los a teste parasitológico.

Residência em área de malária

Rejeitar o candidato com residência em área de alto risco pelo IPA. Será considerado apto quando o IPA permitir;

Aceitar os candidatos que residem em área de médio e baixo risco e submetê-los a teste parasitológico.

b) Em áreas não endêmicas

Excluir candidatos que, nos últimos 06 (seis) meses, estiveram em área endêmica com transmissão ativa;

Excluir candidatos que, nos últimos 03 (três) anos, tiveram malária ou que residiram em áreas endêmicas.

c) Em áreas endêmicas ou não endêmicas

Excluir, definitivamente, candidatos que tiveram infecção por *Plasmodium malariae* (Febre Quartã).

#### B.5.2.6.3 - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

Todos os doadores devem ser interrogados sobre situações ou comportamento de risco acrescido para a infecção pelo HIV, devendo ser excluídos quem os apresentar.

O interrogatório do doador deve incluir perguntas vinculadas aos sintomas e sinais da AIDS e sarcoma de Kaposi.

#### B.5.2.6.4 - Doença de Chagas

Os candidatos com história de terem sido picados por Triatomíneo ou com diagnóstico clínico ou laboratorial de doença de Chagas, devem ser excluídos de forma permanente.

#### B.5.2.6.5 - Doença de Creutzfeldt-Jakob (Encefalopatia Espongiforme Humana e suas variantes)

Serão definitivamente excluídos como doadores as pessoas que se enquadrem em uma das situações abaixo:

- Tenham recebido hormônio de crescimento ou outros medicamentos de origem hipofisária;
- Tenham recebido transplante de córnea ou implante de material biológico à base de dura-máter;
- Tenham história familiar de Encefalopatia Espongiforme Humana;
- Tenham permanecido no Reino Unido por mais de seis meses, consecutivos ou intermitentes, de forma cumulativa, de 10 de janeiro de 1980 a 31 de dezembro de 1996 ou por 10 ou mais anos, consecutivos ou intermitentes, de forma cumulativa, em Portugal, França e República da Irlanda desde 1980.

#### B.5.2.6.6 - Enfermidades bacterianas

Os doadores portadores de enfermidades bacterianas agudas serão excluídos temporariamente, até a cura definitiva.

#### B.5.2.7 Estilo de vida

##### B.5.2.7.1 - Uso de drogas ilícitas

História atual ou pregressa de uso de drogas injetáveis ilícitas é contra-indicação definitiva para a doação de sangue. Deverão ser inspecionados ambos os braços dos candidatos à doação para detectar evidências de uso repetido de drogas parenterais ilícitas. A presença destes sinais determina a rejeição definitiva do doador.

O uso de cocaína por via nasal (inalação) é causa de exclusão da doação por um período de 12 meses, contados a partir da data da última utilização.

A evidência de uso de qualquer outro tipo de droga deve ser avaliada.

#### B.5.2.7.2 - Situações de Risco Acrescido

- a) Serão inabilitados de forma permanente como doadores de sangue os candidatos que tenham evidências clínicas ou laboratoriais de doenças infecciosas que sejam transmitidas por transfusão sanguínea.
- b) Serão inabilitados de forma permanente os candidatos que tenham doado a única unidade de sangue transfundida em um paciente que tenha apresentado soroconversão para hepatite B ou C, HIV, ou HTLV, sem ter qualquer outra causa provável para a infecção.
- c) Serão inabilitados por 12 meses após a cura, os candidatos a doador que tiveram alguma Doença Sexualmente Transmissível - DST.
- d) Serão inabilitados por um ano, como doadores de sangue ou hemocomponentes, os candidatos que nos 12 meses precedentes tenham sido expostos a uma das situações abaixo:

Homens e ou mulheres que tenham feito sexo em troca de dinheiro ou de drogas, e os parceiros sexuais destas pessoas.

Pessoas que tenham feito sexo com um ou mais parceiros ocasionais ou desconhecidos, sem uso do preservativo.

Pessoas que foram vítimas de estupro.

Homens que tiveram relações sexuais com outros homens e ou as parceiras sexuais destes.

Homens ou mulheres que tenham tido relação sexual com pessoa com exame reagente para anti-HIV, portador de hepatite B, Hepatite C ou outra infecção de transmissão sexual e sanguínea.

Pessoas que estiveram detidas por mais de 24 horas em instituição carcerária ou policial.

Pessoas que tenham realizado "piercing" ou tatuagem sem condições de avaliação quanto à segurança.

Pessoas que tenham apresentado exposição não estéril a sangue ou outro material de risco biológico;

Pessoas que sejam parceiros sexuais de hemodialisados e de pacientes com história de transfusão sanguínea;

Pessoas que tiveram acidente com material biológico e em consequência apresentaram contato de mucosa e ou pele com o referido material biológico.

#### B.5.2.8 - Cirurgias

Os candidatos submetidos a cirurgias de grande porte devem ser rejeitados por 6 meses a 1 (um) ano; para cirurgias de pequeno e médio porte, a rejeição é de três meses e para extração dentária não complicada ou manipulação dentária, este prazo é de 72 horas.

## E - EXAMES DE QUALIFICAÇÃO NO SANGUE DO DOADOR

### E.1 - Exames Imunoematológicos

#### E.1.1 - Tipificação ABO

O grupo ABO deve ser determinado testando-se os glóbulos vermelhos com reagentes anti-A, anti-B e anti-A,B. Caso sejam usados anti-soros monoclonais, a utilização do soro anti-A,B não é obrigatória.

A tipagem reversa deve ser sempre realizada, testando-se o soro ou plasma com suspensão de glóbulos vermelhos conhecidos A<sub>1</sub> e B e, opcionalmente, A<sub>2</sub> e O.

Uma unidade de sangue não deve ser liberada para utilização até que qualquer discrepância entre a tipagem direta e reversa tenha sido resolvida.

#### E.1.2 - Determinação do fator Rh (D)

O fator Rh(D) deve ser determinado colocando-se os eritrócitos do paciente em contato com soro anti-Rh<sub>o</sub> (Anti-D); em paralelo, deve ser sempre efetuado um controle da tipagem Rh, utilizando-se para isto soro-controle de Rh do mesmo fabricante do soro anti-D.

Se a reação for negativa para a presença do antígeno D, deve ser efetuada técnica para a exclusão de D-fraco.

Quando a prova para D ou a prova para D-fraco resultar positiva, o sangue deve ser rotulado como "Rh positivo". Quando ambas as provas resultarem negativas o sangue deve ser rotulado como "Rh negativo".

Se a reação com o soro-controle de Rh for positiva, a tipagem Rh é considerada inválida, e a bolsa de sangue só deve ser liberada para uso após a resolução do problema.

#### E.1.3 - Resultados de tipificações prévias

O registro de uma tipagem ABO e Rh(D) prévia de um doador não serve para a identificação das unidades de sangue subsequentemente doadas pelo mesmo doador.

Novas determinações devem ser realizadas a cada coleta. Se tiver havido doação prévia, deve ser comparada a tipagem ABO e Rh (D) com o último registro disponível. Qualquer discrepância deve ser resolvida antes de se rotular a unidade de sangue.

#### E.1.4 - Provas para a detecção de anticorpos irregulares

Deve ser realizada nos doadores a pesquisa de anticorpos séricos irregulares, empregando-se métodos que evidenciem a presença de anticorpos clinicamente significativos.

As unidades de sangue que contenham anticorpos irregulares devem ser rotuladas como tais. As condições e situações nas quais estes componentes podem ser utilizados ficarão a critério do responsável técnico de cada local, sendo porém recomendável que o plasma não seja utilizado para transfusão.

#### E.1.5 - Controle de qualidade em imunohematologia

Os reativos devem ser armazenados de acordo com as instruções do fabricante, devendo ser evitada, ao máximo, a permanência do reativo fora das temperaturas indicadas para seu armazenamento.

O serviço deve realizar controles de qualidade em cada lote recebido para comprovar que os reativos estão dentro dos padrões estabelecidos e que não foram alterados durante o transporte.

Devem ser verificadas, periodicamente, possíveis alterações durante sua manipulação ou armazenamento no serviço de hemoterapia.

Os resultados dos controles devem ser registrados com nome do fabricante, o número do lote, a data de validade e o grau de reação obtido.

Devem ser estabelecidas medidas corretivas quando são detectadas anormalidades.

#### E.1.6 - Controle de qualidade das técnicas empregadas

Devem ser utilizados, sistematicamente, e durante o procedimento técnico, controles negativos e positivos, para confirmar os resultados obtidos.

## E.2 - Testes para Doenças Transmissíveis

### E.2.1 - Testes obrigatórios:

É obrigatória a realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade em todas as doações, para identificação das doenças transmissíveis pelo sangue.

Estes exames devem ser feitos em amostra colhida da doação do dia e ser testada com conjuntos diagnósticos (kits) registrados na ANVISA, em laboratórios específicos para tal fim.

Fica vedada a realização de exames em "pool" de amostras de sangue. Caso surjam novas tecnologias que tenham aplicação comprovada pela ANVISA para utilização em "pool" essa proibição será reconsiderada.

O sangue total e seus componentes não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais não reagentes, nos testes de detecção para:

Hepatite B

Hepatite C

HIV-1 e HIV-2

Doença de Chagas

Sífilis

HTLV-I e HTLV-II

O anexo VIII apresenta os algoritmos para testagem de cada uma das doenças acima.

### E.2.2 - Malária

Nas regiões endêmicas com transmissão ativa (alto risco, pelo Índice Parasitológico Anual - IPA), deve ser realizado o exame parasitológico/hematoscópico.

Em regiões endêmicas sem transmissão ativa recomenda-se o exame sorológico.

### E.2.3 - Citomegalovírus (CMV)

Deve ser efetuada uma sorologia para CMV em todas as unidades de sangue ou componentes destinados aos pacientes:

a) submetidos a transplantes de órgãos com sorologia para CMV não reagente;

b) recém-nascidos com peso inferior a 1.200g ao nascer, de mães CMV negativo ou com resultados sorológicos desconhecidos.

A realização dessa sorologia não é obrigatória, se for transfundido sangue desleucocitado nestes grupos de pacientes.

As bolsas CMV reagentes devem ser identificadas como tal.

## E.3 - Detecção de hemoglobinas anormais

É obrigatória a investigação de hemoglobina S e de outras hemoglobinas anormais nos doadores de sangue. Os componentes eritrocitários de doadores com pesquisa de hemoglobina S positiva devem conter esta informação no seu rótulo, mas não precisam ser descartados. Esses componentes não devem ser desleucocitados e nem utilizados em pacientes com hemoglobinopatias, em pacientes com acidose grave, em recém-nascidos, ou para a transfusão intra-uterina.

## ANEXO B – FICHA DE DOAÇÃO DE SANGUE (EPIDEMIOLÓGICA)



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ  
SECRETARIA DE SAÚDE



		FICHA DE DOAÇÃO DE SANGUE	Sequenc.	Data Emissão
--	--	---------------------------	----------	--------------

Reg. Internação	Beneficiário			
-----------------	--------------	--	--	--

Hospital	Motivo da doação
----------	------------------

Código Triagem	Tipagem Preliminar	Hemoglobina	Hematórito	Temperatura
	Pressão Arterial	Peso	Pulso	Altura

S	N	S	N
01. Atualmente se sente bem, tem boa saúde		19. Teve Hanseníase, Calazar, Leishmaniose?	
02. Ingeriu bebida alcoólica?		20. Tatuagem, acupuntura / furou a orelha, quando?	
03. Está de jejum? Está de vigília?		21. Gravidez? Puerpério? Amamentação? Aborto?	
04. Está gripado? Vírose?		22. Usa drogas? Etilista?	
05. Tomou algum medicamento?		23. Apresenta perda de peso / inguas no corpo?	
06. Fez tratamento dentário últimas 72 horas?		24. Diarréia, febre persistente ou sudorese?	
07. Tratamento médico anterior?		25. Mancha na pele / lesões na boca / genitais?	
08. Fez cirurgia, esteve hospitalizado?		26. Pratica sexo seguro?	
09. Recebeu transfusão de sangue? Quando?		27. Teve sifilis ou outras doenças venéreas?	
10. Tomou vacina recentemente? Quando? Quais?		28. Teve relação homossexual c/perc. Homo?	
11. Doenças cardiovasculares? Dor no peito?		29. Contato sexual c/prostituta, viciado em drogas?	
12. Tuberculose? Asma?		30. Você veio doar para fazer teste de AIDS?	
13. Hepatite? Icterícia? Contato Intimo?		31. Morou fora do Brasil? Onde? (Ano e Tempo)	
14. Malária: Área endêmica? Anti-malarico?			
15. Teve anemia? Sangramento anormal? Câncer?			
16. Já teve desmaio ou convulsão?			
17. Tem alergias? Reumatismo? Diabetes?			
18. Teve Chagas ou foi picado pelo barbeiro?			

Observ.:

	Resp. Triagem	Código	Assinatura
--	---------------	--------	------------

Avaliação ( ) AP ( ) RT ( ) RD	Mot. Rec.	Desc. Motivo de Recusa		1. ( ) Doação s/Transfusão 2. ( ) Coleta de Amostra 3. ( ) Doação p/ Transfusão
		Flebotom. Inic.	Assinatura	
Código da Bolsa		Braço Punctionado	Hora Inic. Coleta	Hora Term. Coleta
		Reações Adversas	Código da Amostra	

### ANEXO C – TERMO DE RESPONSABILIDADE

<b>Candidato</b>				
Sexo <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Data Nasc.	Nº Documento	Tipo Doc	Órg. Expedidor
Nome do Pai				
Nome da Mãe				
Endereço			Bairro	
Município		CEP	Telefone	
Município de Nascimento				Estado de Nasc.
Estado Civil <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> V	Co-habitante <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	Grau de Escolaridade	Cor da Pele <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> N	
Ocupação				

Estado Civil: C = Casado, D = Divorciado, S = Solteiro, V = Viúvo  
Cor da Pele: A = Amarela, B = Branca, M = Mulata, N = Negra

### TERMO DE RESPONSABILIDADE

Declaro que comprehendi as questões a mim formuladas e que as informações que eu prestei são verdadeiras, e desde que atendam aos requisitos para doação de sangue, permito que sejam retirados \_\_\_\_\_ ml de meu sangue para uso a critério do

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do Doador

## ANEXO D – APROVAÇÃO PELO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 112/04

Fortaleza, 29 de março de 2004

Protocolo n° 46/04

**Pesquisador responsável:** Paulo Germano de Carvalho

**Deptº./Serviço:** Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará/HEMOCE

**Título do Projeto:** "Estudo de infecção recente de HIV através de seguimento sorológico de doadores com o emprego de testes combinados antígeno/anticorpo em rotina de banco de sangue"

Levamos ao conhecimento de V.S. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de março de 2004.

Atenciosamente,

*Mirian Parente Montiro*

Dra. Mirian Parente Montiro  
Coordenadora Adjunta do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFSC/CE