

EMANUEL BORGES VITOR ANJOS

***ANÁLISES MOLECULARES DO VÍRUS HIV-1 EM
CANDIDATOS A DOADORES DE SANGUE DE
PERNAMBUCO COM TESTES SOROLÓGICOS
POSITIVOS E INCONCLUSIVOS PARA O HIV-1***

Campinas

2009

EMANUEL BORGES VITOR ANJOS

***ANÁLISES MOLECULARES DO VÍRUS HIV-1 EM
CANDIDATOS A DOADORES DE SANGUE DE
PERNAMBUCO COM TESTES SOROLÓGICOS
POSITIVOS E INCONCLUSIVOS PARA O HIV-1***

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

Campinas

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Anjos, Emanuel Borges Vitor

An58a Análises moleculares do vírus HIV-1 em candidatos a doadores de sangue de Pernambuco com testes sorológicos positivos e inconclusivos para o HIV-1 / Emanuel Borges Vitor Anjos. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. HIV-1. 2. Doadores de sangue. 3. Sorologia. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Epidemiologia molecular. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: “Molecular analysis of prospective blood donors from Pernambuco with positive serological tests and inconclusive for HIV-1”

Keywords: • Human immunodeficiency virus type I
• Blood donors
• Serology
• PCR
• Molecular epidemiology

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
Profa. Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves
Profa. Dra. Maria Patelli Juliani Souza

Data da defesa: 28-08-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Emanuel Borges Vitor Anjos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Sandra Costa

2. Prof^a. Dr^a. Maria Patelli Juliani Souza

Maria

3. Prof^a. Dr^a. Neiva Sellan Lopes Gonçales

Neiva Gonçales

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/08/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Manoel (im memoriam) e Terezinha,
por nunca medirem esforços para me ajudar,
incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida.
Pelo grande amor e por serem essenciais na minha
vida.*

*Ao meu irmão, Érico pelo incentivo e apoio em todos
os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Dra. Sandra Costa**, que admiro pela sua sabedoria, competência, dedicação e profissionalismo, atributos de preciosa contribuição à minha formação científica, por todo apoio, amizade e confiança demonstrados em todos os momentos.

A **Dr. Ana Cristina e Dra. Maria Iraci Valença**, pelo incentivo, disponibilidade em ajudar, apoio e amizade, demonstrados durante todas as etapas deste trabalho.

A **Dulcinéia e Paula**, pela disponibilidade em compartilhar conhecimentos e inestimável ajuda nas várias etapas deste trabalho. Pela amizade, paciência e carinho.

Às minha amigas, **Angélica, Renata e Cláudia**, pela amizade, carinho, companheirismo desde o início das nossas jornadas.

Às amigas do laboratório e que já deixaram o laboratório, **Cristiane, Camila, Tycha, Ketti, Michelli, Carol, Ana Maria, Beatriz, Rosana**, pela amizade, carinho, e auxílios técnicos e científicos na realização deste trabalho.

Às amigas do Hemope, **Betânia, Marília, Karine**, por serem sempre prestativas e dispostas a colaborar com o envio das amostras.

Aos meus amigos de Recife, **Antônio Roberto, Germano, Ageu, Felipe** que mesmo à distância me apoiaram e me incentivaram.

Aos meus amigos de todas as horas, **Marcos André e Mariana, Magnun e Dulcinéia**, pelo companheirismo e amizade verdadeira. Pelos conselhos e por sempre estarem presentes em todos os momentos.

Aos amigos **Mário e Carla** pela amizade e bons momentos compartilhados nesses últimos anos.

Aos companheiros de república “**Casa da Falcatrua**”, **Bruno Machado, Bruno César (Bixão), Guilherme (Bixinho), Lucas (Lukão) e Ronan**, por todos os momentos de falcatruas e regozijos vividos, e pelo incentivo dado nos raros momentos de silêncio (ho ho).

A **todos os meus familiares**, por todo carinho, amor e incentivo a mim dispensados.

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1.1: Estimativa da UNAIDS de número de adultos e crianças vivendo com HIV no ano de 2007 (Adaptação UNAIDS, 2007).....	16
Figura 1.2: Estrutura morfológica do HIV-1 (www.opusgay.org/HIV-DST.html).....	17
Figura 1.3: Organização genômica do HIV-1.....	17
Figura 1.4: Representação esquemática da gp120 do HIV-1 mostrando as regiões conservadas (C1-C5) e as regiões variáveis (V1-V5). (Adaptado de Leonard et al., 1990).....	18
Figura 1.5: Representação esquemática simplificada da partícula viral, do ciclo de vida do HIV na célula do hospedeiro e imagem de microscopia eletrônica. (Adaptação de Simon & Ho, 2003).....	20
Figura 1.6: Árvores filogenéticas de amostras representativas dos subtipos do grupo M inferidas utilizando os genes <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i> separadamente (Robertson et al., 1999).....	23
Figura 1.7: Distribuição regional dos subtipos e recombinantes do HIV (Adaptado de Hamelaar et al., 2006).....	26
Figura 1.8: História natural da infecção pelo HIV-1. (Adaptação de Poignard et al., 1996).....	31

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: Primer locations and their sequence in the HIV-1 genome.....	48
Tabela 2: Distribution of donors according to gender, age and type of donation.....	50

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1- O HIV.....	13
1.2 - Descoberta do HIV.....	14
1.3 - Epidemia da AIDS.....	15
1.4 - Estrutura e Genoma do HIV.....	16
1.5 - Ciclo de Replicação do HIV.....	19
1.6 - Modo de Transmissão do HIV.....	21
1.7 - Classificação do HIV.....	22
1.8 - Epidemiologia do HIV.....	24
1.9 - Aspectos Clínicos e Imunológicos do HIV.....	28
1.10 - HIV e Hemoterapia.....	31
1.10.1 - Testes Laboratoriais.....	31
1.10.2 - Diagnóstico da Infecção pelo HIV-1.....	36
1.11 – Justificativa.....	38
2. OBJETIVOS.....	40
4. CAPÍTULO 1.....	42
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7. ANEXO.....	79

RESUMO

A infecção pelo HIV está entre as principais causas de inaptidão definitiva para doação de sangue. A dinâmica natural da epidemia do HIV no Brasil levou-nos a avaliar os subtipos presentes do HIV-1 em doações de sangue com infecção pelo HIV. Doadores de sangue representam um amplo e melhor corte transversal da população do que em grupos selecionados de alto risco e, portanto, podem fornecer uma visão mais ampla das cepas circulantes do HIV-1 no Brasil. Os números de indivíduos infectados e a importância da infecção pelo HIV tornam esse vírus um importante problema de saúde pública no Brasil. O objetivo deste trabalho é estudar a epidemiologia molecular do HIV-1 em candidatos a doadores de sangue da Fundação Hemope (Pernambuco), a partir da confirmação da infecção pelo HIV-1 de doadores com status sorológico positivo ou indeterminados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Também avaliar a co-infecção do HIV-1 com outros patógenos que são avaliados na triagem sorológica. Dos 328 doadores de sangue com sorologia positiva ou inconclusiva coletados, foram confirmados 46 (14,02%) como positivos para HIV. Destas 46 amostras, foi possível realizar a subtipagem do HIV-1 em 40 amostras, sendo 35 (87,50%) amostras do subtipo B, 4 (10%) do subtipo C e 1 (2,50%) da forma recombinante CRF02_AG. Investigação por métodos moleculares indica ser decisiva na interpretação definitiva do diagnóstico para o HIV. Estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 junto com o entendimento de sua biologia são necessários para estudar a dinâmica da infecção e para guiar políticas sanitárias para controlar a expansão do vírus e reduzir a incidência mundial da AIDS.

ABSTRACT

HIV infection is among the leading causes of permanent disability for donation of blood. The natural dynamics of the HIV epidemic in Brazil has led us to evaluate the present subtypes of HIV-1 in blood donations with HIV infection. Blood donors represent a wide cross section of the population than selected groups of high risk and therefore may provide a broader view of circulating strains of HIV-1 in Brazil. The numbers of infected individuals and the importance of HIV infection make this virus an important public health problem in Brazil. The objective of this work is to study the molecular epidemiology of HIV-1 candidate in the blood donors of the Foundation Hemope (Pernambuco), from the confirmation of HIV-1 serological status of donors with positive or indeterminate by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Also assess co-infection of HIV-1 with other pathogens that are evaluated in serological screening. Of the 328 blood donors with positive serology or inconclusive collected, 46 were confirmed (14.02%) as positive for HIV. Of these 46 samples, it was possible to subtyping of HIV-1 in 40 samples, and 35 (87.50%) samples of subtype B, 4 (10%) of subtype C and 1 (2.50%) of the form recombinant CRF02_AG. Research shows by molecular methods be decisive in the interpretation of the final diagnosis for HIV. Studies of molecular epidemiology of HIV-1 with the understanding of its biology are needed to study the dynamics of infection and to guide health policies to control the spread of the virus and reduce the incidence of AIDS worldwide.

Introdução Geral

1.1. O HIV

O vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) é o agente etiológico da pandemia de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Barré-Sinoussi et al., 1983). Caracteriza-se pela presença um genoma constituído por duas fitas de RNA simples e da enzima Transcriptase Reversa, a qual exerce papel-chave da transcrição reversa (inversa) ou retrotranscrição do RNA em uma fita dupla de DNA. Este processo ocorre dentro da célula hospedeira, logo após a infecção e o DNA produzido irá incorporar-se ao DNA da célula, com o objetivo de reproduzir o vírus. Devido às altas taxas de erro da transcriptase reversa, à ausência de um sistema de correção desses erros, à dinâmica da replicação viral (Roberts et al., 1988), e à propriedade de replicação, o HIV é marcado por uma importante variabilidade genética. Isto faz com que praticamente cada partícula viral contenha um genoma diferente das demais. Essa taxa de variação é responsável pelo aparecimento de cepas virais com características biológicas diferentes (Simmonds et al., 1990) e de resistência à terapia antiretroviral (Coffin et al., 1995). Ainda, esta grande variabilidade se constitui como um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina universal.

Dentro da família *Retroviridae*, o HIV pertence à subfamília *lentivirinae*, que é caracterizada, em geral, por infecção persistente crônica com desenvolvimento de danos progressivos ao sistema imune do hospedeiro e consequentes alterações patológicas nos estágios tardios da doença (Barré-Sinoussi et al., 1996).

As células utilizadas pelo HIV para infecção e replicação são as que apresentam o receptor de membrana CD4 (linfócitos T CD4⁺, monócitos / macrófagos, células dendríticas, células de Langherans e microgliais), o qual faz parte do processo de interação do vírus com a célula hospedeira (Cohen et al., 1999).

Desde a sua descoberta até os dias de hoje, em termos de doenças infecciosas, a pandemia da AIDS representa o maior desafio já enfrentado pela saúde pública (UNAIDS, 2007).

1.2. Descoberta do HIV

A sua descoberta clínica ocorreu entre o final de 1980 e o início de 1981, através de uma investigação realizada pelo Centro Norte-Americano para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 1981). O surgimento de pacientes com pneumonia por *Pneumocystis carinii*, associado ao aparecimento de casos de Sarcoma de Kaposi e à constatação de um padrão nos sinais clínicos encontrados levaram a classificação desse quadro como característico da AIDS. Alguns desses achados clínicos incluíam a baixa contagem de CD4⁺ (sugerindo que as células T poderiam ser o alvo da infecção), linfadenopatia e o aparecimento de outras doenças oportunistas.

O isolamento do vírus ocorreu apenas em 1983 (Gallo et al., 1983; Barré-Sinoussi et al., 1983) e só algum tempo depois, após novos isolamentos (Levy et al., 1984; Hahn et al., 1984) ele foi relacionado a outros membros da sub-família *Lentivirinae*, pertencente à família *Retroviridae*, como dito anteriormente, sendo esta a classificação atualmente aceita. Inicialmente, esse vírus foi denominado de HTLV-III (Human T-cells Lymphotropic Virus type III) por um grupo de pesquisadores norte-americanos e de LAV (Lymphadenopathy Virus) por um grupo de pesquisadores franceses. Posteriormente, o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus recomendou a denominação desse novo vírus como vírus da imunodeficiência humana, HIV (*Human Immunodeficiency Virus*).

Os lentivírus estão associados a uma gama de doenças crônicas em mamíferos, causando imunodeficiências, câncer, doenças neurológicas e linfáticas. Alguns exemplos são os vírus da imunodeficiência símia (SIV), felina (FIV) e bovina (BIV), da anemia infecciosa equina (EIAV), da artrite e encefalite caprina (CAEV) e o Maedi-Visna, que atinge os ovinos (OMVV). Em humanos são encontrados dois tipos de HIV, classificados como 1 e 2 (Cavallo e Cavallo, 1986). Essa distinção é feita em função de diferenças na organização do genoma e nas suas relações filogenéticas com outros lentivírus de primatas. Já foram identificados mais de 30 espécies de primatas africanos com SIV (Bibollet-Ruche et al., 2004), e esses parecem ser seus hospedeiros naturais, uma vez que animais infectados

não desenvolvem a doença. Cada SIV recebe uma denominação associada ao nome da espécie na qual foi isolado, por exemplo, SIV_{cpz} é o vírus encontrado em chimpanzés (*Pan troglodytes*) e SIV_{gor} é encontrado em gorilas (*Gorilla gorilla*). Diversos estudos filogenéticos associados à distribuição geográfica dos isolados concluíram que o HIV-1 se originou a partir do SIV_{cpz} (Gao et al., 1999; Keele et al., 2006), enquanto o HIV-2 é mais relacionado com o SIV_{sm}, que infecta *Cercocebus atys* (Hirsch et al., 1989).

1.3. Epidemia da AIDS

O início da epidemia de HIV / AIDS ocorreu há mais de 25 anos, juntamente com a descoberta do HIV-1. Estudos indicam que os primeiros casos surgiram na região oeste da África Equatorial (Travers et al., 2004) e o vírus disseminou-se pelo continente e pelo mundo todo. O rápido espalhamento de doenças infecciosas como a AIDS ficou muito facilitado desde o final do século passado devido ao aumento da morbidade e à grande interdependência e intercomunicação mundial (WHO, 2007). A pandemia de AIDS demonstrou falhas na capacidade de vigilância para monitorar o surgimento e espalhamento de novas doenças.

Considerando até dezembro de 2007, em seu boletim epidemiológico anual da AIDS (UNAIDS, 2007), a Organização Mundial da Saúde estimou que existem cerca de 33 milhões de indivíduos, entre crianças e adultos, infectados pelo o HIV (Figura 1.1), dos quais em torno de 23 milhões residem na África e cerca de 1,6 milhões vivem na América Latina. Aproximadamente um terço desses infectados vivem no Brasil. Segundo o último boletim epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde, estima-se que haja cerca de 507.000 casos confirmados no Brasil, e que São Paulo é o estado com o maior número de casos (aproximadamente 193.000). O estado com maior incidência é o Rio Grande do Sul, com uma taxa de 36,5 indivíduos infectados / 100.000 habitantes (MINISTERIO DA SAUDE, 2008). Nesta última avaliação, a UNAIDS concluiu que a prevalência da infecção, de uma maneira global, não tem sofrido alterações. Ocorreram reduções localizadas em alguns países, constatou-se a diminuição no número de mortes,

possivelmente devido à melhoria no acesso aos tratamentos, e um menor número de novos casos anuais. Ainda assim, o HIV infecta cerca de 6.800 pessoas por dia e leva a óbito mais de 5.700, e esses casos acontecem principalmente por falhas na prevenção e no tratamento da AIDS. Também foi constatada a formação de dois padrões diferentes na pandemia: na África subsaariana a epidemia atinge toda a população, e no resto do mundo ela se concentra principalmente nos chamados grupos de risco, como homossexuais, usuários de drogas injetáveis, doadores de sangue, profissionais do sexo e seus parceiros.



Figura 1.1: Estimativa da UNAIDS de número de adultos e crianças vivendo com HIV no ano de 2007 (Adaptação UNAIDS, 2007).

1.4. Estrutura e Genoma do HIV

O HIV é uma partícula constituída de uma camada lipídica ou envelope que envolve o nucleocapsídeo onde estão abrigadas as duas fitas simples de RNA. Sua estrutura tem o formato icosaédrico com 100 – 120 nm de diâmetro, e apresenta estruturas protuberantes na camada exterior – são as glicoproteínas do envelope (Figura 1.2). O genoma de RNA possui cerca de 10 kb de comprimento e é ocupado em grande parte pelos três genes estruturais: *gag* (grupo antígeno), *env* (envelope) e *pol* (polimerase), que são delimitados por duas partes regiões contendo sequencias repetitivas, denominadas longas sequencias

terminais repetidas (LTR – long terminal repeats), onde estão as principais sequências promotoras para a transcrição dos genes virais.

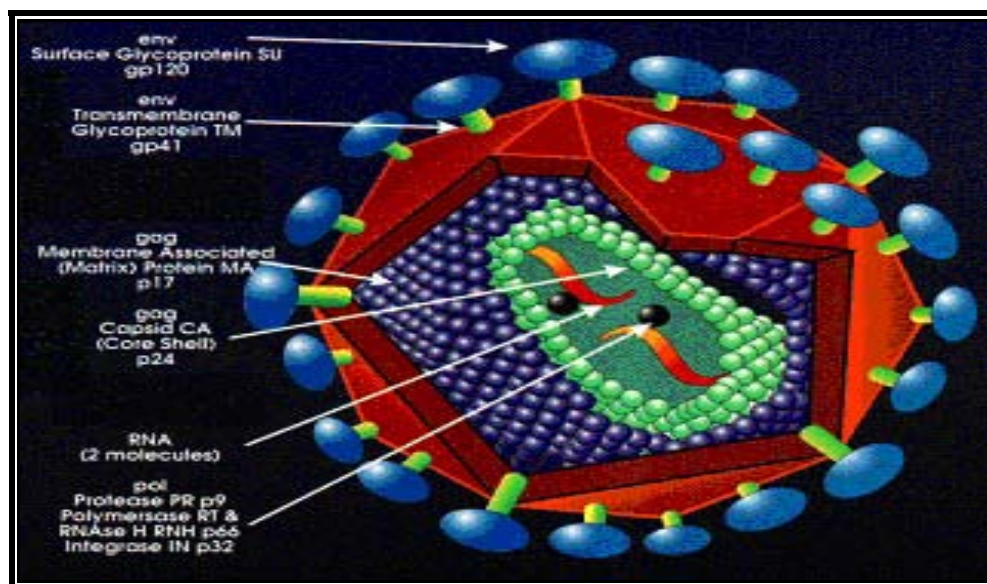


Figura 1.2. Estrutura morfológica do HIV-1 (www.opusgay.org/HIV-DST.html).

Há ainda, seis outros genes acessórios e regulatórios no genoma, sendo os cinco: *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef* comuns ao HIV-1 e ao HIV-2, e *vpu* e *vpx* para o HIV-1 e HIV-2, respectivamente (Zeichner et al., 1994).

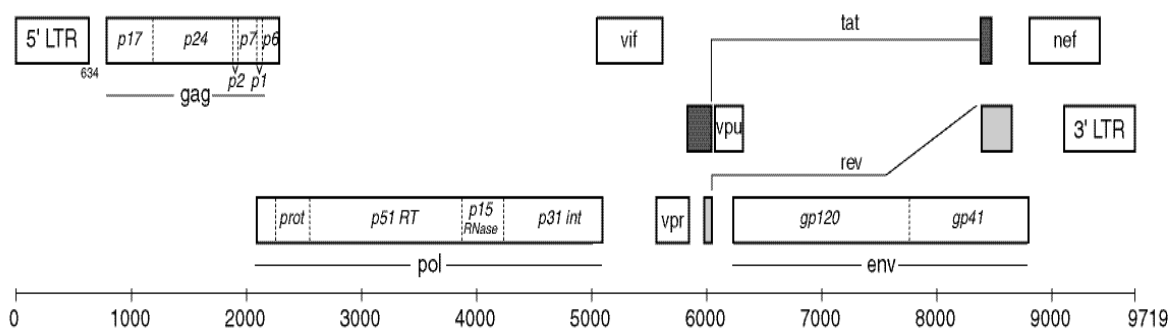


Figura 1.3. Organização genômica do HIV-1.

O envelope viral de natureza lipoproteica é derivado da membrana celular do hospedeiro e é formado por duas glicoproteínas extensivamente glicosiladas: gp120 e gp41 (Chan e Kim, 1998). A estrutura da gp120 apresenta cinco regiões variáveis (V1 - V5) intercaladas por cinco regiões conservadas (C1 - C5) (Starcich et al., 1986). Uma das regiões variáveis, designada V3, é formada por uma alça composta de 35 aminoácidos e unidas por pontes dissulfeto (Figura 1.4.). Essa região é imunodominante e contra ela são produzidos anticorpos neutralizantes (Goudsmit et al., 1988).

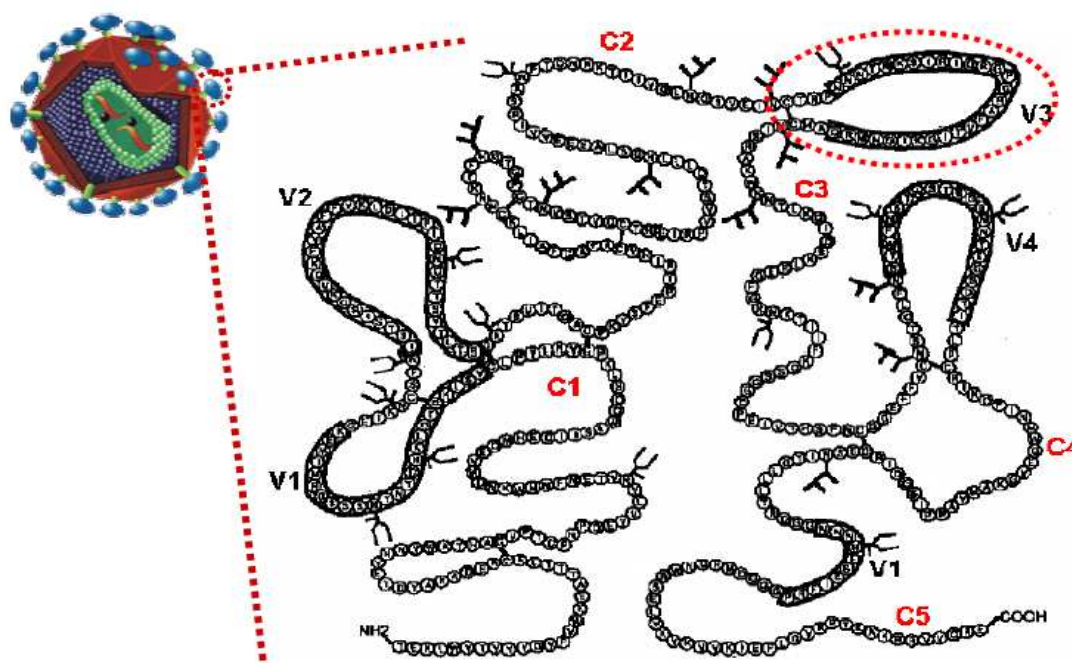


Figura 1.4. Representação esquemática da gp120 do HIV-1 mostrando as regiões conservadas (C1-C5) e as regiões variáveis (V1-V5). (Adaptado de Leonard et al., 1990).

Na superfície do vírus, as proteínas do envelope são estruturadas em complexos triméricos que promovem a ligação e fusão à membrana celular (Chan e Kim et al., 1998). A localização da gp120 é totalmente exterior e a gp41 tem localização transmembrânica. Ambas são produzidas a partir da clivagem de uma glicoproteína precursora, a gp160, codificada pelo gene *env*. Abaixo da bicamada lipídica está a proteína da matriz p17 (MA) que é codificada pelo gene *gag*. Além da p17, são codificadas também pelo gene *gag*, as proteínas: p24 (CA) que envolve o cerne (core) ou capsídeo viral, p7 (NC) e p6 que se

localizam no nucleocapsídeo. O gene *pol* codifica as enzimas envolvidas no processo de replicação e integração do genoma viral: protease (p11), transcriptase reversa (p66/p51) e integrase (p31). As proteínas dos genes *gag* e *pol* são traduzidas como precursores que devem ser clivados pela protease nas subunidades distintas (Zeichner et al., 1994). As longas regiões terminais repetitivas (LTR) não codificam proteínas, mas são essenciais para a regulação da expressão viral. Fatores transcricionais do hospedeiro e outros codificados pelo vírus ligam-se a regiões específicas da LTR e promovem a expressão dos genes do HIV (Greene e Peterlin, 2002). As regiões LTR contém regiões com sinais de poliadenilação (Kao et al., 1987), TATA Box, sequencias promotoras e sítios de ligação para dois fatores transcricionais: NFκB e SP1 (Karn et al., 1999). A proteína Tat (“trans-acting transcription transactivator”) é uma transativadora da transcrição do genoma viral e é essencial para replicação do HIV (Puglisi et al., 1992). A *vpr* participa do processo de transporte do complexo de pré-integração viral para o núcleo da célula hospedeira (Cohen et al., 1996) e *rev* está relacionada com o processo de exportação dos transcritos não processados do núcleo para o citoplasma (Hope et al., 1997). A proteína *nef* parece estar relacionada com a expressão de CD4 (Aiken et al., 1994) e das moléculas de HLA I e II (Collins et al., 1998) na superfície das células infectadas, o que pode representar um mecanismo de escape importante à ação das células T citotóxicas e para evitar o reconhecimento pelas células T CD4⁺. A proteína *nef* pode também interferir com a ativação das células T por ligação a várias proteínas que estão envolvidas nas vias intracelulares de transdução de sinal (Peter, 1998). A proteína *vpu* relaciona-se com a etapa de produção e brotamento das partículas virais e com a regulação negativa das moléculas CD4 pelas células infectadas (Klimkait et al., 1990; Schubert et al., 1996). A *vif* é importante para os mecanismos intracelulares de transporte dos componentes virais, além de se ligar ao inibidor antiviral APOBEC3G, o qual pertence a uma família de enzimas intracelulares que retiram o grupo amino, especificamente a citosina em uracila do RNA_m ou do DNA, resultando em um acúmulo de mutações G – para – A que levam a degradação do DNA viral. Ao formar um complexo com a APOBEC3G, a *vif* bloqueia a atividade inibitória da APOBEC3G (Mariani et al., 2003).

1.5. Ciclo de Replicação do HIV

Como todos os vírus, o HIV se reproduz utilizando a maquinaria genética da célula hospedeira. O ciclo de vida do HIV começa com a ligação da partícula viral à superfície da célula do hospedeiro, através da interação da proteína gp120 viral com o receptor de membrana CD4 (Figura 1.5). Esta ligação leva a mudanças conformacionais e à subsequente participação de uma das moléculas da família dos receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4 principalmente) no processo. A formação do resultante complexo ternário (gp120/CD4/receptor de quimiocina) resulta em uma segunda mudança na conformação das proteínas do envelope viral, levando a exposição do da gp41, que se ancora na membrana plasmática da célula através de um dos seus sítios hidrofóbicos (Ugolini et al., 1999; Greene e Peterlin, 2002). A eficiência de entrada do vírus na célula, provavelmente pela avidéz de ligação às moléculas de CD4 e do correceptor, parece estar diretamente relacionada com a adaptabilidade da partícula viral (Marozsan et al., 2005). Variações na eficiência de entrada são provavelmente consequência da grande variabilidade no gene do envelope que por sua vez está relacionada com fortes pressões seletivas do ambiente hospedeiro (Richman et al., 2003; Wei et al., 2003).

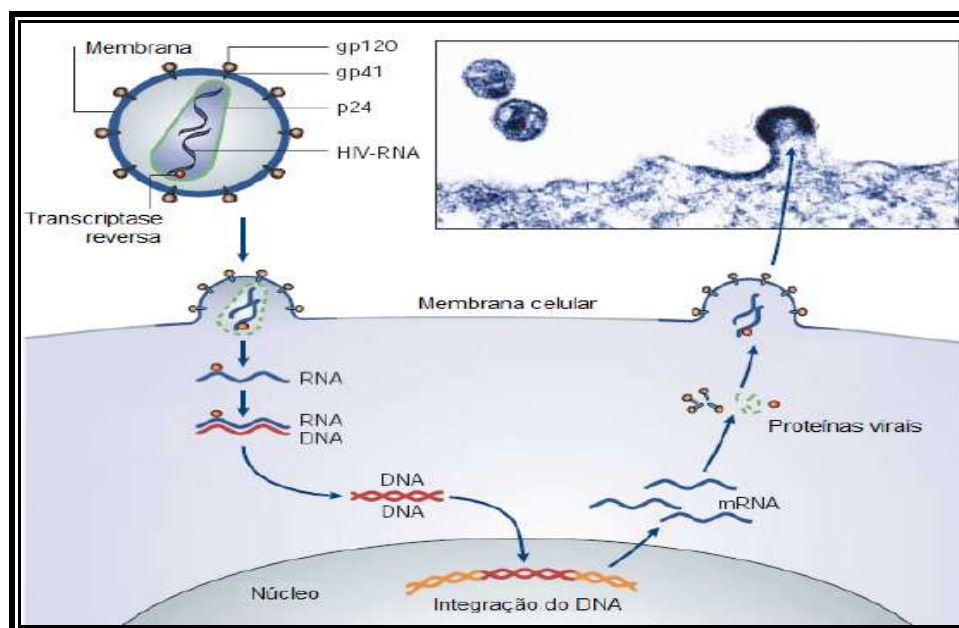


Figura 1.5. Representação esquemática simplificada da partícula viral, do ciclo de vida do HIV na célula do hospedeiro e imagem de microscopia eletrônica. (Adaptação de Simon e Ho, 2003).

Após a fusão, o capsídeo é então desencapado levando a liberação do seu conteúdo, o RNA genômico e as enzimas virais, no citoplasma celular. Em seguida, a enzima transcriptase reversa promove a síntese de uma molécula de DNA de fita dupla a partir do RNA viral (retrotranscrição). Esta recém-sintetizada molécula de DNA, juntamente com a enzima integrase, forma um complexo de pré-integração viral, o qual é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira. Através da atividade da integrase, ocorre a integração estável do cDNA viral no DNA cromossômico da célula, estabelecendo um provírus (Katz e Skalka, 1994). O provírus tem uma tendência de se manter no estado latente nos cromossomos da célula infectada sem produzir vírus até ser ativado por um determinado evento mitogênico. Esta capacidade de latência complica enormemente as tentativas de tratamento da infecção com drogas antiretrovirais. Quando a célula é ativada, através do uso da maquinaria biossintetizadora da célula e da regulação adicional pelas proteínas virais (Frankel e Young, 1998), o provírus é repetidamente transcrito. O conjunto de RNA's transcritos é então transportado ao citoplasma, onde será traduzido em suas proteínas (expressão das proteínas virais e as poliproteínas precursoras). As proteínas virais são clivadas pela ação das proteases migrando em seguida para os sítios de maturação, nas imediações da membrana plasmática, de onde brotam novas partículas virais capazes de infectar outras células e dar continuidade ao ciclo infeccioso.

1.6. Modos de Transmissão do HIV

Os mecanismos de transmissão reconhecidos para HIV –I incluem:

- Transmissão vertical, ou seja, da mãe para seu filho, no período pré-natal (via transplacentária) ou pós-natal (através do leite materno). Também pode ser transmitido durante o parto;
- Transmissão por contato sexual desprotegido.
- Contato direto com sangue e / ou hemoderivados:
 - Compartilhamento de agulhas (usuários de drogas injetáveis);
 - Transfusão de sangue e/ou hemoderivados;
 - Acidentes ocupacionais com material biológico contaminado (utensílios perfuro-cortantes).

1.7. Classificação do HIV

Uma importante característica do HIV, bem como dos retrovírus, é a sua grande diversidade genética. Isso ocorre, em grande parte, devido a erros gerados no momento da transcrição do RNA viral em cDNA. Como nessa etapa não existem mecanismos de correção nas incorporações errôneas dos nucleotídeos, essas mutações levam a produção de vírus diferentes do original. Algumas alterações podem acarretar geração de proteínas não-funcionais, inviabilizando o vírus. No entanto, outras podem gerar vírus aptos a infectar novas células e com diferenças que lhes permitem escapar da resposta já desenvolvida pelo sistema imune, podendo inclusive conferir resistência a medicamentos, dificultando o controle da infecção.

Foi essa variabilidade genética, associada ao grande potencial de recombinação viral, que permitiu o estabelecimento de um sistema de classificação que divide os vírus em grupos, subtipos, sub-subtipos e formas circulantes recombinantes (*circulant recombinant forms* - CRF) (Robertson et al., 1999). Essa divisão é feita em função de análises das relações filogenéticas dos diversos isolados.

O HIV-1 apresenta três grupos bem diversos entre si: M, N e O. Essa nomenclatura vem da inicial dos seguintes termos em inglês: *Main* que significa principal, *Outlier* que se refere a um grupo externo e *New* ou *Non-M – Non – O* (Simon et al., 1998) que são aqueles novos vírus que não se enquadram em nenhum dos dois grupos anteriores. Para classificação de um novo subtipo ou sub-subtipo os isolados devem se posicionar separadamente na análise filogenética, de forma equidistante em relação aos grupamentos já descritos. Para a descrição de um CRF, ficou estabelecido que é necessário o isolamento e sequenciamento, a partir de indivíduos não-ligados epidemiologicamente, de três genomas completos, preferencialmente, ou no mínimo dois completos e um parcial.

O grupo M é o que apresenta maior diversidade e distribuição geográfica, e análises filogenéticas dos seus componentes permitem a clara visualização de agrupamentos os quais são chamados de subtipos e são classificados como: A, B, C, D, F, G, H, J e K, dos

quais as sequências dos genes do envelope diferem entre si em cerca de 24% (Robertson *et al.*, 1999). Cada subtipo se apresenta filogeneticamente equidistante em relação aos demais subtipos e os seus componentes são mais próximos geneticamente entre si do que entre vírus de diferentes subtipos (Figura 1.6). Existem ainda sub-subtipos como: A1, A2 e A3, F1 e F2, que são agrupados por apresentarem um grau de diversidade dentro de cada um dos respectivos subtipos, porém não suficiente para serem considerados como um novo subtipo.

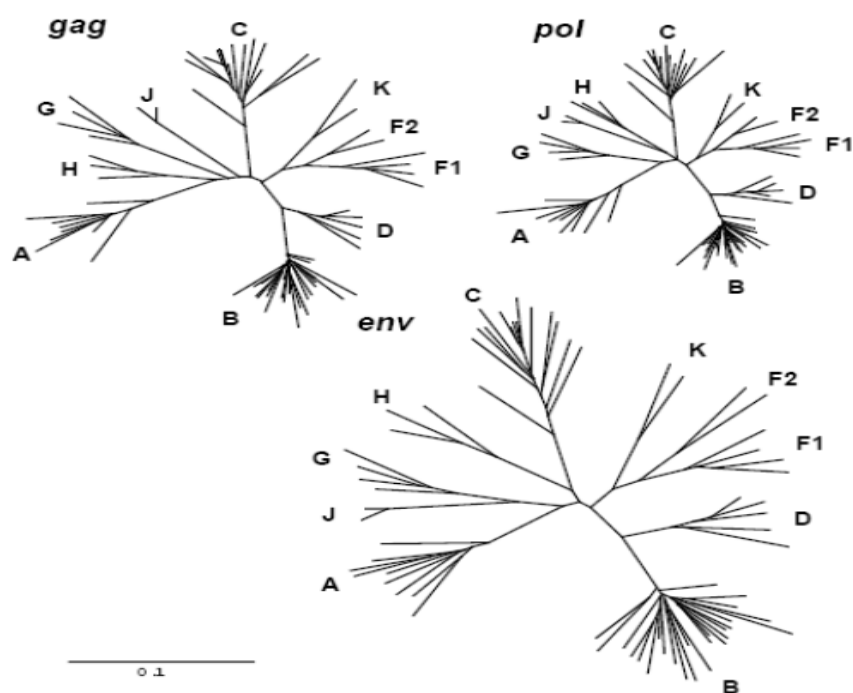


Figura 1.6. Árvores filogenéticas de amostras representativas dos subtipos do grupo M inferidas utilizando os genes *gag*, *pol* e *env* separadamente (Robertson *et al.*, 1999).

Como o genoma do HIV é composto por duas fitas simples de RNA, quando dois vírus de diferentes subtipos infectam a mesma célula é possível que ocorra o surgimento de mosaicos. Neste caso, na análise filogenética observamos que uma parte do genoma se agrupa com um subtipo enquanto outra se agrupa com outro. Quando esses recombinantes são isolados em somente um paciente ou em pacientes epidemiologicamente relacionados eles são chamados de formas recombinantes únicas (*unique recombinant forms* - URF). Mas quando eles passam a ser encontrados em casos não diretamente relacionados e

começam a apresentar importância epidemiológica na população são então chamados de CRF's. Quando um novo recombinante é caracterizado e reconhecido pela comunidade científica, ele recebe um número sequencial, determinado por uma comissão que controla essa classificação, seguido do nome dos subtipos que fazem parte da sua composição. Se ele for resultante da recombinação de mais de dois subtipos, no lugar das letras de denominação dos subtipos ele recebe "cpx", significado complexo. Até o presente momento já foram estabelecidos mais de 30 CRF's, alguns chegando a ser mais importantes epidemiologicamente em algumas regiões do que subtipos puros.

O grupo O, assim como o grupo M, apresenta uma grande diversidade, porém as análises filogenéticas não revelaram agrupamentos claros que permitissem a classificação dos seus membros em subtipos (Archer e Robertson, 2007). O grupo O diverge do grupo M em cerca de 50% das sequências de aminoácidos do gene *env* (Subbarao e Schochetman, 1996) e é prevalente na República dos Camarões, Gabão e Guiné Equatorial, na África (Gütler, 1996).

O grupo N apresenta menor dispersão, o que ainda impossibilita sua classificação em subtipos, tendo sido documentado em poucos indivíduos na República dos Camarões (Simon et al., 1998) e relacionado com o vírus da imunodeficiência símia deste país (Corbet et al., 2000).

Na medida em que aumenta a quantidade de isolados sequenciados, certamente surgirão relações mais complexas entre os diferentes subtipos, sub-subtipos e CRF's, uma vez que a classificação é sempre em relação às demais sequências.

1.8. Epidemiologia do HIV

Os dois tipos de HIV apresentam diferenças na sua história epidemiológica. Enquanto o tipo 1 se espalhou por todo o mundo gerando a pandemia da AIDS, o tipo 2 se manteve endêmico na região central da África (van der Loefen et al., 2006). Se analisarmos os diferentes grupos do HIV-1 também notaremos diferenças: os grupos O e N ficaram restritos às áreas onde foram inicialmente identificados e o grupo M apresenta uma grande diversidade e é encontrado no mundo todo.

Em um estudo no qual compararam isolados de HIV-2, do grupo O do HIV-1, e de vários subtipos do grupo M do HIV-1 e demonstraram que todas as amostras do grupo M apresentaram uma maior adaptabilidade (*fitness*), que significa uma maior capacidade reprodutiva e adaptativa de um organismo em ambiente, em relação aos demais. Ou seja, a própria natureza do HIV, associada a diferenças regionais relacionadas a fatores sociais e comportamentais, faz com que a distribuição geográfica dos diferentes subtipos seja um processo extremamente dinâmico ao longo do tempo (Ariën et al., 2005). Além disso, não existe uma proporcionalidade no número de isolados seqüenciados por país em relação ao número de infectados, o que pode distorcer as estatísticas.

Analisando a distribuição geográfica dos diferentes subtipos do HIV-1, observa-se que o subtipo C do HIV-1 é o mais prevalente no mundo todo, sendo responsável por mais de 50% das infecções (Hamelaar et al., 2006). Um dos fatores que levam a este alto valor é a sua área de ocorrência, que se concentra em regiões populosas e com altas taxas de infecção, como as regiões sul e Leste da África e a Índia (Figura 1.7), também tem sido observado um aumento de sua prevalência na China (na forma de CRF's BC) e no Brasil. O segundo subtipo mais encontrado é o A, que ocorre principalmente no Leste Europeu e na Ásia Central, seguido do subtipo B, que é o mais prevalente e o mais estudado, devido ao fato de predominar nas epidemias nas regiões com os melhores índices de desenvolvimento, como nos países da América do Norte, Europa e Austrália, embora seja também o principal subtipo encontrado na América Latina e no Caribe. Existem ainda recombinantes que predominam em determinadas regiões, como o CRF01_AE que é muito importante no Sudeste Asiático, em países como Tailândia, Indonésia, Vietnã, Malásia, Camboja, além do sul da China; e o CRF02_AG que ocorre no Oeste da África, em países como o Senegal, Guiné, Libéria, Gana, Mali, Niger, entre outros.

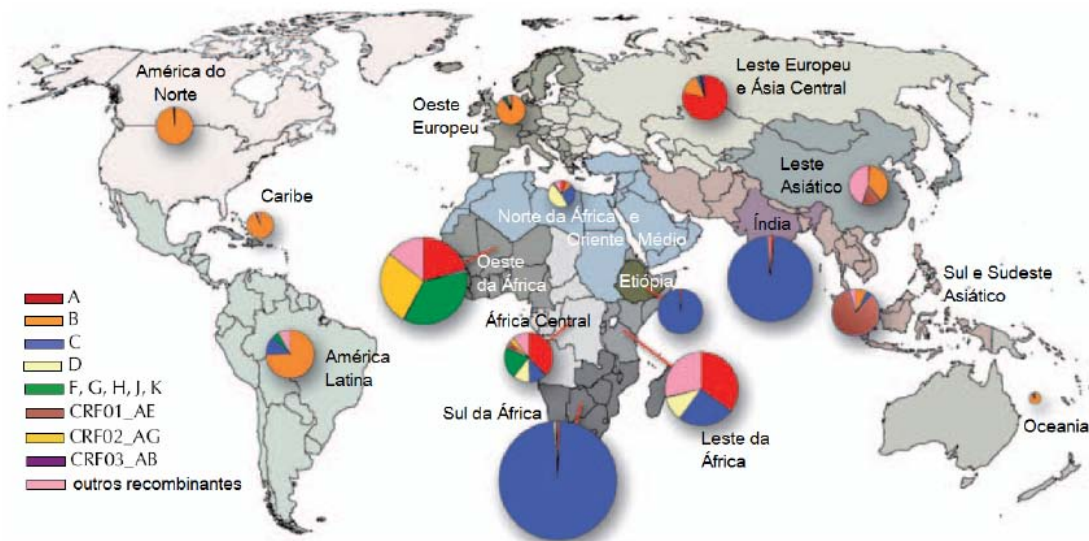


Figura 1.7. Distribuição regional dos subtipos e recombinantes do HIV (Adaptado de Hamelaar *et al.*, 2006).

Na América do Sul, em uma análise de amostras provenientes do Equador, Bolívia, Peru, Uruguai e Argentina, constatou-se que o subtipo B é o de maior predomínio nessa região, sendo seguido por recombinantes BF (Hierholzer *et al.*, 2002). Em um estudo mais abrangente na América Latina, analisando além dos países supracitados, Chile, Venezuela, Paraguai e Colômbia, observou-se uma prevalência semelhante à encontrada no estudo anterior, porém foram encontrados isolados do subtipo C (Carrion *et al.*, 2004).

O Brasil, por ser o maior país mais populoso da região e ter uma extensa área de fronteiras, apresenta notória importância epidemiológica em toda América do Sul. Devido à sua extensão territorial, as diferenças sociais, demográficas e culturais se refletem no perfil de distribuição dos subtipos do HIV-1 ao longo do seu território. No Brasil, estudos da epidemiologia molecular do HIV-1 mostraram clara predominância do subtipo B, com presença de subtipos adicionais como o subtipo F (Morgado *et al.*, 1994), o subtipo C (Bello *et al.*, 2008; Fontella *et al.*, 2008), além dos recombinantes BF e BC (Sabino *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2007). Diferente dos demais componentes da América do Sul, a epidemia brasileira apresenta diferenças no padrão de distribuição dos subtipos entre as regiões geográficas. Na região Norte, foram observadas proporções equivalentes dos subtipos B e F (Vicente *et al.*, 2000) enquanto na região Sudeste o subtipo

B predomina (aproximadamente 85%) seguido pelo subtipo F (cerca de 10 a 15%) (Morgado et al., 1998; Barreto et al., 2006) além dos registros de casos isolados do subtipo C (Couto-Fernandez et al., 2005). Nas regiões Nordeste (Cavalcanti et al., 2007) e Centro-Oeste (Stefani et al., 2007) foi observado uma clara predominância do subtipo B (cerca de 90 %) com casos de subtipo F e isolados casos de subtipo C. Entretanto, estudos recentes de epidemiologia molecular na região Sul do Brasil, tem demonstrado um padrão de distribuição dos subtipos contrastante com as demais regiões geográficas do Brasil, mostrando que a frequência do subtipo C tem aumentado significativamente, chegando a apresentar porcentagens similares ao subtipo B na região, além de recombinantes de ambos os subtipos (Soares et al., 2005; Santos et al., 2007; Locatelli et al., 2007).

Os subtipos do HIV-1 também apresentam dispersão diferenciada entre os diferentes grupos de risco e/ou modos de transmissão. Por exemplo, o subtipo B é predominantemente associado com epidemias ligadas a usuários de drogas injetáveis e pessoas com comportamentos homossexuais no mundo Ocidental, enquanto o subtipo C e a CRF01_AE estão relacionados com a transmissão heterossexual na Tailândia, Índia e África subsaariana (Weniger et al., 1994; Kunanusont et al., 1995; Burke & McCutchan, 1996). Uma observação que possivelmente está relacionada com estas características de epidemiologia molecular do HIV-1 é a replicação mais eficiente do subtipo C e da CRF01_AE em células de Langherans, importantes na transmissão heterossexual, comparados com o subtipo B (Soto-Ramirez et al., 1996). Entretanto, esta associação não foi confirmada em estudos posteriores (Ball et al., 2003; Arien et al., 2005).

Essa heterogeneidade na distribuição mundial dos subtipos do HIV-1, e o crescente surgimento e identificação de novos CRF's, reforçam a importância de pesquisas que elucidem os mecanismos de dispersão do vírus. Estudos detalhados das diferenças existentes entre os vírus, tanto no nível molecular como epidemiológico, e um acompanhamento de como a disseminação dos diferentes subtipos vem ocorrendo ao longo do tempo, podem facilitar esse entendimento e permitir, no futuro, a previsão dos rumos da epidemia. A disseminação global dos subtipos de HIV-1 é um processo dinâmico, e associações entre modos de transmissão e subtipos são provavelmente devido a eventos

históricos, como migrações, fatores sociais, comportamentais e econômicos associados provavelmente fatores biológicos do hospedeiro e virais. Essas informações são de extrema importância na tomada de decisão em relação a políticas de saúde pública, produção de medicamentos e estudos de vacinas.

1.9. Aspectos Clínicos e Imunológicos da Infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV ocorre através do contato de um indivíduo não-infectado com o sangue, sêmen ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectado. Aproximadamente de três a seis semanas após esse período, inicia-se a fase de infecção primária (Figura 1.8), caracterizada por altos índices de replicação viral (acima de 10^7 cópias de RNA/ml de plasma) e consequente disseminação do vírus para os linfonodos e sangue periférico. Como consequência, ocorre uma diminuição no número de linfócitos T $CD4^+$ (Pantaleo e Fauci, 1996). Estudos mostram que esta depleção de linfócitos T $CD4^+$ ocorre de forma mais acentuada na mucosa do trato gastrointestinal do que no sangue periférico durante a infecção primária pelo HIV-1 (Guadalupe et al., 2003; Mehandru et al., 2004). De fato, a mucosa gastrointestinal abriga a maioria dos linfócitos T presentes no organismo, enquanto o sangue periférico contém apenas entre 2% a 5% dos linfócitos totais (Smit-McBride et al., 1998). Além disso, comparando-se com os linfócitos circulantes, um maior percentual dos linfócitos T $CD4^+$ presentes na mucosa expressam o receptor de quimiocinas CCR5 o qual é utilizado preferencialmente durante a fase inicial da infecção (Connor et al., 1997). Assim, o trato gastrointestinal tem sido descrito como um reservatório viral persistente (Kotler et al., 1991; Nannini et al., 2002) e com um papel importante na patogênese do HIV-1, uma vez que é fortemente sugerido que os eventos virológicos e imunológicos durante a infecção aguda e inicial pelo HIV-1 tem um papel crucial na determinação da velocidade de progressão da doença (Mellors et al., 1996; Lafrere, 1998). Durante a fase de infecção primária, cerca de 50% a 70% dos indivíduos infectados desenvolvem uma síndrome clínica com sintomas que se assemelham aos de uma gripe e tem duração de uma ou mais semanas (Cohen et al., 1997). Em resposta à infecção, ocorre um aumento de significativo de células T $CD8^+$ no sangue periférico (Fauci, 1993), provavelmente, o

principal responsável pelo controle da viremia (Borrow et al., 1994; Pantaleo et al., 1994). Estas células, através da atividade citotóxica HIV - específica eliminam células infectadas, e através da produção de fatores solúveis contribuem para a supressão da replicação viral (Mackewicz et al., 1991). Nesse período, os testes para detecção de anticorpos normalmente não conseguem diagnosticar a infecção, pois, embora os títulos virais estejam altos, os níveis de anticorpos durante a fase aguda ainda são inexpressivos (Fauci, 1993) (Figura 1.8). O controle da viremia resulta então na resolução da síndrome aguda viral. Entretanto, é nessa fase que se formam os focos de células infectadas latentes que representam um dos potenciais mecanismos de escape da resposta imune e de medicamentos, além da persistência da infecção. Assim, embora ocorra uma dramática queda da viremia, a replicação viral não é totalmente controlada (Pantaleo e Fauci, 1996).

Após o período da infecção primária, inicia-se uma fase conhecida como latência clínica, quando todos os parâmetros virológicos se mantêm em níveis baixos ou indetectáveis, como consequência da resposta imune específica. Consequentemente ocorre uma recuperação do número de linfócitos T CD4⁺ que se mantém estável ou sofre um declínio gradual (Cohen et al., 1997); nesta fase, a maioria dos indivíduos infectados se mantém assintomáticos. Tanto a resposta celular como a resposta humoral HIV-específicas são detectadas em níveis elevados durante o período de latência clínica (Figura 1.8), entretanto, os níveis de replicação viral, embora baixos, não são totalmente controlados (Pantaleo & Fauci, 1996). Os mecanismos responsáveis pela habilidade do vírus de escapar dessas respostas ainda não são bem entendidos. Um fator que parece contribuir é a propensão do HIV em gerar sequencias variantes que podem não ser reconhecidas pelo sistema imune (Coffin et al., 1995). Existem alguns estudos demonstrando que cepas variantes podem resistir à neutralização por anticorpos ou não serem reconhecidas por linfócitos T citotóxicos induzidos por outra cepa viral (Arendrup et al., 1992; Bongertz et al., 1997; Borrow et al., 1997).

Após um período que varia de três a dez anos, como consequência do efeito citopático direto do vírus sobre as células infectadas e de mecanismos imunológicos que causam a destruição destas células, como a apoptose e a citotoxicidade, ocorre uma perda

considerável de células T CD4⁺, atingindo níveis inferiores a 200 células/ml, e a destruição da maioria do sistema linfóide no indivíduo infectado pelo HIV (Cohen et al., 1999). A resposta CTL HIV-específica é geralmente perdida e anticorpos neutralizantes são raramente detectados. Concomitantemente, ocorre um novo aumento da replicação viral culminando com o surgimento dos sintomas da AIDS. Portanto, esta síndrome se caracteriza por uma imunossupressão acentuada, tornando o indivíduo infectado suscetível a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (Coffin et al., 1995; Kahn et al., 1998).

A taxa de progressão para a fase de AIDS pode variar substancialmente entre os indivíduos infectados pelo HIV. Após a infecção, o balanço entre a capacidade do vírus de replicação e a eficiência da resposta imune do hospedeiro a este patógeno irá determinar as diferentes taxas de progressão (Pantaleo e Fauci, 1996). A maioria dos indivíduos infectados (70 a 80%) apresenta o perfil típico de progressão para a doença, que ocorre em 6 a 8 anos para atingi-la (Buchbinder et al., 1994). Entretanto, uma porcentagem dos indivíduos infectados pelo HIV (cerca de 10 a 15%) apresenta uma rápida progressão para a AIDS, de dois a três anos após a infecção primária, e são denominados rápidos progressores (Phair, 1994). Por outro lado, uma menor porcentagem permanece assintomática, com o número de células T CD4⁺ dentro dos limites normais e com níveis virológicos muito baixos, por um período de 8 a 10 anos após a infecção primária (Buchbinder et al., 1994; Phair, 1994).

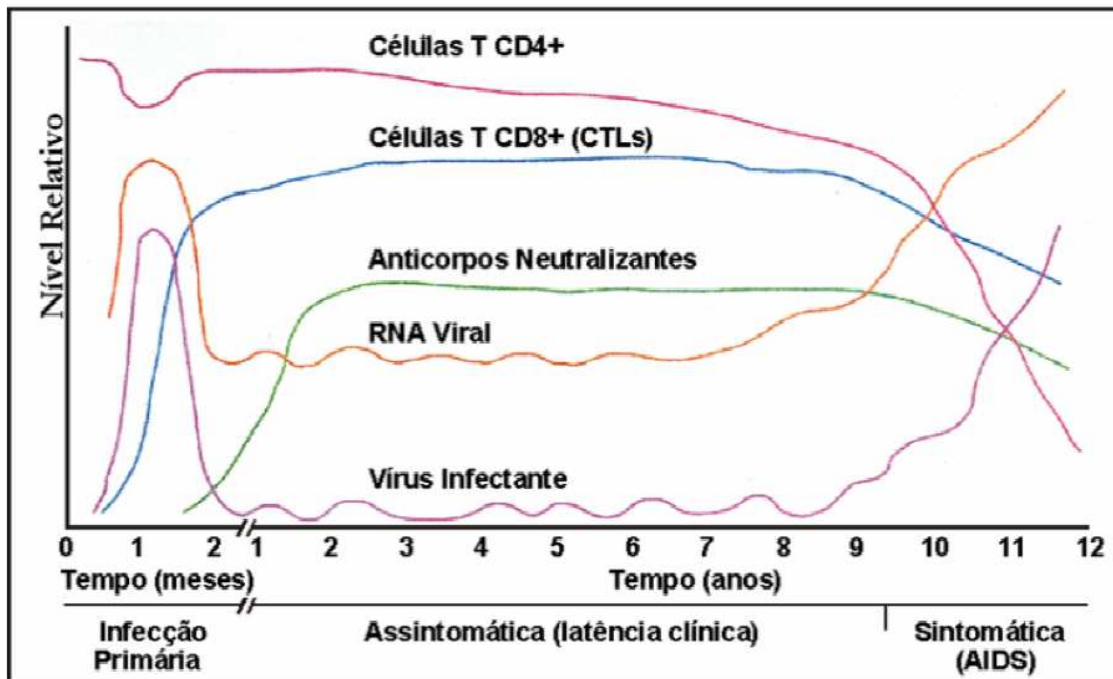


Figura 1.8. História natural da infecção pelo HIV-1. (Adaptação de Poignard et al., 1996).

1.10. HIV e Hemoterapia

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

Embora várias medidas sejam tomadas para garantir a segurança com o uso do sangue, estima-se que cerca de 5 % dos casos de AIDS no mundo ocorram através da transfusão sanguínea. (Wahdan, 1995; Germain e Goldman, 2002). O sangue é o meio mais eficiente na transmissão do HIV com uma frequência da soroconversão após a transfusão de doadores infectados acima de 90% (Donegan et al., 1990; Shrestha et al., 1996).

1.10.1. Testes laboratoriais

Os testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico do HIV na triagem de doadores de sangue são essenciais para o seguimento dos pacientes infectados e na vigilância epidemiológica da infecção e doença. As práticas realizadas nos serviços de hemoterapia são regulamentadas pelo Ministério da Saúde, através do Regulamento Técnico para obtenção, testagem, processamento e controle de qualidade do sangue e hemocomponentes para uso humano (RDC nº 153). O regulamento é fiscalizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2004).

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

Portanto, a segurança transfusional depende de uma série de fatores, que em conjunto podem proporcionar melhor qualidade do sangue e dos hemocomponentes a serem utilizados. Dentre esses fatores, os mais importantes são: a seleção da população de doadores, a triagem clínica, a realização de testes imunohematológicos, a triagem sorológica e o uso racional do sangue hemocomponentes (Kiely e Wood, 2005).

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

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

Os principais testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo HIV baseiam-se na pesquisa de anticorpos anti-HIV e antígenos virais (p24). São usados rotineiramente na identificação sorológica em bancos de sangue e em programas de testagem populacional. Duas categorias de testes são definidas: triagem e confirmatório. Os testes de triagem mais usados são os ensaios imunoenzimáticos (EIA). A comunicação de resultados positivos, no entanto, somente deve ser feita após realização de testes suplementares como o *Western blot* (WB) ou a imunofluorescência indireta (IFI). Mesmo após a realização de exames complementares, o médico deve providenciar a repetição dos testes em nova amostra a primeira vez que o paciente se submete ao teste, quando o resultado foi inconclusivo (indeterminado) ou na existência de qualquer outra razão que coloque em dúvida o resultado.

Os testes de anticorpos são altamente sensíveis e específicos, mas possuem baixos valores preditivos quando aplicados em populações com baixa incidência de infecção pelo HIV. Este fato é melhor entendido quando se considera uma população de indivíduos não infectados. Nesta população, quando um indivíduo sem risco para o HIV apresenta teste positivo, a probabilidade de se tratar de um teste falso-positivo é maior do que a frequência de infecções pelo HIV. Por este motivo existe a necessidade de testes complementares e confirmatórios, que são fundamentais para a distinção entre os falso-positivos e os positivos verdadeiros.

Testes Imunoenzimáticos.

Os testes imunoenzimáticos (EIA, ELISA) para a detecção de anticorpos anti-HIV são produzidos com antígenos virais purificados derivados da lise viral ou de antígenos recombinantes. Esses antígenos são adsorvidos nas cavidades de placas de poliestireno, formando a chamada “fase sólida” da reação. O soro do paciente é adicionado à fase sólida e, havendo anticorpos específicos, ocorrerá a reação antígeno-anticorpo. O anticorpo fixado é identificado por uma antiimunoglobulina anti-humana ligada a uma enzima. Na fase final da reação, é adicionado o substrato enzimático que, na presença da enzima, desenvolverá cor que será lida em espectrofotômetro. Valores de densidade ótica superiores ao valor médio dos controles negativos (*cut-off*) indicam positividade da reação.

A primeira geração de testes de HIV baseou-se na detecção de anticorpos contra proteínas virais do HIV. Estes ensaios utilizados na fase sólida revestidos com antígenos virais e anticorpos policlonais para imunoglobulina humana conjugada a uma enzima para a detecção de anticorpos específicos para o HIV.

Os ensaios de segunda geração utilizam antígenos do HIV recombinante em vez de lisado viral como fonte de antígeno na fase sólida e também incorporou antígeno recombinante de HIV-2. Esses ensaios tiveram uma melhora na especificidade, embora a sensibilidade global manteve-se similar aos ensaios de 1ª geração.

Os testes de ELISA de 3ª geração são amplamente usados em unidades hemoterápicas, tendo substituído os testes de ELISA de 1ª e 2ª geração. Há um limitado número de estudos prospectivos com vistas à determinação da duração do período de janela imunológica (tempo decorrido entre a infecção e a soroconversão) para os testes sorológicos de todas as gerações. O Consenso Canadense sobre o período de janela do HIV considera que a maioria dos indivíduos infectados desenvolve anticorpos detectáveis em 14 a 56 dias, e que 97% ou mais apresentam anticorpos em até 90 dias.

Os testes ELISA de 3ª geração para anti-HIV, atualmente disponíveis no mercado, tem uma alta sensibilidade para detectar indivíduos infectados que realizaram soroconversão completa. A especificidade dos testes também é alta, contudo, como a prevalência pelo HIV em doadores de sangue é baixa, o valor preditivo positivo é reduzido.

Diante do alto impacto econômico e logístico da implantação dos testes de NAT, especialmente para os países em desenvolvimento, alternativas para a triagem de doadores de sangue foram criadas. Dentre estas se destacam os testes de detecção de antígeno viral (p24 do HIV-1), que pode ser ou não combinado à detecção de anticorpos anti-HIV.

Os testes ELISA de detecção simultânea de antígeno p24 e anticorpos anti-HIV (em um formato de 3ª geração) são denominados testes de ELISA de 4ª geração. Em um estudo multicêntrico, verificou-se uma redução de 3,6 a 5,7 dias no período da janela imunológica de um teste ELISA de 4ª geração, em comparação com ELISA de 4ª geração. Em uma estratégia dos testes em separado (anticorpos anti-HIV por ELISA de 3ª geração e antígeno

p24 do HIV-1), verificou-se uma redução do período de janela de 6,1 dias em relação aos testes de ELISA de 3ª geração.

Western blot

O teste de imunoeletroforese ou *immunoblot*, popularmente conhecido como *Western blot*, foi desde o início dos estudos com HIV, considerado como teste confirmatório, mas trata-se de um teste complementar, pois detecta os anticorpos como o EIA. Consiste na separação dos antígenos purificados do HIV em gel de SDS poliacrilamida seguida de transferência (*blotting*) destes antígenos para uma fita de nitrocelulose. O teste consiste na incubação das fitas contendo os antígenos virais com o soro do paciente de forma semelhante ao descrito anteriormente para o EIA. A visualização do resultado se faz pelo desenvolvimento de cor nas bandas virais específicas através de precipitação do corante sobre os imunocomplexos. O critério de positividade mais aceito compreende a presença de pelo menos duas das três proteínas virais específicas: p24, gp41 e gp120/160.

Pesquisa de antígeno p24: determina a quantidade de proteína p24 viral presente no plasma ou no sobrenadante de cultura de tecido. Esta proteína apresenta-se em maior concentração no período que antecede a soroconversão e nas fases mais avançadas da doença. O método é baseado na técnica de ELISA (imunoenzimático).

Imunofluorescência indireta: Células infectadas, contendo o antígeno viral, são fixadas em lâminas de microscópio. Posteriormente, incuba-se o soro dos indivíduos, seguindo-se de um tratamento com anti-imunoglobulina humana (anti-IgG) conjugada a um fluorocromo (geralmente isotiocianato de fluoresceína). A presença dos anticorpos anti-HIV é revelada por visualização da reação em microscopia de fluorescência. Também é utilizado como teste confirmatório.

Testes Rápidos: Em casos de urgência como acidentes ocupacionais e gestantes (no momento do parto), estes testes podem ser realizados, tendo como vantagem o diagnóstico

rápido. Além disso, podem ser úteis em situações em que haja dificuldade de estrutura laboratorial.

Testes de Amplificação do Ácido Nucléico Viral (NAT): Mais recentemente métodos que se baseiam na pesquisa de ácidos nucleicos (DNA proviral e RNA) tem sido amplamente utilizados, tanto na confirmação do *status* diagnóstico, bem como para o monitoramento da terapia antiretroviral. O propósito da implantação dos testes de NAT em hemoterapia é identificar doadores com níveis de anticorpos indetectáveis pelos exames sorológicos convencionais.

1.10.2. Diagnóstico da Infecção pelo HIV-1

O diagnóstico da infecção pelo HIV pode ser feito por meio da detecção no soro ou plasma do RNA viral, do antígeno p24 do capsídeo viral ou de anticorpos contra proteínas codificadas pelo genoma viral. Os três métodos podem ser utilizados na triagem sorológica de doadores de sangue.

Com o uso das técnicas atualmente disponíveis, a detecção de anticorpos anti-HIV (IgM) ocorre algumas semanas após a infecção, em média, 22 dias. Três dias após, aparece reatividade pelo *western blot* (geralmente as bandas p24 ou gp160), porém o resultado é indeterminado e permanece assim por mais 5 dias.

Desta forma, podemos encontrar um teste de triagem positivo a partir do 22º dia de infecção cujo resultado do *western blot* é negativo até o 25º dia e indeterminado até o 30º dia. Após o 30º dia, o *western blot* torna-se positivo, porém o aparecimento de outras proteínas virais se dá de forma gradativa, sendo a proteína p31 a última a aparecer, em média após 100 dias de infecção.

A detecção do antígeno p24 do HIV ocorre em média 5 a 6 dias antes do aparecimento do anticorpo ou 16 a 17 dias após a infecção. Por sua vez, o RNA viral pode ser detectado de 10 a 13 dias antes do aparecimento do anticorpo ou entre 9 a 12 dias após a infecção.

A RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, obriga a realização de dois testes de triagem para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Ainda de acordo com essa RDC, um teste deverá ser imunoenzimático e o segundo deverá utilizar um princípio metodológico ou composição antigênica diferente do primeiro. Apesar de não ser obrigatória, a detecção de anticorpos contra o HIV-1 do grupo O, uma grande parte dos testes disponíveis para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 também possuem antígenos específicos do HIV-1 grupo O ou antígenos do HIV-1 grupo M cuja reatividade cruzada com anticorpos antiggrupo O é grande. Mas nem sempre isso ocorre.

Recentemente, tem sido comercializado um teste combinado, isto é, que detecta ao mesmo tempo anticorpos anti-HIV e o antígeno p24 do HIV. De fato, há uma redução da janela imunológica do HIV com a utilização deste teste combinado, porém o processo de confirmação de uma amostra positiva torna-se mais complexo. Nestes casos, quando o *western blot* é negativo ou indeterminado, há necessidade de realizar o ensaio do antígeno p24. Este, por sua vez, pode gerar resultados falso-positivos, tornando-se necessária a realização do teste de neutralização.

A imunofluorescência e *immunoblot* ou *western blot* são metodologias utilizadas para o diagnóstico da infecção do HIV. Este procedimento de confirmação sorológica é descrito nos “Procedimentos seqüenciados para detecção de anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima dos dois anos” com o objetivo da realização do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV descritos na Portaria 59, de 28 de janeiro de 2003.

No Brasil, a detecção do RNA viral do HIV utilizando o NAT (denominação genérica para testes de ácido nucléico derivada do inglês, *nucleic acid test*) já é assunto de quatro portarias ministeriais. O custo desta metodologia é muito alto e esta tem sido a principal dificuldade para sua utilização em nosso país. Entretanto, do ponto de vista, da segurança transfusional, a sua utilização é justificada pelo risco residual de transmissão transfusional pelo HIV. Este risco no Brasil é de 6 a 8 vezes maior que nos Estados Unidos, que utiliza o NAT para a triagem de doadores desde 1999.

A introdução de testes sorológicos na triagem de bancos de sangue diminui, drasticamente, o número de transmissões de doenças infecciosas por transfusão. Existe,

porém, um período entre o momento em que ocorre a infecção e a detecção da presença de marcadores sorológicos no plasma denominado janela imunológica, no qual o agente infeccioso já está presente na corrente sanguínea, podendo ocorrer transmissão, uma vez que os testes convencionais não o detectam. Nesta fase, os testes de biologia molecular conhecidos como NAT (do inglês *nucleic acid techniques*), teriam uma sensibilidade maior. Esse conceito de janela imunológica é usado para vírus de evolução crônica, como é o caso do HIV, para o qual os testes sorológicos são utilizados para detectar a presença de anticorpos ou antígenos específicos e identificar os portadores da doença.

Os testes de biologia molecular podem ser divididos em dois grupos:

- Amplificação do material genético (PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, LCR – Reação em Cadeia da Ligase, NASBA – Amplificação dos Ácidos Nucléicos Baseada em Sequência ou TMA – Transcrição Mediada por Amplificação);
- Amplificação do sinal a ser amplificado (bDNA- branched DNA e captura híbrida).

Em geral, podemos dizer que os testes que amplificam o material genético são mais sensíveis. A vantagem dos testes que amplificam o sinal está no menor risco de resultados falso-positivos por contaminação. Estas metodologias podem ser qualitativas e quantitativas e permitem detectar tanto o DNA, quanto o RNA em questão.

1.11. Justificativa

Importância da infecção pelo HIV-1, especialmente em doadores de sangue;

Necessidade da confirmação de resultados indeterminados, levando em conta a especificidade da PCR como teste confirmatório adicional

Ocorrência de co-infecção do HIV com outros agentes infecciosos avaliados na triagem sorológica.

A dinâmica natural da epidemia do HIV no Brasil levou-nos a avaliar os subtipos presentes do HIV-1 em doações de sangue com infecção pelo HIV. Importância da avaliação dos subtipos circulantes em potenciais doadores de sangue com infecção pelo HIV-1

Objetivos

- Investigar, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, a infecção pelo HIV-1 em candidatos a doador de sangue com sorologia positiva e inconclusiva na triagem sorológica;
- Estudar a epidemiologia molecular do HIV-1 em candidatos a doador de sangue da Fundação Hemope, em Pernambuco;
- Verificar a ocorrência de co-infecção do HIV com outros agentes infecciosos em candidatos a doador de sangue.

Capítulo 1

Artigo a ser submetido no periódico *Transfusion*.

Molecular Epidemiology of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 among Blood Donors in Pernambuco, Brazil.

Anjos EBV¹, Bezerra ACS², Valença MIB², Andrade PD¹, Albuquerque DM³, Costa SCB¹.

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O.Box 6111, CEP 13081-970, Campinas, São Paulo, Brazil

²Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Hemope, 52011-000 Recife, Pernambuco, Brasil

³Hematology and Hemotherapy Center, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O.Box 6111, CEP 13081-970, Campinas, São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Costa, S.C.B.
Disciplina de Medicina Interna
Departamento de Clínica Médica
FCM, UNICAMP
13081-970 Campinas, SP – Brazil.
Fax: + 55** – 19 – 3289-4107

E-mail: costa@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

HIV infection is considered a public health issue in Brazil and is among the leading causes of permanent disability for blood donation. The natural dynamics of the HIV epidemics in the country has stimulated the evaluation of HIV-1 subtypes in blood donations infected patients. Blood donors represent a broad cross section of the population and therefore may provide an overall view of HIV-1 circulating strains in Brazil. The objective of this work was to study the molecular epidemiology of HIV-1 candidate in the blood donors of Foundation Hemope (Pernambuco), from the confirmation of HIV-1 serological status of donors with positive or indeterminate by the Polymerase Chain Reaction. Also assess co-infection of HIV-1 with other pathogens that are evaluated in serological screening. Of the 328 blood donors with positive or inconclusive serology, 46 were confirmed (14.02%) as positive for HIV. Of these 46 samples, subtyping of HIV-1 was possible 40 samples, and 35 (87.50%) samples of subtype B, 4 (10.0%) of subtype C and 1 (2.50%) of CRF02_AG recombinant form. Research show that molecular methods are decisive in the interpretation of the final diagnosis of HIV infection and studies concerning the molecular epidemiology of this virus with the understanding of its biology are needed to understand the dynamics of the infection and to guide health policies that can reduce the incidence of AIDS worldwide.

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the etiological agent of the AIDS pandemic, has a high genetic diversity, which allows its classification into groups, subtypes, sub-subtypes, and circulating recombinant forms (CRFs)¹. According to the National STD and AIDS Programme, from the beginning of the epidemics until June 2008, more than 506.000 cases of HIV infection have been reported in Brazil². Blood donor screening tests generate a substantial number of conflicting results. In most cases, the blood center attempts to elucidate the results of screening test by the performance of additional assays, which may include detection of HIV-1 inserted provirus in PBMCs by the polymerase chain reaction (PCR).

At least five different HIV-1 subtypes are co circulating in the country: A, B, C, D and F³⁻¹⁵. HIV-1 subtype B and the Brazilian variant B' are the most frequent identified clades^{3, 16, 17}. Various BF and BC recombinant genomes were described^{11, 15, 18}, and CRF genotypes (CRF02_AG, CRF28_BF, and CRF29_BF) have also been detected^{15, 18, 19}. Even with a mandatory screening of blood supply in Brazil, transfusion-transmitted HIV infection still contributes with 0.1 percent of the annual reported AIDS cases, as seen in the year 2007, with 17 new cases associated with blood transmission in the country². For that reason a continuous surveillance of HIV-1 genetic variability must be considered, given its implication over the capacity of screening tests to accurately distinguish HIV-1 groups and subtypes.

There are few studies, mostly restricted to specific regions, concerning the prevalence of HIV-1 subtype diversity among blood donors in Brazil. The circulation of several (B, C, D, F, BF) HIV-1 subtypes and recombinant forms, however, has been reported^{7, 8, 20, 21, 22}. Although subtype B is the predominant strain found throughout Brazil, the epidemic is changing^{13, 23, 24}. The prevalence of subtype C is now higher than the

prevalence of subtype B in southern Brazil. Subtype F1 is declining with B/F1 recombinants now more common than nonrecombinant F1^{13, 25}.

HIV co-infection with other pathogens is often described²⁹. They are associated with specific transmission routes and clinical outcomes, and require specific management. Testing errors, due to the use of inappropriately stored samples or expired rapid antibody assays, can also be a significant problem..

The dynamic nature of the HIV epidemic in Brazil stimulated the evaluation of HIV-1 subtypes present in HIV-infected blood donations. Blood donors represent a wider cross section of the population if compared to selected high risk groups and may provide a broader overview of the HIV-1 strains circulating in the country.

This study concerns the molecular epidemiology of HIV-1 among volunteer blood donors with confirmed positive tests by Polymerase Chain Reaction for HIV-1 at Fundação Hemope, Pernambuco State Center of Hematology and Hemotherapy, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Between January/2008 and March/ 2009, 328 candidates to blood donors were found to be HIV. Seropositive and seroindeterminate during screening at Blood Bank of Recife, Fundação Hemope (Pernambuco State). During the screening interview, all candidates to blood donors that declared risk factors for acquisition of the HIV were rejected. The study was conducted in conformance with national and local approval from the Institutional Committee on Ethics of Brazil at Fundação Hemope, Pernambuco, Brazil.

Brazilian regulations require all blood donations to be tested for HIV antibodies by at least two different enzyme immunoassays (EIA) methods (Murex™ HIV Ag/Ab Combination and Murex™ HIV-1.2.O, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) as the choice tests. Each test is performed in duplicate and if a sample is reactive in at least one test, it's retested using both assays. Donations with a reactive result upon retest are rejected. Plasma was separated from each HIV-reactive blood unit where HIV sororeactivity was confirmed by Western blot and Indirect Immunofluorescence. Three to five milliliters of peripheral blood via venous puncture into a sterile test tube containing EDTA from each

HIV-reactive blood unit was collected and sent to the Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular at the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) where the Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in these sample as an additional confirmatory test.

DNA extraction, amplification, and sequencing

HIV-1 DNA proviral was extracted from whole blood collected in EDTA-containing tubes. The erythrocyte was lysis followed by PBMC lysis. The sample was transferred for a tube containing 400 µl of extraction buffer (Tris-HCl [10 mM, pH 7.6], KCl [10mM], MgCl₂ [10mM], NaCl [0,4 M], EDTA [2 mM]) and 25 µl of sodium dodecyl sulfate [10%], and incubated at 55°C for 30 min. The supernatant was then purified by phenol-chloroform isoamlic alcohol (24:1) followed by purification with phenol-chloroform. DNA was precipitated with ethanol, resuspended in 25µl of distilled water and stored at -20°C until use.

To confirm HIV-1 infection in this blood donors, HIV-1 DNA proviral in blood specimens was detected by nested-PCR using primers described by Albert & Fenyo²⁶.. The primers were selected from the *gag*, *env* (*gp120*), *env* (*gp41*) and *pol* region of HIV-1. For the PCR analyses, was determined that the sample should be positive at least 3 of the 4 regions that were subjected to analyses. The sizes of the PCR amplification products were 131, 341, 172 and 129 base pairs, respectively. The nucleotide sequence and their locations in the HIV-1 genome are shown in the Table 1.

To determine the genetic subtype of the HIV-1 strain present in each specimen, one region of the genome was amplified by nested-PCR and sequence was described: *env* gene gp120 encoding the C2-V3 region (682 bp in length). The primers utilized in this reaction were described e modified by Paladin *et al*²⁷. The first round primers were EN70 (5' – ATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTGTAA – 3') and EN85 (5' – CATATCTCCTCCTCCAGGTCT – 3'), from HXB2 *env* nucleotide positions 338 – 361 and 1404 – 1424, respectively. The second round primers were E80 (5' – CCAATTCCCATACATTATTGTG – 3') and E95 (5' – GATGGGAGGGGCATACAT –

3'), from HXB2 *env* nucleotide positions 634-655 and 1299-1316, respectively. The first amplification contained 0,5 µl DNA in a total volume of 20 µl PCR mixture.. The thermocycling conditions were as follow: 94°C for 5 minutes, and after that for 30 cycles of amplification, having each cycle the following conditions: 94°C for 30 seconds; 57°C for 1 minute; 75°C for 30 seconds, these 30 cycles were followed by a single cycle of 75°C for 5 minutes in a Perkin Elmer 480 thermocycler (Perkin Elmer, Foster City, California, USA). The second amplification contained 0,5 µl of the first reaction in a 20µl total volume of PCR mixture to yield sufficient quantities of amplicons for DNA sequencing. The cycling conditions were equal to the first round. PBMC DNA extracted from seronegative blood donor's individuals was included as negative control and amplified similarly. The resultant amplified DNA product was purified using in house method and used as template for direct sequencing using DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit sequenced in an automated MegaBACE 1000, . The sequencing primer used for DNA sequencing was E80, described above.

Subtype analysis

The results obtained by the automatic sequencer were interpreted through the comparative analysis (alignment) of the sequencings achieved by the chromatography (Chromas®Pro,) and the determination of subtypes was accomplished by submitting the obtained *env* sequences C2-V3 region (682 bp) to the Los Alamos HIV-1 subtyping tool (<http://hiv-web.lanl.gov>) and genotyping Viral Tools (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Table 1. Primer locations and their sequence in the HIV-1 genome

Primer	Sequence (5' - 3')	Gene and Location
JA4*	GAAGGCTTTCAGCCCAGAAG	gag (1319-1338)
JA5**	ACCATCAATGAGGAAGCTGC	gag (1446-1465)
JA6**	TATTTGTTCTGAAGGGTAC	gag (1577-1558)
JA7*	TCTCCTACTGGGATAGGTGG	gag (1615-1596)
JA9*	CACAGTACAATGTACACATG	env (7137-7156)
JA10**	AAATGGCAGTCTAGCAGAAG	env (7191-7210)
JA11**	ACAATTTCTGGGTCCCCTCC	env (7532-7513)
JA12*	ACAGTAGAAAAATTCCCCTC	env (7572-7533)
JA13*	TTCCTTGGGTTCTTGGGAGC	env (8004-8023)
JA14**	GCAGCAGGAAGCACTATGGG	env (8022-8041)
JA15**	CCAGGACTCTTGCCTGGAGC	env (8194-8175)
JA16*	AGGTATCTTTCCACAGCCAG	env (8209-8190)
JA17*	TACAGGAGCAGATGATACAG	pol (2431-2450)
JA18**	GGAAACCAAAAATGATAGGG	pol (2481-2500)
JA19**	ATTATGTTGACAGGTGTAGG	pol (2610-2591)
JA20*	CCTGGCTTTAATTTTACTGG	pol (2697-2678)

*Outer primers; ** Inner (nested) primers.

RESULTS

Blood Donors Screening

During the time period of this study, january 2008 through march 2009, Fundação Hemope screened 128.309 donations. In total, of 328 candidates, 53 (16.16%) were HIV-1 positive and 275 (83.84%) inconclusive by serological screening of this blood bank. After returns for the new collect, 52 (15.85%) were found to be positive for HIV-1, 141 (42.99%) were found indeterminate and 135 (41.16%) were negative. Testing of the samples by Western blot showed that 45 (13.72%) were positive, 43 (13.11%) were indeterminate and 240 (73.17%) were negative. Also, this samples were tested by Indirect Immunofluorescence, and showed that 45 (13.72%) were positive and 283 (86.28%) negative. Thus, after PCR reactions, 46 (14.02%) samples were positive and 282 (85.98%) were negative. Considering each primers set individually, 43 samples were positive in the primers set from *gag*, 43 from the *env* gp41, 41 from the *env* gp120 and 46 from the *pol*. One HIV seroconversion was found. Taking into account the results obtained by PCR, we can say that the prevalence of HIV-1 in blood donors of the Fundação Hemope was 0.036. Table 2 presents the distribution of the positive donors according to gender, age and type of donation.

Table 2. Distribution of donors according to gender, age and type of donation

Characteristic	
<i>Sex</i>	
<i>Male</i>	43 (93,48%)
<i>Female</i>	3 (6,52 %)
<i>Age – Age group</i>	
<i>18 – 30 years</i>	21 (45,65%)
<i>31 – 40 years</i>	17 (36,96 %)
<i>41 – 50 years</i>	7 (15,22%)
<i>51 – 65 years</i>	1 (2,13%)
<i>Donation Type</i>	
<i>Spontaneous</i>	26 (56,52%)
<i>Bound</i>	20 (43,48%)

Of the 46 positive donors, only 5 (10.87%) donors had co infection with other pathogens, three with hepatitis B, 1 with syphilis and 1 with by hepatitis B and syphilis.

Subtype characterization

In 40 out 46 (86.96%) donors samples were possible to determine the subtypes by sequencing.

Based on the genotyping database, 35 (87.5%) samples were classified as subtype B, followed by four (10%) subtype C and 1 (2.5%) viral recombinant forms between subtypes A and G (CRF02_AG).

DISCUSSION

HIV infection resulting from blood transfusion of infected blood has been documented since the first case report in 1981²⁸. Because transfusion of HIV-contaminated blood may be contributing to the spread of the virus in Brazil there is a need for urgent and necessary action by relevant health authorities to prevent transfusion-associated transmission. The inclusion of p24 antigen testing and the nucleic acid test, which detects HIV-1 RNA in minipools, has been shown to reduce the risk of transfusing HIV-contaminated blood in United States²⁹. The routine use of nucleic acid-amplification tests (NAT) and serologic assays for donor screening has made possible the identification of persons in the very early stages of HIV-1 infection⁴⁹. This information can provide insights into risk factors associated with viral infection and potentially contribute to studies of the natural history, pathogenesis, and treatment of this infection⁴⁹. The introduction of the NAT in the blood screening given its capability of reducing the infected window period for HIV-1 in 7 a 9days compared to p24 an antibody detecting assays.

In our study, we found 35 (86.96%) samples of viruses belonging to subtype B. Our results reflect the subtype distributions previously observed in other Brazilian regions, since subtype B was the most prevalent. Four samples (10%) were of subtype C and one sample (2.5%) appears to represent recombinant form CRF02_AG.

The high diversity of HIV increases the difficulties involved in controlling the epidemic of AIDS. Some studies trace the movement of HIV in Brazil, indicating the predominance of subtype B, followed by subtypes C and F1^{14, 15, 25, 40, 45, 46}. Although the subtype B is being the most prevalent in Brazil, subtype C is most prevalent in the south of the country. Worldwide, subtype C accounts for more than half of infections by HIV-1⁴¹.

The geographic distribution of the different subtypes of the HIV is not homogeneous and different regions present distinct profiles of prevalence. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C is the subtype of higher occurrence worldwide, and is the main isolated subtype in some countries of the Middle East, Asia and the South and African East (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). These are extremely populous regions and present high indices of prevalence of the HIV. In South America, the main circulating subtype is B; however, subtypes C and F also are epidemiologically important, especially because of the increasing prevalence of subtype C in Brazil. The growth of subtype C in the South America stirs up concern, a time that after its entrance in some countries it finished taking advantage on excessively^{33,34,35,39}. Previous works had indicated strong evidences of the monophyletic origin of subtype C in Brazil^{36,37,38}.

Similar already described in several studies the relationship of the prevalence of the subtype B, not only in Brazil, but also in Europe and United States³¹. Brazil is a huge country and differences in the pattern of subtype distribution have been identified among the geographic regions. In a study developed in São Paulo City (southeast Brazil), the subtype B was predominant, with 94% of the total cases; the subtype F was present in only 6% of the total of the cases³². In another more recent study, carried out in Manaus (northern Brazil), similar proportions of B and F subtypes were observed whilst, in the southeast, several studies have shown the predominance of subtype B (~85%) followed by subtype F (~10-15%)³⁰. Moreover, a clear predominance of subtype B (> 80%), with very limited cases of F and C subtypes were, respectively, observed in HIV-1 samples from the Northeast³². In Pernambuco, subtype B is most prevalent, followed by subtype F, with few cases of subtype C^{45, 48}. The presence of subtype C in south Brazil¹⁴ was first detected in 1 out 5 HIV-1 samples collected in Porto Alegre, RS³⁰. A study on the molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil has shown more recently, the presence of subtype A³⁰.

The presence of circulating recombinant forms (CRF's) has also been described⁴⁷. The CRF02_AG is circulating recombinant forms among the most prevalent throughout the world⁴¹;

In this study, we found 4 (8.70 %) samples of viruses with HBV and 2 (4.35%) with syphilis. With overlapping exposure risks and high prevalence geographical regions, co-infection with others infectious diseases is often in HIV infected individuals. Hepatitis B and Syphilis, because they share similar risk factors for acquisition with HIV, are often found in HIV infected individuals. Approximately 10% of the HIV patients worldwide are co-infected with chronic hepatitis B virus (HBV)⁵⁰. The co infection HIV / Hepatitis B shows to be one of the most common among blood donors⁴⁴. HBV co-infection has not been shown to influence progression to AIDS or alter immunological or viral response to antiretroviral therapy in large cohorts⁵¹. The co- infection HIV / Syphilis can also occur but is in decline⁴⁴. Our results reflect the distributions previously observed in others studies.

It is of concern that individuals are still presenting at blood donors centers with HIV infection. While there is evidence that many people with HIV in the Brazil are unaware of their status, with up to 30% undiagnosed infections, some may be using blood donation as method of obtaining an HIV test without going through the formal general practitioner or sexual health clinic route. With increasing public awareness of sexually transmitted diseases, there may be an increasing number of individuals anxious about their status^{47, 52}.

In this respect, the development of biologics panels of subtyped and characterized plasma samples will be of paramount importance to improve and expand the diagnosis of HIV-1 infection, adjusting the tests so as to consider all HIV-1 variants circulating in the country⁵³.

Research shows that molecular methods are decisive in the interpretation of the final diagnosis for HIV. The Polymerase Chain Reaction is a valuable tool to diagnose HIV in donated blood and thus can reduce the risk of transmission through blood transfusion.

Studies of molecular epidemiology of HIV-1 with the understanding of its biology are needed to understand the dynamics of infection and to guide health policies to control the spread of the virus and reduce the global incidence of AIDS;

REFERENCES

1. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288 (5463): 55-6.
2. Epidemiology Bulletins AIDS and STD Year V, nº 1 – 1st – 26th epidemiological week January to June 2008.
3. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10(5):569-76.
4. Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, McCutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(5): 561-7.
5. Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I, Jr., Veloso VG, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18(5): 488-94.
6. Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, et al. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 22(3):288-93.
7. Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, et al. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20(1): 60-6.
8. Tanuri A, Vicente AC, Otsuki K, Ramos CA, Ferreira OC, Jr., Schechter M, et al. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(2): 253-8.

9. Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, et al. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2000; 275(1): 107-15.
10. Stefani MM, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvao-Castro B. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23(2): 205-7.
11. Guimaraes ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(17): 1261-9.
12. Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2): 143-50.
13. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *Aids* 2003; 17(7): 1063-9.
14. Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003; 17(1): 11-21.
15. Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(1): 73-8.
16. Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *Aids* 1993; 7(9): 1191-7.
17. Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19(1): 74-9.

18. De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22(1): 1-13.
19. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994; 68(10): 6340-6.
20. Brindeiro R, Vanderborght B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, et al. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1674-80.
21. Kupek E. Transfusion risk for hepatitis B, hepatitis C and HIV in the state of Santa Catarina, Brazil, 1991-2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(3): 236-40.
22. Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, Kalish ML, De Vroey V, Hertogs K, et al. Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(9): 3075-9.
23. Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34(5): 520-6.
24. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhake RD, Ferreira JL, et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006; 116(1-2): 201-7.
25. Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41(3): 338-41.
26. Albert J, Fenyo EM. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1560-4.

27. Paladin FJ, Monzon OT, Tsuchie H, Aplasca MR, Learn GH, Jr., Kurimura T. Genetic subtypes of HIV-1 in the Philippines. *Aids* 1998; 12(3): 291-300.
28. Curran JW, Lawrence DN, Jaffe H, Kaplan JE, Zyla LD, Chamberland M, et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. *N Engl J Med* 1984; 310(2): 69-75.
29. Stramer SL. Viral diagnostics in the arena of blood donor screening. *Vox Sang* 2004; 87 Suppl 2: 180-3.
30. Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (2): 143-150.
31. Thomson MM, Perez-Alvarez L, Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 461 - 471.
32. Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF, Learn GH, Mullins JI, Reingold AL, Duarte AJS, Mayer A, Busch MP. Distribution of HIV-1 subtypes seen in AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. *AIDS* 1996; 10: 1579-1584.
33. Renjifo B, Chaplin B, Mwakagile M, Shah P, Vamberg F, Msamanga G, et al. Epidemic expansion of HIV type 1 subtype C and recombinant genotypes in Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998; 14:635–638.
34. van Harmelen JH, van der Ryst E, Loubser AS, York D, Madurai S, Lyons S, et al. A predominantly HIV-1 subtype C-restricted epidemic in South African urban populations. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999; 15: 395–398.
35. Rodenburg CM, Li Y, Trask SA, Chen Y, Decker J, Robertson DL, Kalish ML, Shaw GM, Allen S, Hahn BH, Gao F; UNAIDS and NIAID Networks for HIV Isolation and characterization. Near full-length clones and reference sequences for subtype C isolates of HIV type 1 from three different continents. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 Jan 20; 17(2): 161-8.

36. Soares MA, de-Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brígido L, Pires IL, Morgado MG, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A, the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS*. 17 (1): 11–21, 2003.
37. Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, Silveira J, Sabino EC, Tanuri A, Soares MA. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*. 20 (16): 2011–2019, 2006.
38. Sanabani S, Kleine-Neto W, de Sá Filho DJ, Diaz RS, Munerato P, Janini LM, Sabino EC. Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype c in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2006; 22 (2): 171–176.
39. Bello G, Passaes CP, Guimarães ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, Alencastro PR, Morgado MG. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS*. 2008; Oct 1;22 (15): 1993-2000.
40. Fontella R, Soares AM, Schrago CG. On the origino f HIV-1 subtype C in South America. *AIDS*. 2008; Oct 1 ;22(15):2001-11.
41. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20 (16): W13-23.
42. de Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AM, de Albuquerque Mde F. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (8): 845-9.
43. Cunha L, Plouzeau C, Ingrand P, Gudo JP, Ingrand I, Mondlane J, et al. Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major blood-borne viruses in the general population of Maputo, Mozambique. *J Med Virol* 2007; 79 (12): 1832-40.
44. Ekadashi R, Langer S. Seroprevalence of human immunodeficiency virus and syphilis in blood donors of Delhi. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27 (2): 167-8.

45. Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (7): 785-92.
46. Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (8): 877-82.
47. Brennan CA, Brites C, Bodelle P, Golden A, Hackett J, Jr., Holzmayer V, et al. HIV-1 strains identified in Brazilian blood donors: significant prevalence of B/F1 recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23 (11): 1434-41.
48. de Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AM, de Albuquerque Mde F. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (8): 845-9.
49. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004; 351 (8): 760-8.
50. Soriano V, Puoti M, Peters M, Benhamou Y, Sulkowski M, Zoulim F, et al. Care of HIV patients with chronic hepatitis B: updated recommendations from the HIV-Hepatitis B Virus International Panel. *AIDS* 2008; 22 (12): 1399-410.
51. Sulkowski MS. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol* 2008; 48 (2): 353-67.
52. Davidson F, Yirrell DL, Lycett C, Petrik J, Dow BC. Human immunodeficiency virus 1 subtypes detected in Scottish blood donors. *Vox Sang* 2009; 96 (2): 160-2.
53. Brennan CA, Stramer SL, Holzmayer V, Yamaguchi J, Foster GA, Notari Iv EP, et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and antiretroviral drug-resistant strains in United States blood donors. *Transfusion* 2009; 49 (1): 125-33.

Conclusões Gerais

- A investigação por métodos moleculares parece ser decisiva na interpretação definitiva do diagnóstico para o HIV. A Reação em Cadeia da Polimerase é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico do HIV no sangue doado e, assim, reduz o risco de transmissão por transfusão sanguínea;
- O subtipo mais encontrado foi o subtipo B, em 87.50% dos candidatos a doadores de sangue, seguido do subtipo C em 10 % e da forma circulante recombinante CRF02_AG em 2.50%.
- O desenvolvimento de painéis dos subtipos de HIV-1 em amostras de plasma será de extrema importância para melhorar e ampliar o diagnóstico da infecção por esse vírus, adaptando os testes de forma a considerar todas as variantes do HIV-1 circulantes no país;
- É fundamental que se estabeleçam intervenções educativas visando a redução do comportamento de risco para prevenção da ocorrência de co-infecção HIV/HBV e HIV/ *Treponema pallidum*;
- Estudos de epidemiologia molecular aliados ao entendimento da biologia do HIV-1 são necessários para melhor compreender a dinâmica da infecção e guiar políticas sanitárias no controle da expansão do vírus, além de reduzir a incidência mundial da AIDS.

Referências Bibliográficas

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994; 76 (5): 853-64.

Archer J, Robertson DL. Understanding the diversification of HIV-1 groups M and O. *Aids* 2007; 21 (13): 1693-700.

Arendrup M, Nielsen C, Hansen JE, Pedersen C, Mathiesen L, Nielsen JO. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5 (3): 303-7.

Arien KK, Abraha A, Quinones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 2005; 79 (14): 8979-90.

Ball SC, Abraha A, Collins KR, Marozsan AJ, Baird H, Quinones-Mateu ME, et al. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J Virol* 2003; 77 (2): 1021-38.

Barbosa EF, Carneiro-Proietti AB, Oliveira DR, Lima-Martins MV, Kroon EG, Ferreira PC. HIV-1 detection and subtyping by PCR and heteroduplex mobility assay in blood donors: can these tests help to elucidate conflicting serological results? *Transfus Sci* 1998; 19 (1): 39-43.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220 (4599): 868-71.

Barre-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 1996; 348 (9019): 31-5.

Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41(3): 338-41.

Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *Aids* 2008; 22 (15): 1993-2000.

Bibollet-Ruche F, Bailes E, Gao F, Pourrut X, Barlow KL, Clewley JP, et al. New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*): evidence for a cercopithecus monkey virus clade. *J Virol* 2004; 78 (14): 7748-62.

Bongertz V, Costa CI, Santos VG, Joao Filho EC, Galvao-Castro B, Morgado MG. Correlation between susceptibility of primary HIV-1 isolates to autologous and heterologous neutralizing antibodies. Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. *Aids* 1997; 11 (8): 969-75.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68 (9): 6103-10.

Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997; 3 (2): 205-11.

BRASIL. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. ANVISA. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de junho de 2004.

Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* 1994; 8 (8): 1123-8.

Burke DS, McCutchan FE. Global distribution of human immunodeficiency virus type 1 clades. In: DeVita VT, Hellman LJr., Rosenberg SA (ed). *AIDS: biology, diagnostics treatment and prevention*. 4th ed. New York: Lippencott-Raven Publishers; 1996. P119-126.

Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (7): 785-92.

Cavallo G, Cavallo R. [Retroviruses: current classification system]. *G Bacteriol Virol Immunol* 1986; 79 (7-12): 288-94.

Center for Disease Control - CDC. *Pneumocystis pneumonia* – Los Angeles. 1981. *MMWR*, 30: 250-2.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267 (5197): 483-9.

Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 214: 219-35.

Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391(6665): 397-401.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185 (4): 621-8.

Corbet S, Muller-Trutwin MC, Versmisse P, Delarue S, Ayoub A, Lewis J, et al. env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* 2000; 74 (1): 529-34.

Cohen OJ, Weismann D, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. In: William E Paul. *Fundamental immunology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1

infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100 (1): 73-8.

Cunha L, Plouzeau C, Ingrand P, Gudo JP, Ingrand I, Mondlane J, et al. Use of replacement blood donors to study the epidemiology of major blood-borne viruses in the general population of Maputo, Mozambique. J Med Virol 2007; 79 (12): 1832-40.

Donegan E, Stuart M, Niland JC, Sacks HS, Azen SP, Dietrich SL, et al. Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations. Ann Intern Med 1990; 113 (10): 733-9.

Ekadashi R, Langer S. Seroprevalence of human immunodeficiency virus and syphilis in blood donors of Delhi. Indian J Med Microbiol 2009; 27 (2): 167-8.

Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. Science 1993; 262 (5136): 1011-8.

Fontella R, Soares MA, Schrago CG. On the origin of HIV-1 subtype C in South America. Aids 2008; 22 (15): 2001-11.

Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem 1998; 67: 1- 25.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220 (4599): 865-7.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 1999; 397 (6718): 436-41.

Gastaldello R, Gallego S, Isa MB, Maturano E, Sileoni S, Nates S, et al. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV-I/II in Cordoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43 (5): 277-82.

Gendler SA, Pascuccio MS. Routine HIV screening among blood donors in Buenos Aires (Argentina): results from six years' experience and report of a single window-period donation. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25 (2): 82-90.

Germain M, Goldman M. Blood donor selection and screening: strategies to reduce recipient risk. *Am J Ther* 2002; 9 (5): 406-10.

Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002; 8 (7): 673-80.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type

1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003; 77 (21): 11708-17.

Guimaraes ML, Bastos FI, Telles PR, Galvao-Castro B, Diaz RS, Bongertz V, et al. Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J Clin Virol* 2001; 21 (2): 143-51.

Gurtler LG, Zekeng L, Tsague JM, van Brunn A, Afane Ze E, Eberle J, et al. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl* 1996; 11: 195-202.

Hahn BH, Shaw GM, Arya SK, Popovic M, Gallo RC, Wong-Staal F. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* 1984; 312 (5990): 166-9.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids* 2006; 20 (16): W13-23.

Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, et al. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18 (18): 1339-50.

Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989; 339 (6223): 389-92.

Hope TJ. Viral RNA export. *Chem Biol* 1997; 4 (5): 335-44.

Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998; 339(1):33-9.

Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 1987; 330(6147):489-93.

Karn J. Tackling Tat. *J Mol Biol* 1999; 293 (2): 235-54.

Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 133 -73.

Kiely P, Wood E. Can we improve the management of blood donors with nonspecific reactivity in viral screening and confirmatory assays? *Transfus Med Rev* 2005; 19(1): 58-65.

Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990; 64 (2): 621-9.

Kotler DP, Reka S, Borcich A, Cronin WJ. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *Am J Pathol* 1991; 139 (4): 823-30.

Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK, Rerks-Ngarm S, Phanuphak P, Raktham S, et al. HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet* 1995; 345 (8957): 1078-83.

Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Mariotti M, Thauvin M, Lerable J, Salpetrier J, et al. The risk of disease progression is determined during the first year of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1998; 177 (6): 1541-8.

Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990; 265 (18): 10373-82.

54. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225 (4664): 840-2.

55. Locateli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcantara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol* 2007; 79 (10): 1455-63.

Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 1991; 87 (4): 1462-6.

Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 2003; 114 (1): 21-31.

Marozsan AJ, Moore DM, Lobritz MA, Fraundorf E, Abraha A, Reeves JD, et al. Differences in the fitness of two diverse wild-type human immunodeficiency virus type 1 isolates are related to the efficiency of cell binding and entry. *J Virol* 2005; 79 (11): 7121-34.

Mehandru S, Wrin T, Galovich J, Stiegler G, Vcelar B, Hurley A, et al. Neutralization profiles of newly transmitted human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *J Virol* 2004; 78 (24): 14039-42.

Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272 (5265): 1167-70.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10 (5): 569-76.

Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I, Jr., Veloso VG, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18 (5): 488-94.

Nannini EC, Okhuysen PC. HIV-1 and the gut in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4 (5): 392-8.

Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 1994; 370 (6489): 463-7.

Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 825 -54.

Peter F. HIV nef: the mother of all evil? *Immunity* 1998; 9 (4): 433-7.

Phair JP. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10 (8): 883-5.

Pillonel J, Laperche S. Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Euro Surveill* 2005; 10 (2): 5-8.

Poignard P, Klasse PJ, Sattentau QJ. Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol Today* 1996; 17 (5): 239-46.

Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel AD, Williamson JR. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* 1992; 257 (5066): 76-80.

Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5 (1): 52-61.

Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (7): 4144-9.

Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242 (4882): 1171-3.

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994; 68 (10): 6340-6.

Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM, et al. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45 (3): 328-33.

Schubert U, Ferrer-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett* 1996; 398 (1): 12-8.

Shrestha PN. Transmission of HIV through blood or blood products in the Eastern Mediterranean Region. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 1996, v.2, n.2, p. 283-289.

Simmonds P, Balfe P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990; 64 (12): 5840-50.

Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998; 4 (9): 1032-7.

Simon V, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1 (3): 181-90.

Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S. Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol* 1998; 72 (8): 6646-56.

Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *Aids* 2005; 19 Suppl 4: S81-6.

Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, et al. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996; 271 (5253): 1291-3.

Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986; 45 (5): 637-48.

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 2007; 39 (3): 205-9.

Subbarao S, Schochetman G. Genetic variability of HIV-1. *Aids*. 1996; 10 Suppl A: S13-23.

Travers SA, Clewley JP, Glynn JR, Fine PE, Crampin AC, Sibande F, et al. Timing and reconstruction of the most recent common ancestor of the subtype C clade of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2004; 78 (19): 10501-6.

Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* 1999; 7 (4): 144-9.

van der Loeff MF, Awasana AA, Sarge-Njie R, van der Sande M, Jaye A, Sabally S, et al. Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2. *Int J Epidemiol* 2006; 35 (5): 1322-8.

Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, et al. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23 (4): 327-31.

UNAIDS. AIDS epidemic update: December 2007. World Health Organization, Geneva, 2007.

Wahdan MH. Epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome. World Health Organization. 1995. Regional Office for the Eastern Mediterranean.

Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; 422 (6929): 307-12.

Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *Aids* 1994; 8 Suppl 2: S13-28.

WHO. The world health report 2007: a safe future: global public health security in the 21st century. 2007. World Health Organization, Geneva.

Zeichner SL. The molecular biology of HIV. Insights into pathogenesis and targets for therapy. *Clin Perinatol* 1994; 21(1): 39-73.

Anexos

Comitê de Ética em Pesquisa

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL Nº 002/07

Título do Projeto: Análises Moleculares do Vírus HIV-1 em Candidatos a Doadores de Sangue da Fundação Hemope com Testes Sorológicos Positivos para o HIV-1.

Instituição Solicitante: Fundação HEMOPE

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação HEMOPE

Responsável: Emanuel Borges Vitor Anjos

Identidade: 6176611 SSP-PE

CPF: 038.758.544-38

Endereço: Rua Engenheiro Humberto Soares de Camargo, Barão Geraldo- Campinas – SP.

CEP: 13083-780

Telefone: 19- 32491957

Finalidade: Conclusão de Mestrado

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Objetivo: Estudar a epidemiologia molecular do vírus HIV através da utilização do seqüenciamento direto para determinação dos subtipos predominantes em doadores de sangue da Fundação Hemope, em Pernambuco.

Objetivos Específicos: Padronizar e aplicar a técnica da PCR para HIV-1 como teste confirmatório para os doadores de sangue da Fundação Hemope;

Genotipagem das amostras confirmadamente positivas pelas duas técnicas: Imunofluorescência (IF) para HIV e pela técnica do PCR através da Nested-PCR do gene *env* do vírus, para detecção das variantes genotípicas do vírus;

Analisar a co-infecção HIV-1/ HCV nestas amostras de doadores de sangue.

Desenho do Estudo: O estudo será do tipo observacional e transversal, quanto à abordagem da análise será do tipo descritivo.

Metodologia: O estudo será realizado nos doadores que retornarem após convocação por carta, por apresentarem sorologia positiva para HIV na triagem sorológica de doadores da Fundação Hemope. Estes doadores têm entre 18 e 65 anos, acima de 50 kg, com pressão arterial, temperatura corpórea, taxas de hemoglobina e hematócrito, todos normais (ANVISA, 2004). O estudo só será suspenso caso não seja mais possível manter o envio das amostras. O estudo será encerrado quando houver um número suficiente de doadores de sangue para as análises conclusivas sobre o proposto inicial. Serão coletadas amostras de sangue total em tubo estéril contendo anticoagulante (K3EDTA) no setor de Coleta de Doadores da Fundação Hemope no Hemocentro Recife e também dos vários Hemonúcleos da Fundação Hemope no interior de Pernambuco para realização da análise molecular. Para realização de testes sorológicos, as amostras serão coletadas em tubo seco com gel separador.

3 - PARECER DO RELATOR: - O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 002/07, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).

Comitê de Ética em Pesquisa

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro – e enviar notificação ao CEP e a ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente a ANVISA, o pesquisador ou patrocinador devem enviá-los também a ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 19/12/2007



Maria Emilia dos Santos
Coordenadora