

Carmem Aparecida de Freitas Oliveira

**Estimativa da incidência de infecção pelo HIV
com amostras de soro de gestantes e de usuários de
CTA encaminhadas para diagnóstico, empregando o
algoritmo de testes sorológicos para infecção recente
pelo HIV (STARHS).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando de
Macedo Brígido**

SÃO PAULO/SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Carmem Aparecida de Freitas

Estimativa da incidência de infecção pelo HIV com amostras de soro de gestantes e de usuários de CTA encaminhadas para diagnóstico, empregando o algoritmo de testes sorológicos para infecção recente pelo HIV (STARHS) / Carmem Aparecida de Freitas Oliveira – São Paulo, 2006.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Luís Fernando de Macedo Brígido

1. Infecções por HIV/epidemiologia 2. Gestantes 3. Western Blotting 4. Testes anônimos

SES/CCD/CD-132/06

Aos meus pais, José e Agostinha, pela vida que me deram, pela formação moral e acadêmica que me proporcionaram e pelo exemplo de dedicação na busca dos objetivos...

Aos meus irmãos Ivanilde e Júlio César, pelas experiências vividas, que tanto contribuíram na formação do meu caráter, e pelo companheirismo...

Ao meu esposo e eterno companheiro Donizeti, pelo amor que sempre demonstrou, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, pelo apoio, amizade e motivação constantes em todos estes anos...

Aos meus filhos, Márcia e André, pelas virtudes que possuem, pelo bem que fazem a mim e à nossa família, pelo significado que deram à minha vida com suas existências e pela possibilidade que me deram de prosseguir...

A todos vocês, meus queridos, dedico este trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido, pela oportunidade de trabalho em colaboração, pelo incentivo na superação dos desafios, pelos desafios colocados e pelas críticas construtivas feitas durante a realização deste trabalho. Pelo apoio, amizade e confiança depositados em todos estes anos de trabalho.

À Prof. Dra. Raquel Bellinati Robert-Pires, por ter proporcionado a oportunidade de ingressar nesta empreitada, pela motivação, incentivo e amizade; pela abdicação, em meu favor, de um projeto estabelecido.

À Dra. Mirthes Ueda, pelos ensinamentos e sabedoria; pelo incentivo e motivação para o trabalho.

À Dra. Carmen Silvia de Melo, Chefe da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade e atitudes no desempenho de suas funções, que contribuíram de forma inestimável para a minha formação profissional e conclusão deste trabalho.

À Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe, Diretora da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio e pela confiança depositada durante toda a jornada.

Ao Dr. Haynes W. Sheppard, do Laboratório de Doenças Virais e Rickettsioses do Departamento de Serviços de Saúde do Estado da Califórnia, em Berkeley, EUA, pelo treinamento pela supervisão na realização dos ensaios do STARHS.

Às colaboradoras do Laboratório Estadual de Itapeçerica da Serra, Heloisa, Ailde e Rosana, pela coleta de dados e fornecimento de amostras para o estudo; pela postura profissional e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de HIV/Aids da Seção de Sorologia, Rose, André, Márcia e Alonso, pela contribuição na coleta de dados e realização de análises; pela amizade, companheirismo, dedicação e incentivo.

Aos colegas da Seção de Sorologia, Alair, Antônio Marcos, Edilene, Edna, Elaine, Elenice, Marisa, Neuza, Paulo, Salete, Vanessa e Vilmari, pela amizade e pelo apoio demonstrado no dia-a-dia.

À Dra. Rosângela Rodrigues, pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos Professores, membros da banca de qualificação, Dra. Adele Caterino-de-Araújo, Dr. Marcos Vinícius da Silva e Dra. Rosângela Rodrigues, pela generosidade na avaliação e discussão do projeto e pela sinceridade na apresentação das críticas, que contribuíram inquestionavelmente para o aprimoramento do presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao Instituto Adolfo Lutz e à Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela oportunidade que me proporcionaram de realizar este trabalho juntamente com o desempenho de minhas funções.

Agradeço a Deus, por tudo isso.

RESUMO

O algoritmo de testes sorológicos para detecção de soroconversão recente para o HIV (STARHS) (Janssen *et al.*, 1998) foi empregado neste estudo para discriminar infecções recentes e crônicas pelo HIV e estimar a incidência da infecção pelo HIV com amostras de soro provenientes de gestantes, usuários de Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) e indivíduos com suspeita de infecção recente pelo HIV. A associação entre os padrões de bandas presentes no teste de *Western blot* para HIV-1 (WB) e os resultados do STARHS foi avaliada.

Foram analisadas 106 amostras de soro de gestantes, 42 de usuários de CTA, 06 de soroconvertedores recentes para o HIV (média de 188 dias) e 37 de indivíduos suspeitos de infecção recente pelo HIV. Estimativas de soroincidência de HIV de 0,2 (IC 95%, 0,041-0,608) e 3,3 (IC 95%, 1,426-6,345) por 100 amostras de soro-ano foram observadas com a análise das amostras de gestantes, de 1999 a 2002, e de usuários de CTA, de 2000 a 2001, respectivamente.

Os padrões de intensidade de cor das bandas observadas na análise das amostras de soro deste estudo por meio do WB sugerem que há associação entre ausência ou intensidade baixa da banda gp41 e infecção recente [OR = 16,44 (IC 95%, 6,32 - 42,75); $p < 0.001$] e presença das bandas p55, p24 e p17, em intensidade de forte, e infecção crônica [OR = 7,01 (IC 95%, 3,05 - 16,14); $p < 0,001$].

Os dados do presente estudo sugerem que a avaliação do perfil de anticorpos anti-HIV em amostras armazenadas em sorotecas e os dados brutos dos testes de WB realizados para o diagnóstico de HIV/Aids podem ser úteis na estimativa da incidência da infecção pelo HIV empregando-se algoritmos sorológicos, especialmente quando dados epidemiológicos e sócio-demográficos estão disponíveis.

Palavras-chave: Infecções por HIV, gestantes, testes anônimos, Western Blotting.

ABSTRACT

The Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS) (Jansssen *et al.*, 1998) has been employed in this study to discriminate recent and chronic HIV infections and estimate HIV incidence on HIV-positive sera samples from pregnant women (PW), Voluntary Counseling and Testing (VCT) attendees, and persons suspected to be recently infected by HIV. The association between banding patterns observed on the HIV-1 Western blot test and STARHS results was assessed.

A total of 106 samples from PW, 42 samples from VCT attendees, 06 samples from HIV serconverters (mean of 188 days), and 37 samples from subjects under recent HIV-infection suspicion has been analyzed. HIV-seroincidence estimates of 0.2 (95% CI, 0.041-0.608) and 3.3 (95% CI, 1.426 – 6.345) per 100 sera samples-years were observed for PW, from 1999-2002, and for CTA population, from 2000-2001, respectively.

The patterns of color intensity of bands observed in the analysis of sera samples from this study suggest association between absence or weak reactivity at gp41 region and recent infection [OR = 16.44 (95% CI, 6.32 – 42.75); $p < 0.00$], and between strong reactivities at p55, p24, and p17 bands and chronic infection [OR = 7.01(95%CI, 3.05 – 16.14); $p < 0.001$].

Data from the present study suggest that the evaluation of anti-HIV antibodies profiles from specimens stored in sera banks and of raw data from WB performed for HIV/Aids diagnosis could be useful on HIV incidence estimates using serological algorithms, especially when epidemiological and socio-demographic data are available.

Key-words: HIV infections, pregnant women, anonymous testing, Western Blotting.

Glossário de siglas e abreviaturas:

SIGLA	SIGNIFICADO
Ac	Anticorpo
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
Ag	Antígeno
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APOBEC3G	Polipeptídeo 3G catalítico, editor de apolipoproteína B <i>Apolipoprotein B–editing catalytic polypeptide 3G</i>
ARC	Complexo relacionado à Aids <i>Aids-related complex</i>
ARV	Antiretroviral
AZT	Zidovudina, azo-timidina
BED-EIA	Ensaio imunoenzimático de captura para quantificação da IgG anti- gp41 do HIV-1, subtipos B, E e D.
CAL	Calibrador
CCD-BM	Comissão Científica da Divisão de Biologia Médica
CD4	Grupo de diferenciação nº 4 <i>Cluster of Differentiation nº 4</i>
CDC	Centros para o Controle e Prevenção de Doenças <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEPIAL	Comissão de ética em pesquisa do Instituto Adolfo Lutz
CN	Controle negativo
CO	Valor de corte <i>Cut off</i>
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos
CRF	Forma recombinante circulante <i>Circulating recombinant form</i>
CTA	Centro de Testagem e Aconselhamento
CTCIAL	Comissão técnico-científica do Instituto Adolfo Lutz
DNA	Ácido desoxirribonucléico <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
DOP	Densidade óptica padronizada
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EIA	Ensaio imunoenzimático <i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Envelope
EUA	Estados Unidos da América
F(Ab)	Fração anticórpica
Fc	Fração cristalizável
FITC	Isotiocianato de fluoresceína <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Gag	Antígeno grupo-específico <i>Group-specific antigen</i>
GIAL	Gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz

Glossário de siglas e abreviaturas: continuação ...	
SIGLA	SIGNIFICADO
HIV	Vírus da imunodeficiência humana <i>Human immunodeficiency vírus</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano <i>Human T-lymphotropic vírus</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Intervalo de Confiança
ICTVdB	Comitê Internacional para a Taxonomia de vírus - base universal de dados relativos a vírus <i>International Comittée on Taxonomy of Viruses - Universal virus database</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IR	Índice de reatividade
IVAP	Produção de anticorpo <i>in vitro</i> <i>In vitro antibody production</i>
IVIAP	Produção induzida de anticorpo <i>in vitro</i> <i>In vitro induced antibody production</i>
KA	Constante de equilíbrio da ligação antígeno-anticorpo
Ka	Concentração molar do complexo antígeno-anticorpo
Kd	Concentração molar do antígeno e do anticorpo
LAV	Vírus associado à linfadenopatia <i>Lymphotropic-associated vírus</i>
LIS	Laboratório de Itapeverica da Serra
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade <i>Major hystocompatibility complex</i>
Nef	Fator negativo <i>Negative factor</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONG	Organização Não-Governamental
OR	Relação dos produtos cruzados <i>Odds Ratio</i>
OT	<i>Organon Teknika</i>
OTC	<i>Organon Teknika Corporation</i>
PACTG	Grupo de ensaios clínicos em Aids pediátrica <i>Pediatric Aids Clinical Trials Group</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos <i>Phosphate-buffered saline</i>
PF	Positivo forte
PFR	Positivo fraco
Pol	Polimerase
Rev	Regulador da expressão de proteínas virais <i>Regulator of expression of virus proteins</i>
RNA	Ácido ribonucléico <i>Ribonucleic acid</i>
SC-IAL	Amostras de soroconvertores analisadas no Instituto Adolfo Lutz

Glossário de siglas e abreviaturas: continuação ...	
SIGLA	SIGNIFICADO
SDS-PAGE	Gel de eletroforese de poli(acrilamida com dodecil-sulfato de sódio) <i>Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SIHIV	Sistema de notificação de HIV soropositivo do Estado de São Paulo
SIV	Vírus da imunodeficiência símia <i>Simian immunodeficiency vírus</i>
STARHS	Algoritmo de testes sorológicos para detecção de soroconversão recente para o HIV <i>Serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion</i>
Tat	Trans-ativador da transcrição <i>Transactivator of transcription</i>
Th	Célula T auxiliadora <i>T helper cell</i>
TNF	Fator de necrose tumoral <i>Tumor necrosis factor</i>
UDI	Usuário de droga injetável
UNAIDS	Programa conjunto das Nações Unidas para a Aids <i>United Nations Jointing Aids Program</i>
UNUSIDA	Programa da Organização das Nações Unidas para o combate à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Vif	Fator de infectividade viral <i>Virion infectivity factor</i>
Vpr	Proteína viral R <i>Viral protein R</i>
Vpu	Proteína viral U <i>Viral protein U</i>
WB	<i>Western blot; Western blotting</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde <i>World Health Organization</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA	3
1.2. SITUAÇÃO DA EPIDEMIA DE HIV/AIDS NO MUNDO E NO BRASIL	4
1.3. O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA	6
1.3.1 <i>Diversidade genética do HIV</i>	10
1.4. INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO: AFINIDADE E AVIDEZ	14
1.5. DINÂMICA DA RESPOSTA ANTICÓRPICA HUMANA CONTRA O HIV	15
1.6. DESENVOLVIMENTO DOS ALGORITMOS DE TESTES LABORATORIAIS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÕES INCIDENTES PELO HIV-1	22
1.6.1. <i>Métodos baseados em marcadores de infecção aguda</i>	23
1.6.2. <i>Métodos baseados em marcadores de infecção recente</i>	24
1.7. EMPREGO DE ALGORITMOS DE TESTES SOROLÓGICOS PARA A ESTIMAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE INFECÇÃO PELO HIV-1	35
OBJETIVOS	40
2. OBJETIVOS	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. CASUÍSTICA	43
3.2. MÉTODOS	44
3.2.1. <i>Detecção de anticorpos anti-HIV e avaliação dos índices de reatividade em ensaios realizados a partir de métodos Sensíveis</i>	44
3.2.2. <i>Metodologias utilizadas na etapa de confirmação sorológica</i>	47
3.2.3. <i>Detecção de anticorpos anti-HIV por meio do método menos sensível e identificação de amostras de infecção recente pelo HIV</i>	49
3.2.3. <i>Cálculo da estimativa da incidência de HIV-1</i>	52
3.2.4. <i>Teste de WB para a análise do padrão de bandas</i>	53
3.2.5. <i>Análise dos dados</i>	55
3.2.6. <i>Aspectos éticos da pesquisa</i>	56
4. RESULTADOS	58
4.1. DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA	58
4.2. ANÁLISE DO ÍNDICE DE REATIVIDADE EM TESTES DE ELISA SENSÍVEIS	60
4.3. IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE INFECÇÃO RECENTE	63
4.3.1. <i>Análise da reprodutibilidade do ensaio menos sensível em amostras de infecção recente</i>	67
4.4. ANÁLISE DA ESTIMATIVA DA INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO PELO HIV	68
4.5. ANÁLISE DO PERFIL DE BANDAS NO TESTE DE <i>WESTERN BLOT</i>	71
4.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO PROTOCOLO <i>STARHS</i> E O PERFIL DAS BANDAS NO <i>WB</i>	77
5. DISCUSSÃO	80
5.1. SOROPREVALÊNCIA E SOROINCIDÊNCIA DE HIV	84
5.1.2. <i>Amostras de soro de gestantes</i>	85
5.1.3. <i>Amostras de soro de usuários de CTA</i>	89
5.2. PERFIL DE BANDAS DO TESTE DE <i>WESTERN BLOT</i>	91
6. CONCLUSÕES	95
6.1. SOROINCIDÊNCIA DE INFECÇÃO PELO HIV	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1: Características demográficas dos indivíduos testados para diagnóstico de infecção pelo HIV e resultado de bandas no teste de Western blot.	59
Tabela 2: Valores do índice de reatividade (IR) obtido no ELISA sensível de 1ª e de 2/3ª geração, segundo os grupos de população avaliados.	60
Tabela 3: Resultado da avaliação da reatividade sorológica (IR) das amostras recentes e crônicas pelo HIV nos testes ELISA sensíveis de 1ª geração, por grupo de população analisada.	61
Tabela 4: Resultado da reatividade sorológica (IR) das amostras recentes e crônicas pelo HIV nos testes ELISA sensíveis de 2/3ª geração, por grupo de população analisada.	62
Tabela 5: Frequência de soroconversões recentes e crônicas para o HIV, segundo o resultado do protocolo STARHS e a procedência das amostras.	64
Tabela 6: Frequência de soroconversões recentes e crônicas para o HIV, segundo o resultado do protocolo STARHS e o ano de coleta das amostras de soro.	67
Tabela 7: Soroincidência (ajustada) de infecção pelo HIV entre as amostras de soro de gestantes, segundo o ano de coleta, de 1999 a 2002.	69
Tabela 8: Estimativa da soroincidência de infecção pelo HIV entre amostras de soro de gestantes e de usuários de CTA ⁽¹⁾ analisadas no Instituto Adolfo Lutz e no Laboratório Local de Itapeverica da Serra, respectivamente, selecionadas para o estudo; São Paulo, 1999-2002 e 2000-2001, respectivamente.	70
Tabela 9: Número e porcentagem de vezes em que foram observados os padrões de reatividade positivo forte, positivo fraco e negativo no teste de Western blotting para HIV, segundo o tempo de infecção pelo HIV e a fração antigênica (banda).	72
Tabela 10: Perfil da reatividade dos anticorpos séricos anti-HIV observado no teste de Western blot, segundo a procedência das amostras, o tempo de infecção pelo HIV e fração antigênica.	75
Tabela 11: Probabilidade (Odds Ratio) de ocorrência de bandas com perfil de reatividade "Negativo"/"Indeterminado" no teste de Western blotting realizado em amostras de soro classificadas como "Infecção Recente" no protocolo STARHS.	77
Tabela 12: Probabilidade (Odds Ratio) de ocorrência de grupos de bandas com perfil de reatividade "Positivo" no teste de Western blot realizado em amostras de soro classificadas como "Infecção Crônica" no protocolo STARHS.	78

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Estrutura do HIV-1 e frações detectáveis no ensaio de Western blotting	7
Figura 2: Organização do genoma do HIV-1	8
Figura 3: Distribuição geográfica dos tipos e subtipos genéticos do HIV. Os subtipos e as variantes mais prevalentes em cada região estão destacados em negrito. (Fonte: Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002; 97(2): 143-150).....	13
Figura 4: Curva da Densidade Óptica Padronizada (DOP) de amostras analisadas por meio da testagem dupla sensível/menos-sensível, empregando-se o reagente Abbott 3A11, em função do número de dias decorrentes da soroconversão (Adaptado de Janssen et al. 1988).....	26
Figura 5: Perfil das curvas de anticorpos anti-HIV no período pós-soroconversão, segundo o método de análise: sensível (DO) e menos sensível (DOP).....	30
Figura 6: Títulos de anticorpos em ensaio de Western blot. Soros de pacientes infectados pelo HIV-1 que soroconverteram recentemente (2-6 meses) ou que tinham infecção estabelecida (soropositividade documentada há mais de um ano) foram analisados em diluições seriadas na base 4 para determinar o título final (visual) contra as proteínas do HIV-1. Os títulos estão expressos como log ₂ (título/100) (Adaptado de Parekh et al., 2001b).	32
Figura 7: Comparação entre os valores das medianas da idade do grupo de soroconvertedores (SC-IAL), de gestantes (GIAL) e de usuários de CTA (LIS).	59
Figura 8: Comparação entre os valores do IR (Log ₁₀) das amostras nos testes de ELISA sensíveis de 1 ^a e de 2 ^a /3 ^a geração.	63
Figura 9: Distribuição das amostras de infecção recente e infecção crônica pelo HIV, segundo o grupo de população analisada.	65
Figura 10: Distribuição do número de infecções recentes e crônicas pelo HIV, segundo a faixa etária (anos) correspondente às amostras de soro analisadas.	66
Figura 11: Correlação entre os valores da DOP-inicial (ensaio de triagem) e da DOP-confirmatória, resultantes da avaliação de amostras de infecção recente pelo HIV por meio do protocolo STARHS-OT.	66
Figura 12: Avaliação da tendência da soroincidência da infecção pelo HIV com amostras de gestantes (% amostras-ano) analisadas no IAL de 1999 a 2002.....	69
Figura 13: Perfil de bandas presentes em 32 fitas do teste de Western Blot selecionadas por meio de sorteio a partir das 191 fitas referentes às amostras de soro analisadas. As fitas, agrupadas segundo o tipo de infecção (recente ou crônica), foram alinhadas de acordo com o valor crescente da Densidade Óptica Padronizada inicial (DOPI) observada no protocolo STARHS-OT. A: amostras de infecção recente (da esquerda para a direita, os números do WB são os seguintes: 107, 152, 111, 144, 100, 92, 154, 191, 3, 2, 142, 29, 160, 76 e 167). B: amostras de infecção crônica (da esquerda para a direita, os números do WB são os seguintes: 14, 54, 119, 136, 156, 12, 143, 99, 174, 73, 35, 39, 112, 122, 11, 114 e 133). Figura confeccionada empregando-se método descrito por Parekh (2006).....	74

ÍNDICE DE APÊNDICES:

- Apêndice 1:** Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais. (continua).....125
- Apêndice 2:** Imagens digitalizadas das fitas de reação do teste de Western Blot para HIV, realizado nas amostras de soro deste estudo - amostras nº 1 a 89 (redução de aproximadamente 50%)......131
- Apêndice 3:** Imagens digitalizadas das fitas de reação do teste de Western Blot para HIV, realizado nas amostras de soro deste estudo - amostras nº 90 a 179 (redução de aproximadamente 50%)......132
- Apêndice 4:** Imagens digitalizadas das fitas de reação do teste de Western Blot para HIV, realizado nas amostras de soro deste estudo - amostras nº 180 a 191 (redução de aproximadamente 50%)......133

ÍNDICE DE ANEXOS:

- Anexo 1:** Fluxograma de testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV - Brasil, Ministério da Saúde, SNPES, Divisão Nacional de DST - SIDA/AIDS, 1988...135
- Anexo 2:** Fluxograma de testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV - Brasil, Ministério da Saúde, SAS, PN-DST/AIDS, 1995.136
- Anexo 3:** Fluxograma de testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV - Brasil, Ministério da Saúde, SAS, PN-DST/AIDS - Portaria MS/SAS nº 488/98.....137
- Anexo 4:** Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa e Científico **Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 5:** Trabalho publicado.....**Erro! Indicador não definido.**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de vigilância epidemiológica têm sido desafiados constantemente a melhorar os métodos para o monitoramento das tendências da epidemia de HIV/Aids em todo o mundo. As informações disponíveis são baseadas, na sua maioria, em estudos transversais de soroprevalência os quais podem se constituir em uma ferramenta pobre para inferir sobre as tendências da epidemia ao longo do tempo em grupos populacionais em risco para a infecção. Medidas mais robustas da incidência podem prover informações para monitorar a epidemia de forma mais acurada, o que é crucial para identificar de forma ágil os grupos populacionais mais vulneráveis e para direcionar os programas de prevenção e controle.

Até recentemente, a incidência de infecção pelo HIV era avaliada por meio de estudos longitudinais em coortes de indivíduos soronegativos e por meio do monitoramento da soroprevalência entre indivíduos que freqüentam com periodicidade serviços de testagem sorológica. Contudo, a modificação de comportamentos sexuais de maior risco, com conseqüente redução da transmissão do HIV e de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), tem contribuído para o viés de seguimento observado nos estudos longitudinais tradicionais. Além dos efeitos da intervenção, estes estudos são geralmente dispendiosos, demorados e podem ser também ter seus resultados influenciados pela participação seletiva e pelas diferenças de perda no seguimento.

Uma nova metodologia para a avaliação da incidência da infecção pelo HIV-1 foi estabelecida em 1998, por Janssen e colaboradores. Esta nova metodologia, chamada de *Detuned-ELISA* ou *STARHS (Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion)*, inclui o emprego de um ensaio imunoenzimático modificado que permite a distinção entre infecções pelo HIV recentes e infecções antigas (ou estabelecidas/crônicas) a partir da análise de uma amostra individual de soro ou plasma, positiva para a

presença de anticorpos anti-HIV. A estimativa da incidência é então calculada por meio de um modelo matemático, com base na prevalência de infecções recentes identificadas em uma amostragem conhecida.

1.1. A síndrome da imunodeficiência adquirida

Em 1981, os Centros para o Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC - Centers for Disease Control) notificaram a ocorrência de casos de pneumonia pelo *Pneumocystis carinii* [posteriormente classificado como *Pneumocystis jiroveci* (Stringer *et al.*, 2002)] e de Sarcoma de Kaposi em homossexuais masculinos jovens previamente saudáveis, que passaram a apresentar um quadro de deficiência imunológica severa, linfadenopatia generalizada e uma acentuada diminuição do número absoluto de linfócitos T-auxiliadores no sangue periférico (CDC, 1981a; Durack *et al.*, 1981; Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981). Após a descrição dos primeiros casos, a imunodeficiência foi também observada em usuários de drogas injetáveis, receptores de transfusão, hemofílicos e crianças recém-nascidas de mães dependentes de drogas injetáveis (CDC, 1981b; CDC, 1982a, 1982b, 1982c). Ao final de 1982, a denominação "Síndrome da Imunodeficiência Adquirida" (Aids - Acquired Immunodeficiency Syndrome) já era utilizada para a descrição desta síndrome, cuja investigação epidemiológica determinou ser uma doença infecciosa transmitida por contato sexual, sangue e produtos do sangue.

Os esforços para a identificação do agente etiológico da Aids se concentraram inicialmente em agentes tais como o citomegalovírus e o vírus Epstein-Barr, mas subseqüentemente dirigiram-se para os retrovírus, tendo em vista que o então recém descoberto HTLV (HTLV - *Human T Lymphotropic Virus*), vírus causador da leucemia humana de células T, também infectava linfócitos T. Em 1983, Barré-Sinoussi e colaboradores (grupo de pesquisadores da França) demonstraram atividade de transcriptase reversa (DNA polimerase dependente de RNA) em sobrenadantes de culturas de linfócitos do sangue periférico de um paciente

com linfadenopatia. Em 1984, Gallo e colaboradores (EUA) demonstraram que uma linhagem de células T humanas era capaz de propagar o HIV, o que possibilitou grande avanço no isolamento e na identificação de partículas virais a partir do sangue de portadores de Aids.

Inicialmente, o vírus recebeu várias denominações. O grupo do Dr. Luc Montagnier, do Instituto Pasteur da França, o denominou de Vírus Associado à Linfadenopatia (LAV - *Lymphadenopathy-associated virus*); pesquisadores ligados ao grupo do Dr. Robert Gallo o denominaram Vírus T-Linfotrópico Humano do tipo III (HTLV-III - *Human T-lymphotropic virus type III*) e o grupo do Dr. Jay Levy o denominou Retrovírus Associado à Aids (ARV - *Aids-Associated Retrovirus*) (Levy *et al.*, 1984). Em 1986 foi proposta uma nomenclatura unificada para os vírus causadores de imunodeficiência humana e este agente passou a ser denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - *Human Immunodeficiency Virus*) (Coffin *et al.*, 1986). Ainda em 1986, um segundo vírus causador de imunodeficiência em humanos, também associado a Aids, foi descrito em países do oeste da África (Clavel *et al.*, 1986). Este novo vírus foi denominado HIV-2 e o primeiro foi subsequentemente renomeado, passando a ser chamado de HIV-1.

Neste trabalho, as siglas HIV e HIV-1 serão empregadas para designar o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1.

1.2. Situação da epidemia de HIV/Aids no mundo e no Brasil

Estimativas sugerem que cerca de 39,4 milhões de pessoas ao redor do mundo estão infectadas pelo HIV. Destas, 17,6 milhões são mulheres e 640.000 são crianças menores de 15 anos. Na África Sub-Saariana vivem cerca de 2/3 (25,4 milhões) do total de pessoas infectadas do mundo e cerca de 3/4 (13,2 milhões) de todas as mulheres infectadas do mundo (UNAIDS/WHO, 2004).

Na América Latina vivem cerca de 1,7 milhões de pessoas infectadas por HIV/Aids, sendo 640.000 mulheres. Duzentos e quarenta mil pessoas (adultos e crianças) contraíram infecção entre 2002 e 2004;

noventa e cinco mil pessoas morreram em 2004 por causas relacionadas à infecção pelo HIV. A prevalência de HIV/Aids entre os adultos é de 0,6% (0,5-0,8) (UNAIDS/WHO, 2004).

De acordo com os Boletins Epidemiológicos do Ministério da Saúde (Brasil, 2004), o primeiro caso de Aids do Brasil ocorreu em 1980, notificado anos depois da ocorrência, por meio da vigilância de óbitos (Brasil, 1987). Os primeiros relatos de casos de Aids diagnosticados no Brasil foram feitos em São Paulo, em 1982 (Petri *et al.*, 1984). Pouco tempo depois, outros casos de imunossupressão em adultos homossexuais foram relatados, sendo descritos como casos autóctones de Aids (Amato Neto *et al.*, 1983; Gonçalves Junior *et al.*, 1983).

Hoje, no Brasil, a epidemia de HIV/Aids está presente em todas as regiões com distribuição heterogênea. Um terço (cerca de 600.000) de todas as pessoas infectadas pelo HIV na América Latina vive no Brasil (UNAIDS/WHO, 2004), onde a transmissão heterossexual é responsável pela maioria das transmissões (Brasil, 2002).

Em 1990, o governo de São Paulo iniciou a distribuição do AZT (zidovudina), droga antiretroviral indicada para o tratamento a partir de 1989. Um ano depois, o Ministério da Saúde iniciou a distribuição do AZT e do ddl (didanosina) em todo o país. Com a publicação da chamada Lei Sarney (Lei nº 9.313/96) em 13 de novembro de 1996 (Brasil, 1996), o governo brasileiro passou a garantir, no âmbito do território brasileiro, a distribuição gratuita e universal de drogas antiretrovirais a todas as pessoas infectadas pelo HIV. Desde 1996, o Ministério da Saúde tem implementado em todo o território nacional a testagem sorológica para a pesquisa de anticorpos anti-HIV (anti-HIV) em mulheres grávidas durante o pré-natal e no momento do parto, como estratégia para controlar a transmissão vertical do HIV por meio da profilaxia padronizada durante o estudo PACTG 076 (Connor *et al.*, 1994).

Esforços têm sido envidados pelo governo brasileiro para a implementação e o aprimoramento dos sistemas de vigilância epidemiológica, sendo obrigatória a notificação dos casos de Aids (Brasil, 1986) e dos casos de gestante HIV+ e crianças expostas (Ministério da Saúde, 2001). Estudos de soroprevalência para o HIV em populações

sentinela têm sido realizados anualmente. Estes estudos têm monitorado, de forma amostral, os usuários de clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (DST), parturientes e pacientes de prontos-socorros. No quadro abaixo encontram-se os dados de soroprevalência, segundo o grupo populacional, obtidos nas avaliações de cortes realizados sempre no mês de outubro, dos anos de 1997 a 2000 (Brasil, 2000):

Quadro 1: Estudo da soroprevalência para o HIV em populações sentinelas do Brasil, de 1997 a 2.000:

CORTE	GRUPO	TOTAL DE AMOSTRAS	SOROLOGIA POSITIVA		INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
			Nº	%	
1997	DST	6.102	205	3,36	[2,91 - 3,81]
	Parturiente	10.234	89	0,87	[0,69 - 1,05]
	Pronto-socorro	7.941	342	4,31	[3,86 - 7,75]
1998	DST	6.327	179	2,83	[2,42 - 3,24]
	Parturiente	10.218	61	0,60	[0,45 - 0,75]
	Pronto-socorro	8.214	217	2,64	[2,30 - 2,99]
1999	DST	6.711	198	2,95	[1,44 - 2,06]
	Parturiente	11.222	91	0,81	[0,59 - 0,90]
	Pronto-socorro	8.688	248	2,85	[2,08 - 2,72]
2000	DST	4.636	124	2,67	[2,21 - 3,14]
	Parturiente	15.426	88	0,57	[0,45 - 0,69]

1.3.O Vírus da Imunodeficiência Humana

O HIV é um vírus envelopado que mede 80-120 nm de diâmetro (Figura 1) e tem tropismo por linfócitos T CD4+ e monócitos. Ele pertence ao Grupo de Lentivírus de Primatas, gênero *Lentivirus*, subfamília *Orthoretrovirinae*, família *Retroviridae* (ICTVdB, acessado em 01/09/05). Seu genoma é formado por RNA de fita simples, dimérico, protegido por uma cápsula protéica (capsídeo, cerne ou *core*) que aparece em preparações de microscopia eletrônica com formato caracteristicamente cilíndrico, o que diferencia o HIV dos demais retrovírus, que apresentam capsídeo esférico. Por meio de técnicas imunológicas como Western Blotting (WB) ou radioimuno-precipitação (RIPA), podem ser discriminadas 9 frações

antigênicas que compõem a estrutura do HIV (Figura 1), as quais são largamente empregadas para fins de imunodiagnóstico e estudos da resposta imunológica contra o vírus.

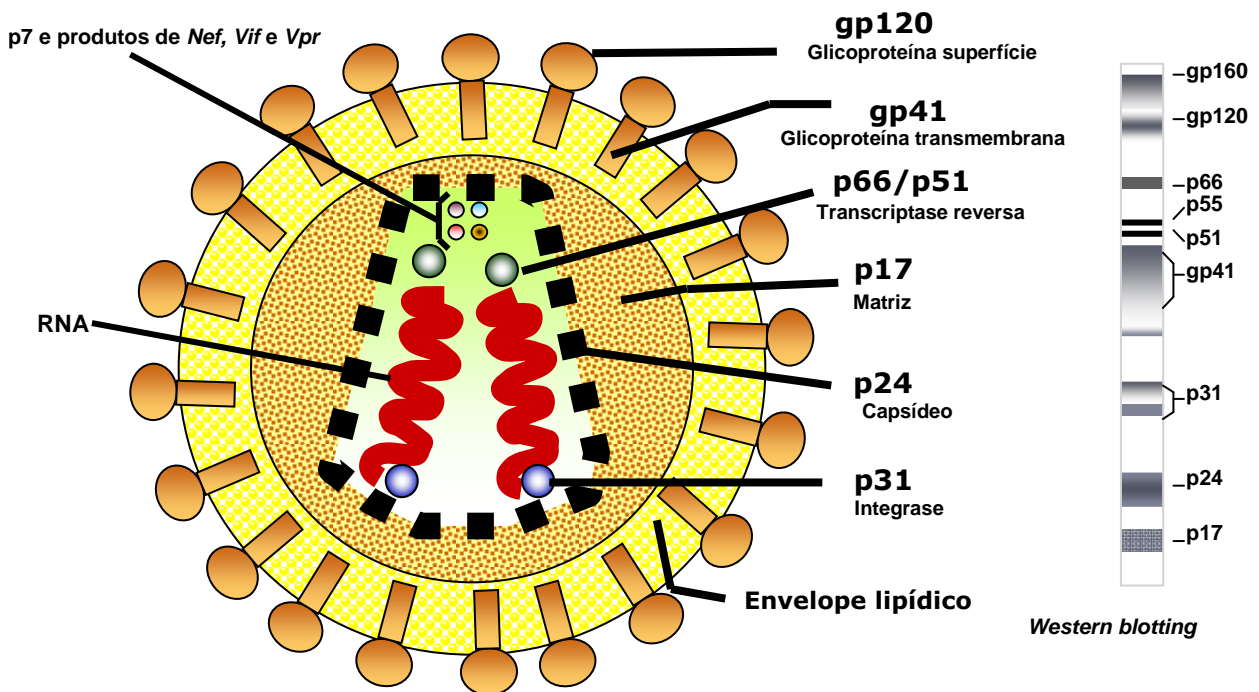


Figura 1: Estrutura do HIV-1 e frações detectáveis no ensaio de Western blotting

O genoma do HIV contém aproximadamente 9.200 nucleotídeos (Figura 2) e está organizado em 3 genes estruturais - *Gag* (*group-specific antigen*), *Pol* (*polymerase*) e *Env* (*envelope*), e seis genes acessórios auxiliares - *Tat* (*transactivator of transcription*), *Rev* (*regulator of expression of virus proteins*), *Vif* (*virion infectivity factor*), *Nef* (*negative factor*), *Vpr* (*viral protein R*) e *Vpu* (do inglês: *viral protein U*).

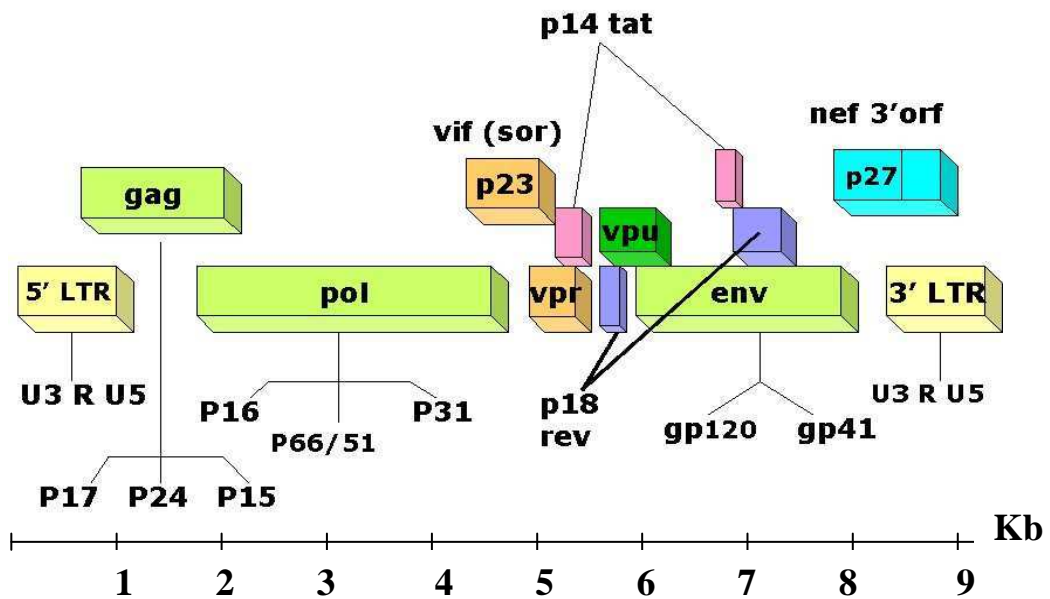


Figura 2: Organização do genoma do HIV-1

O gene *Gag* codifica a síntese de uma poliproteína precursora de 55Kd (p55), a qual é clivada pela protease viral dando origem às proteínas da matriz viral (p17), do capsídeo (p24), do núcleo-capsídeo (p7), à p6 e, ainda, aos dois peptídeos espaçadores p1 e p2 (Freed, 2001).

As enzimas codificadas pelo gene *Pol* são inicialmente sintetizadas na forma de uma poliproteína precursora de alto peso molecular, denominada p160gag-Pol. O precursor p160gag-Pol é clivado pela protease viral, dando origem às enzimas individuais codificadas pelo gene *Pol*: protease (p16), transcriptase reversa (p51/66) e integrase/endonuclease (p31) (Freed, 2001).

As glicoproteínas do envelope viral são codificadas pelo gene *Env* e são responsáveis pela adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira. As glicoproteínas do envelope viral são também sintetizadas na forma de uma poliproteína precursora, de peso molecular 160Kd (gp160). Diferentemente

da proteína precursora *Gag-Pol*, a gp160 é clivada por uma protease celular, durante o transporte para a superfície da célula infectada, resultando na geração da glicoproteína de superfície gp120 e da glicoproteína da porção transmembrana, gp41. A gp120 contém os epítomos que interagem com o receptor e o co-receptor celular, promovendo a adsorção do vírus à superfície da célula hospedeira. A gp41 ancora o complexo gp120/gp41 na membrana viral e contém domínios que são críticos para as reações de catálise entre as membranas lipídicas do vírus e da célula hospedeira durante a entrada do vírus (fusão) (Freed, 2001).

Os genes *Tat*, *Rev*, *Vif*, *Nef*, *Vpr* e *Vpu* codificam a síntese de 6 proteínas que induzem a produção de anticorpos em pessoas infectadas: p14 (*Tat*), p18 (*Rev*), p23 (*Vif*), p27 (*Nef*), p14 (*Vpr*) e p16 (*Vpu*). Os genes *Tat* e *Rev* são considerados regulatórios enquanto *Vif*, *Nef*, *Vpr* e *Vpu* são considerados genes auxiliares ou acessórios, devido ao fato de serem dispensáveis para a replicação viral em diversos sistemas *in vivo*. Todavia, vários estudos com modelos animais e modelos *ex vivo* têm demonstrado que estes genes desempenham papéis importantes na replicação viral *in vivo* e no desenvolvimento da Aids, por meio de mecanismos complexos (Ueno e Sakai, 2002; Rücker *et al.*, 2004).

O produto do gene *Tat* atua nas fases de transcrição e pós-transcrição, regulando a síntese de todas as proteínas virais; o produto do gene *Rev* regula seletivamente os genes estruturais *Gag*, *Pol* e *Env*, por meio de um mecanismo de regulação pós-transcricional (Hehlmann, 1990).

O gene *Vif* é essencial para a replicação viral eficiente em culturas celulares primárias e também *in vivo*. O produto da sua decodificação é responsável pela inibição de uma citidina-deaminase celular denominada APOBEC3G (do inglês, *apolipoprotein B–editing catalytic polypeptide 3G*), cuja atividade produz hiper-mutações na fita simples de DNA viral gerada durante a retrotranscrição (Sheehy *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2003; Sawyer, *et al.*, 2004). O produto do gene *Nef* regula negativamente a expressão de CD4, promove a infectividade viral, altera o estado de ativação celular e interfere com a apresentação do antígeno no nível do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC). O produto do gene *Vpr* interfere com o

processo mitótico bloqueando a fase G2; além disso, promove a infecção de macrófagos, ativa a transcrição do HIV e induz ao processo de apoptose. O produto do gene *Vpu* promove a liberação dos vírions por meio da inibição de fatores restritivos da célula e modula negativamente a expressão de CD4 nas fases avançadas da infecção pelo HIV-1 (Rücker, 2004).

1.3.1 Diversidade genética do HIV

O HIV apresenta uma extraordinária variabilidade genética. Este agente tem sido classificado, de acordo com propriedades imunológicas e análises filogenéticas, em dois tipos: HIV tipo 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2). As cepas do HIV-1 são classificadas em 3 grupos: M (*major* ou *main*), O (*outlier*) e N (*new* ou *non-M/non-O*). As cepas dos grupos O e N foram isoladas de pacientes oriundos dos Camarões (De Leys *et al.*, 1990; Charneau *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998). Cepas do grupo M do HIV-1 têm sido isoladas em todo o mundo, sendo responsáveis pela pandemia de Aids.

Os isolados do grupo M são divididos em subtipos genéticos ou clados, filogeneticamente equidistantes entre si (Los Alamos National Laboratory - *HIV sequence Database*, [disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov>]). Devido à diversidade crescente das seqüências dos isolados do grupo M e da existência de formas recombinantes e de subgrupos divergentes dentro de cada subtipo, o sistema de nomenclatura tem sido atualizado constantemente. Se aceita atualmente que existam 9 subtipos “puros” (HIV-1, subtipos A ao D, F ao H, J e K), que não contêm recombinações, e ao menos 16 formas recombinantes circulantes (CRFs), resultantes da recombinação entre subtipos e entre CRFs entre si. e que foram isoladas ou identificadas em três ou mais pessoas não relacionadas epidemiologicamente (Robertson, *et al.*, 2000; *HIV sequence Database/nomenclature overview*). Os subtipos também têm sido sub-classificados em sub-subtipos, de acordo com análises filogenéticas mais detalhadas. Assim,

o subtipo A é subdividido em A1 e A2 e o subtipo F é subdividido em F1 e F2 (Triques *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2001).

Por meio da análise mais detalhada do genoma viral, verificou-se que o subtipo E é, na verdade, uma CRF de alta prevalência, a qual tem sido designada como CRF01_AE (Robertson *et al.*, 2000). As CRFs são designadas com números, na ordem em que as mesmas foram descritas. Atualmente, existem 16 CRFs enumeradas pelo *HIV sequence Database* (Quadro 2). Para a definição de um novo subtipo, sub-subtipo ou CRF, as cepas representativas devem ser identificadas em ao menos três indivíduos não relacionados epidemiologicamente.

Existem ainda as variantes intra-subtipo, insuficientemente distantes do ponto de vista filogenético para serem classificadas como um novo subtipo ou sub-subtipo, porém apresentando diferenças do ponto de vista genético e imunológico. Assim, temos, por exemplo, a variante B'' circulante no Brasil (Potts *et al.*, 1993; Morgado *et al.*, 1994) e a variante B', circulante na Tailândia (Kalish *et al.*, 1995; Graf *et al.*, 1998).

A diversidade genética do HIV pode modificar as propriedades biológicas dos isolados, como a virulência, a transmissibilidade e a imunogenicidade, sendo responsável por problemas no diagnóstico, monitoramento, tratamento e desenvolvimento de vacinas (Alaeus *et al.*, 1998; Apetrei *et al.*, 1996; Apetrei *et al.*, 1998; Loussert-Ajaka *et al.*, 1994; Morgado *et al.*, 2002; Gaudy, 2004).

O HIV-2 é bastante distinto do HIV-1. Enquanto o HIV-1 está mais próximo filogeneticamente dos vírus da imunodeficiência símia (SIV) isolados de chimpanzés [*Pan Troglodytes spp.* e *Pan paniscus* (chimpanzé anão)], o HIV-2 está mais próximo dos SIV isolados do primata Sooty Mangabey (*Cercocebus torquatus atys*). O HIV-2 é classificado em grupos - A ao G, sem divisão em subtipos. A distância filogenética entre os grupos do HIV-2 sugere que os mesmos tenham originado-se de eventos independentes de transmissão do Sooty Mangabey ao homem, da mesma forma como se suspeita em relação aos grupos do HIV-1 e sua transmissão do chimpanzé ao homem (*HIV sequence Database/nomenclature overview*).

No Brasil, estudos de epidemiologia molecular demonstraram a existência de diferentes subtipos e mosaicos circulantes na população, com distribuição heterogênea nas diferentes regiões geográficas (Sabino *et al.*, 1994; Potts *et al.*, 1994; Galvão-Castro *et al.*, 1996; Morgado *et al.*, 1998; Couto-Fernandes *et al.*, 1999; Bongertz *et al.*, 2000; Rossini *et al.*, 2001; Turchi *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003a; Brindeiro *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003b; Sa Filho *et al.*, 2005.) (Figura 3). Considerando-se o território nacional, o subtipo de maior prevalência é o B (~85% dos casos), composto das variantes B e B'' (ou B_{BR}), sendo seguido, em ordem decrescente, pelos subtipos F (10-15% dos casos), C, D, A e formas recombinantes B/C e B/F (~5% de todos os casos). Recentemente, duas cepas compatíveis com a caracterização de CRF (identificadas em 3 indivíduos não relacionados epidemiologicamente) foram descritas a partir da análise de amostras de indivíduos da cidade de Santos-SP (De Sa Filho *et al.*, 2006).

Quadro 2: Formas recombinantes circulantes (CRFs) do HIV-1, grupo M, atualmente designadas:

Nome	Cepa de referência	Subtipos/CRFs recombinados
CRF01_AE	MC240	A, E
CRF02_AG	IBNG	A, G
CRF03_AB	KAL153	A, B
CRF04_cpx	94CY032	A, G, H, K, U
CRF05_DF	VI1310	D, F
CRF06_cpx	BFP90	A, G, J, K
CRF07_BC	CN54	B', C
CRF08_BC	GX-6F	B', C
CRF09_cpx	96GH2911	<i>Não publicado ainda</i>
CRF10_CD	TZBF061	C, D
CRF11_cpx	GR17	A, CRF01_AE, G, J
CRF12_BF	ARMA159	B, F
CRF13_cpx	96CM-1849	A, CRF01_AE, G, J, U
CRF14_BG	X397	B, G
CRF15_01B	99TH.MU2079	CRF01_AE, B
CRF16_A2D	KISII5009	A2, D

Fonte: HIV sequence Database/The circulating recombinant forms [<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>] Acessado em 09/04/2006.



Figura 3: Distribuição geográfica dos tipos e subtipos genéticos do HIV. Os subtipos e as variantes mais prevalentes em cada região estão destacados em negrito. [Fonte: Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002; 97(2): 143-150].

1.4. Interação antígeno-anticorpo: afinidade e avides

A medida da força de ligação entre um determinante antigênico (epítopo) e o sítio de ligação da fração F(Ab) de uma molécula individual de anticorpo em um complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac) é chamada de afinidade. A afinidade é definida como a concentração molar de antígeno necessária para a ocupação de metade dos sítios anticórpicos em equilíbrio, em condições de temperatura, pressão, pH e solubilidade constantes. A constante de equilíbrio da ligação Ag-Ac (KA) é igual à relação entre a concentração molar do complexo (Ka) e as concentrações molares do antígeno e do anticorpo (Kd) no estado de equilíbrio da mistura de antígeno e anticorpos ($KA=Ka/Kd$).

Há, no soro, uma mistura de anticorpos de diferentes afinidades para um antígeno específico. A afinidade média da população de anticorpos irá aumentar com a estimulação antigênica repetida, por meio de um fenômeno conhecido como maturação da afinidade.

Antígenos naturais geralmente contêm mais do que um determinante, portanto interagem com mais do que uma molécula de anticorpo. Para uma molécula de IgG ou IgE a ligação pode envolver, no máximo, dois sítios de ligação, pois só há 2 regiões de combinação em cada molécula de anticorpo. Para a IgM, no entanto, um único anticorpo poderia ligar-se a até 10 sítios diferentes. A força total da ligação, neste caso, deve levar em consideração as ligações de cada um dos sítios que interagem. A somatória destas forças de ligação é chamada de avides, que é então dependente da afinidade e da valência do anticorpo. A avides é diretamente proporcional à afinidade e aumenta na medida em que a resposta imunológica amadurece, devido a estimulação antigênica repetida.

A maturação da afinidade é uma propriedade da resposta humoral a antígenos protéicos. Ela é medida ao nível da resposta de anticorpos como um todo, ou seja, da população de anticorpos. Este processo ocorre por meio de ajustes finos durante a resposta secundária, mediados por

mutações somáticas caracterizadas pelo rearranjo no DNA codificador de imunoglobulinas em linfócitos B individuais, antígeno-estimulados.

1.5. Dinâmica da resposta anticórpica humana contra o HIV

A avidéz da ligação Ag-Ac, ou afinidade funcional de anticorpos policlonais específicos detectados no período pós-infecção primária, na re-infecção ou na imunização tem sido empregada para o estudo da dinâmica da resposta imune humoral em mamíferos há décadas (Eisen e Siskind, 1964; Rodkey e Freeman, 1970). Com base no perfil da avidéz dos anticorpos, várias técnicas foram padronizadas para a identificação das fases de infecção por agentes virais e parasitários (Lehtonen e Meurman, 1982; Inoue *et al.*, 1984; Morgan-Capner *et al.*, 1985; Rousseau e Hedman, 1988; Thomas e Morgan-Capner, 1988; Hedman *et al.*, 1989; Camargo *et al.*, 1991).

Uma vasta literatura a respeito da resposta imune humoral anti-HIV tem sido produzida desde o isolamento e a caracterização do vírus. A infecção por HIV/Aids induz a produção de anticorpos específicos contra as proteínas estruturais do vírus, que podem ser detectados em diferentes ensaios laboratoriais (Sarngadharan *et al.*, 1984; Kitchen *et al.*, 1984; Laurance *et al.*, 1984; Cheingsong-Popov *et al.*, 1984; Sandstrom *et al.*, 1985). A resposta humoral contra o HIV é caracterizada pela produção de imunoglobulinas das classes IgM, IgG (IgG1-4), IgA e IgE de forma sistêmica ou compartimentalizada e que são encontradas no soro, líquido cefalorraquidiano, urina, saliva, leite materno e secreções mucosas em concentrações variadas, dependendo da fase de infecção e dos métodos de coleta e detecção (McDougal *et al.*, 1987; Parry *et al.*, 1987; Biniek *et al.*, 1988; Connel *et al.*, 1990; Mathiesen *et al.*, 1990; Carbonara *et al.*, 1993; Elovaara *et al.*, 1993; Connel e Parry, 1994; Becquart *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 2000; Raux *et al.*, 2000; Mestecky *et al.*, 2004).

Amostras de soro/plasma seqüenciais, provenientes de pacientes infectados pelo HIV em diferentes estágios da infecção (desde a exposição até o óbito), têm sido analisadas com o intuito de identificar marcadores da resposta humoral contra o HIV, associados à progressão da doença. Estes estudos demonstraram que a soroconversão para os anticorpos anti-HIV ocorre geralmente em até 2 meses após a exposição documentada, podendo ocorrer, em casos raros, até 6 meses depois (Busch e Satten, 1997; Fiebig *et al.*, 2003) e que o padrão da resposta de anticorpos é regulado de maneira diferenciada, de acordo com o grupo do antígeno (McDougal *et al.*, 1987; Broliden *et al.*, 1989; Allain *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1998).

McDougal e colaboradores (1987) realizaram um dos primeiros estudos com a finalidade de analisar a correlação da resposta de anticorpos anti-HIV com a progressão da doença. Avaliando isotipos de imunoglobulinas (IgG1-4, IgA e IgM) anti-HIV em amostras de pacientes em diferentes categorias clínicas por meio de um ensaio de imunoblot, estes autores observaram que os anticorpos dirigidos contra a gp110, p24 e p51/p65 apresentavam padrões de maturação e variação dos títulos de acordo com os estágios da doença. Além disso, o perfil dos isotipos de imunoglobulinas contra antígenos específicos (Western blot) reproduziu o mesmo perfil observado para o *pool* de imunoglobulinas, sendo influenciado pelas mudanças dos níveis de anticorpos totais nos vários estágios da doença.

Allain e colaboradores (1991) estudaram o perfil da resposta contra antígenos recombinantes derivados dos genes *Env* (gp120 e gp41), *Pol* (p66 e p31) e *Gag* (p24 e p17) em 22 indivíduos, por um período de 3 a 6 anos após a soroconversão. Durante o seguimento, 6 pacientes desenvolveram sintomas clínicos relacionados à infecção pelo HIV e 16 permaneceram assintomáticos, caracterizando assim dois grupos distintos. Comparando a resposta imune, verificou-se que os anticorpos anti-gp120, anti-gp41 e anti-p31 atingiam níveis máximos cerca de 6 meses após a soroconversão, mantendo-se estáveis durante todo o tempo de seguimento nos dois grupos. Por outro lado, anticorpos anti-p66, p24 e p17, após

atingirem níveis máximos, mantiveram-se em níveis estáveis no grupo de pacientes assintomáticos e declinaram no grupo de sintomáticos, mantendo-se em níveis mais baixos durante o período de monitoramento.

Chargelegue e colaboradores (1993) estudaram a resposta de IgG contra a p17, em um seguimento de 6 anos (1986-1993), em 12 pacientes hemofílicos infectados pelo HIV-1 que soroconverteram entre 1982 e 1985. Neste estudo, observou-se um perfil similar no desenvolvimento e na manutenção dos títulos de anticorpos contra a p17 e a p24. Entre os indivíduos que desenvolveram Aids, o declínio nos títulos de anti-p17 precedeu em muitos anos a queda das contagens de células T CD4 para abaixo de 200 células/ μ L; por outro lado, entre os pacientes assintomáticos de longo termo foram observados títulos crescentes de IgG anti-p17 e contagem estável de células T CD4. Amostras de pacientes que desenvolveram Aids durante o estudo caracterizaram-se pela avidéz mais baixa de IgG anti-p17 comparativamente às amostras de pacientes que permaneceram assintomáticos. Estes resultados sugerem que a avidéz da IgG anti-Gag poderia ser de importância para a resistência do hospedeiro ao desenvolvimento da Aids e, conseqüentemente, de relevância para o prognóstico.

Chargelegue e colaboradores (1995) estudaram também a afinidade de anticorpos anti-Gag nas amostras desses pacientes (hemofílicos; HIV+; n=15), acompanhados durante 9 anos (1984-1993). Neste estudo, a afinidade de anticorpos anti-p24 e p17 foi cerca de 100 vezes maior em pacientes assintomáticos do que entre aqueles que desenvolveram Aids. Os pacientes que desenvolveram Aids perderam precocemente ou nem mesmo chegaram a desenvolver anticorpos de alta afinidade. Entre os assintomáticos, a maioria manteve anticorpos circulantes de alta afinidade por diversos anos, sendo que em alguns a afinidade de anti-p24 e anti-p17 decaiu subseqüentemente ao longo do estudo. A presença de anticorpos de baixa afinidade e a redução progressiva dos títulos de anticorpos específicos foram preditores mais precoces para a progressão da doença do que a contagem de células T CD4.

Thomas e colaboradores (1996) analisaram a avidéz da IgG anti-HIV em um teste de ELISA, preparado com antígenos recombinantes, com o objetivo de identificar infecção recente pelo HIV-1. Estudando amostras seqüenciais de 7 indivíduos logo após a soroconversão ou manifestação de doença aguda compatível com a infecção pelo HIV, os pesquisadores demonstraram que o índice de avidéz de anticorpos anti-gp41 aumentou gradativamente durante os primeiros meses, com variações individuais entre os pacientes. Com relação à p24 e p17, em contraste com os resultados observados para os índices de avidéz de anti-gp41, somente um dos soroconvertores desenvolveu anticorpos de alta avidéz contra estes dois antígenos simultaneamente. De 45 amostras provenientes de casos de infecção crônica, 10 não continham anti-p24 em quantidade suficiente para a análise de avidéz, sendo a maioria amostras de pacientes que apresentavam sintomatologia de Aids ou ARC; 21 amostras apresentaram altos índices de avidéz de anti-24, sendo que nenhuma delas era de caso de Aids ou ARC e 14 amostras apresentaram baixa avidéz para anti-p24, sendo que 8 eram provenientes de casos de Aids/ARC. Todas estas amostras continham anticorpos anti-gp41 de alta avidéz. Desta forma, estes autores concluíram que a avidéz de anticorpos anti-gp41 poderia ser empregada para diferenciar casos de infecção recente dos casos de infecção "remota" ou crônica pelo HIV.

Juompan e colaboradores (1998) estudaram o padrão de expressão de anticorpos anti-gp160 - títulos e repertório V_{H3}^+ presente na porção Fc dos isotipos de imunoglobulinas específicas - em amostras seqüenciais (7 anos de seguimento) de 11 pacientes infectados pelo HIV-1, classificados, quanto ao desenvolvimento de condições definidoras de Aids, em progressores lentos (n = 5) e progressores rápidos (n = 6). Eles observaram que os progressores rápidos apresentaram um declínio gradual nos títulos de anti-gp160, notavelmente no repertório de imunoglobulinas V_{H3}^+ . Com base nestas observações, estes autores concluíram que o agravamento da doença estava associado ao decréscimo da magnitude da resposta humoral e que os anticorpos V_{H3}^+ desempenham um papel

importante na proteção, sendo que a diminuição da sua expressão acelera a progressão da doença.

Weber e colaboradores (1987) analisaram amostras seqüenciais de 48 pacientes infectados pelo HIV-1, coletadas durante 3 anos (1982/3 a 1985/6) e observaram que aqueles que permaneceram livres de sintomas, em comparação àqueles que manifestaram sintomas de Aids ou ARC (*Aids-related complex*; Complexo Relacionado à Aids), tiveram títulos de anticorpos anti-p24 significativamente mais altos durante os 3 anos. Os pacientes assintomáticos também apresentaram uma tendência ao aumento da capacidade neutralizante de anticorpos. Não foi observada correlação entre os títulos de anti-gp41 e as manifestações clínicas; mesmo nos casos em que os pacientes manifestaram sinais de Aids/ARC, os títulos de anti-gp41 permaneceram inalterados.

Broliden e colaboradores (1989) avaliaram amostras seqüenciais de 20 pacientes infectados pelo HIV, coletadas durante 2 anos. Ao entrar no estudo, todos os indivíduos apresentavam quadro de linfadenopatia generalizada; ao término do período de seguimento, 11 deles apresentavam quadro definidor de Aids. Os autores observaram um decréscimo na reatividade de anticorpos anti-p17 e anti-p24 nos pacientes que desenvolveram quadro de Aids durante o seguimento. Neste estudo foram analisadas as reatividades das subclasses de IgG contra os antígenos do HIV-1 e os pesquisadores observaram que a IgG1 específica (todos os antígenos) é majoritária em relação às demais subclasses e que os títulos decaem com a progressão da doença; também foi observado que a IgG3 é produzida principalmente contra os antígenos do core viral (anti-p17 e anti-p24) e permanece em níveis estáveis durante todo o período de doença, mesmo na fase terminal.

Binley e colaboradores (1997), estudaram a dinâmica da regulação da produção de anticorpos anti-Gag e anti-Env em pacientes infectados pelo HIV-1 de diferentes coortes (soroconvertores agudos, não-progressores de longo termo, progressores rápidos e crônicos tratados com inibidores de protease (IP)). Estes autores observaram que os títulos de anticorpos dirigidos contra p17 e p24 (Gag) atingiam níveis máximos cerca

de 200 dias após a soroconversão, decaindo gradualmente e oscilando em níveis mais baixos durante o tempo de seguimento (cerca de 1.000 dias). Com relação aos títulos de anticorpos anti-gp41 e anti-gp120 (*Env*), observou-se que os níveis aumentavam gradualmente no período pós-soroconversão, atingindo os níveis máximos após 400 dias, mantendo-se estáveis durante todo o tempo de seguimento, mesmo para a coorte de pacientes tratados. O aumento e a diminuição dos títulos de anti-*Env* e anti-*Gag* não se relacionaram com alterações da viremia plasmática, ao menos na faixa detectável, sendo que os mesmos não se alteraram pelo tratamento com os inibidores da protease.

Cole e colaboradores (1998), estudando a dinâmica da maturação da resposta humoral contra proteínas do envelope do HIV-1 pós-soroconversão, observaram que tanto em progressores rápidos, como em progressores lentos, o título e a avidéz de anticorpos da classe IgG anti-envelope elevavam-se durante os primeiros 5 meses pós-soroconversão, mantendo níveis estáveis durante o período em que foi realizado o seguimento (20 meses).

Sheppard e colaboradores (1991) estudaram a dinâmica dos títulos de anticorpos anti-p24 e das concentrações plasmáticas de neopterinina (marcador de ativação imunológica celular inespecífica) em amostras de voluntários participantes de uma coorte prospectiva de homossexuais masculinos. Ao longo do período de seguimento, a incidência de Aids foi de 60% entre os pacientes que apresentavam, no início do estudo, títulos baixos de anti-p24 e concentrações altas de neopterinina; 34% entre aqueles que apresentavam títulos baixos de anti-p24 ou altas concentrações de neopterinina isoladamente; e 10% entre os pacientes que tinham títulos altos de anti-p24 e baixas concentrações de neopterinina. De acordo com as conclusões dos autores, estes dados sugerem que as respostas iniciais, específica contra o HIV e inespecífica de ativação celular, são preditores independentes que interagem para determinar o curso da progressão da doença.

Com base nesses resultados foi possível o estabelecimento da correlação entre a dinâmica da resposta humoral específica e as fases da

infecção causada pelo HIV, os quais têm sido empregados para estabelecer marcadores de diagnóstico e de prognóstico.

Em nosso meio, Caterino-de-Araujo (1993) estudou o perfil da especificidade dos anticorpos anti-HIV secretados por células mononucleares do sangue periférico de indivíduos adultos e de crianças expostas ao HIV no período perinatal. Empregando o método de *Western Blotting*, a pesquisadora avaliou os anticorpos dirigidos contra as frações antigênicas do HIV-1, presentes no sobrenadante de cultivos celulares de ensaios de produção espontânea e induzida de anticorpos *in vitro* (IVAP e IVIAP, respectivamente).

No ensaio de IVAP, foram identificados anticorpos dirigidos contra antígenos codificados pelos genes *Gag*, *Env* e *Pol* do HIV-1. No ensaio de IVIAP, apenas a reatividade contra antígenos do gene *Pol* foi observada. O fato foi atribuído ao consumo de anticorpos secretados para a formação de imunocomplexos junto aos antígenos imobilizados na placa de cultivo celular (empregados para a ativação das células B), constituídos em sua maior parte por frações derivadas dos genes *Gag* e *Env*. A autora verificou, em ambos os ensaios, que a produção dos anticorpos anti-HIV *in vitro* não estava relacionada com o estágio clínico da doença nem com a idade dos pacientes estudados. Neste estudo, empregando-se o ensaio de IVIAP, foi possível induzir a produção de anticorpos anti-HIV por células do sangue de dois indivíduos em fase aguda de infecção pelo HIV, cujas amostras de plasma eram negativas na pesquisa de anticorpo e positivas na pesquisa de antígeno p24. Posteriormente, estes dois indivíduos apresentaram soroconversão para o HIV.

Estes dados sugerem que mecanismos complexos estão envolvidos na expressão dos anticorpos anti-HIV no plasma dos indivíduos infectados e que ela depende da variabilidade individual que determina o grau de competência para a resposta imunológica humoral e da estimulação antigênica, proporcionada pela produção e circulação de frações virais imunogênicas durante o curso da infecção.

1.6. Desenvolvimento dos algoritmos de testes laboratoriais para a identificação de infecções incidentes pelo HIV-1

Os sistemas de vigilância epidemiológica têm sido desafiados a melhorar constantemente os métodos de monitoramento das tendências da epidemia causada pelo vírus da imunodeficiência humana. Em geral, as informações epidemiológicas disponíveis são baseadas em estudos transversais de prevalência e variam consideravelmente, dependendo das condições locais (Walker *et al*, 2001). Porém, os dados de soroprevalência, isoladamente, podem não ser suficientes para inferir sobre as tendências da epidemia de HIV/Aids ao longo do tempo em grupos populacionais específicos em risco para a infecção (Heyward *et al*, 1994; Batter *et al.*, 1994, McDougal *et al*, 2005). As medidas da incidência da infecção pelo HIV podem prover informações mais detalhadas para monitorar a epidemia, o que é crucial para a identificação de grupos de maior vulnerabilidade para a infecção e para direcionar os programas de prevenção e controle. Todavia, a despeito de várias metodologias já desenvolvidas, os esforços no sentido de estimar a incidência da infecção pelo HIV têm encontrado importantes limitações.

Os programas de intervenção baseados no aconselhamento e na educação individual ou coletiva têm demonstrado efetividade na modificação de comportamentos sexuais de maior risco e na redução da transmissão do HIV e de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST). Como já dissemos, isto tem contribuído para o chamado "viés de seguimento" (ou "efeito coorte") em estudos longitudinais tradicionais, realizados para se verificar a incidência do HIV em coortes de indivíduos não infectados (Laga *et al.*, 1994; Heyward *et al.*, 1994; Sahlu *et al.*, 2002; Kaul *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003). Além dos efeitos da intervenção, estes estudos são geralmente dispendiosos, demorados e podem ser enviesados pela participação seletiva e pelas diferenças de perda no seguimento.

Em 1989, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou a primeira norma para o estabelecimento de sistemas para a vigilância da infecção pelo HIV. Baseados no rastreamento por meio de vigilância sentinela, da dispersão do vírus em subgrupos populacionais e da vigilância dos casos de Aids notificados, estes sistemas se limitavam ao registro das infecções em curso (ONUSIDA/OMS, 2000). Contudo, estudos para medir a incidência de HIV-1 em populações específicas têm demonstrado que os métodos de vigilância baseados na prevalência de anticorpos específicos na população ou na notificação de casos não são suficientemente sensíveis para detectar as tendências da epidemia em curso (Batter *et al.*, 1994; Brookmeyer *et al.*, 1995; Wawer *et al.*, 1997; McFarland *et al.*, 1997; McFarland *et al.*, 1999; Rutherford *et al.*, 2000), sendo necessária a implementação de estratégias complementares para aprimorá-los.

1.6.1. Métodos baseados em marcadores de infecção aguda

Em 1995, Brookmeyer e Quinn propuseram a detecção do antígeno p24 do HIV-1 (Ag), um marcador laboratorial precoce presente na fase aguda da infecção em que o anticorpo anti-HIV (Ac) ainda não é detectável, para a estimativa da incidência da infecção pelo HIV, derivada do seguinte modelo:

$$p \approx I \mu$$

onde p é a proporção de indivíduos Ag+/Ac- no conjunto de indivíduos analisados, I é a incidência pontual e μ é a duração média do período pré-soroconversão (Ac+) no qual o Ag p24 é detectável (22,5 dias, no estudo realizado). Este modelo foi empregado por Cleghorn *et al.* (1998) para comparar métodos de estimativa direta e indireta da incidência da infecção pelo HIV-1 em uma população de alta vulnerabilidade. Os resultados obtidos indicaram que a estimativa da incidência com base em marcador de infecção aguda era consistente com os resultados obtidos por meio de métodos de avaliação direta e indireta, baseados no estudo prospectivo de coorte e soroprevalência, respectivamente. Neste referido

trabalho, a fórmula de cálculo foi modificada para permitir a expressão da taxa de incidência (densidade) anual:

$$I = p \times (365/D) \times 100$$

onde p é a proporção de indivíduos Ag+/Ac-, 365 é o número de dias em um ano e D é a duração média do período de antigenemia de p24 no período pré-soroconversão.

Em 2000, Quinn e colaboradores desenvolveram um novo método para a estimativa da incidência de HIV-1 baseada em marcador precoce de infecção, desta vez empregando um algoritmo para a detecção do RNA viral em *pools* de amostras de plasma negativos para o Ac anti-HIV. De acordo com o método desenvolvido, a taxa da incidência poderia ser obtida a partir da seguinte fórmula:

$$I = 1/\mu[1-(M/N)^{1/C}]$$

Onde N é o número total de amostras individuais utilizadas para a confecção dos pools, M é o número total de amostras individuais nos pools negativos, C é o número de amostras individuais em cada "pool" positivo e μ é a duração média do período em que o RNA viral pode ser detectado antes da soroconversão (28 dias, neste estudo). Para a conversão da incidência em taxa anual, esta fórmula deveria ser multiplicada por 365 dias.

1.6.2. Métodos baseados em marcadores de infecção recente

Em 1998, Janssen e colaboradores padronizaram uma nova metodologia, baseada em um algoritmo de ensaios sorológicos para a identificação de infecções recentes pelo HIV-1. Neste algoritmo, conhecido como STARHS - *Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*, amostras de soro/plasma, positivas para a presença de anticorpos anti-HIV (confirmado por meio de teste de *Western blotting*), são analisadas para a pesquisa de anticorpos anti-HIV em duas etapas, sendo uma delas em um ensaio imunoenzimático padrão (sensível), comercialmente disponível, e outra em um ensaio imunoenzimático modificado, conhecido como *Detuned-ELISA*, que apresenta menor sensibilidade em relação aos ensaios do tipo padrão. Amostras com

resultado "reagente" no ensaio sensível e "não reagente" no ensaio menos sensível são classificadas, em relação à infecção pelo HIV-1, como amostras de infecção recente ou amostras incidentes (também chamadas de "amostras *detunadas*").

O ensaio *Detuned-ELISA*, padronizado por Janssen e colaboradores, baseava-se no emprego do reagente comercial Abbott 3A11 (Abbott Park, Illinois-EUA), um ensaio imunoenzimático indireto produzido a partir de antígeno viral total obtido do lisado de culturas celulares infectadas pelo HIV-1, subtipo B (HIV-1_{III B}). Este ensaio foi modificado na diluição da amostra, no tempo de incubação da mesma, do conjugado e no método de cálculo do *Cut Off* (CO) (valor de corte da reação). Para que a reatividade das amostras pudesse absorver o impacto das variações inter-ensaio, a densidade óptica (DO) da amostra foi normalizada ou padronizada (DOP), passando a ser calculada com base nos valores de DO dos controles negativo (CN) e positivo (CP) dos seus respectivos ensaios [(DOP = valor da DO da amostra - valor da DO do CN)/valor da DO do CP].

Analisando painéis de amostras seqüenciais de soro/plasma de pessoas que soroconverteram (soroconvertores) para o HIV-1, Janssen e colaboradores (1998) estabeleceram condições ótimas do ensaio menos sensível, capazes de estimar o tempo decorrido desde a soroconversão para essas amostras conhecidas (Figura 4). O tempo decorrido desde a soroconversão, também chamado de "período de janela de detecção" neste protocolo, foi determinado por meio de modelagem matemática, considerando-se o tempo estimado entre o último resultado "não reagente" e o primeiro resultado "reagente" das séries de amostras seqüenciais dos painéis, no ensaio sensível e no ensaio menos sensível.

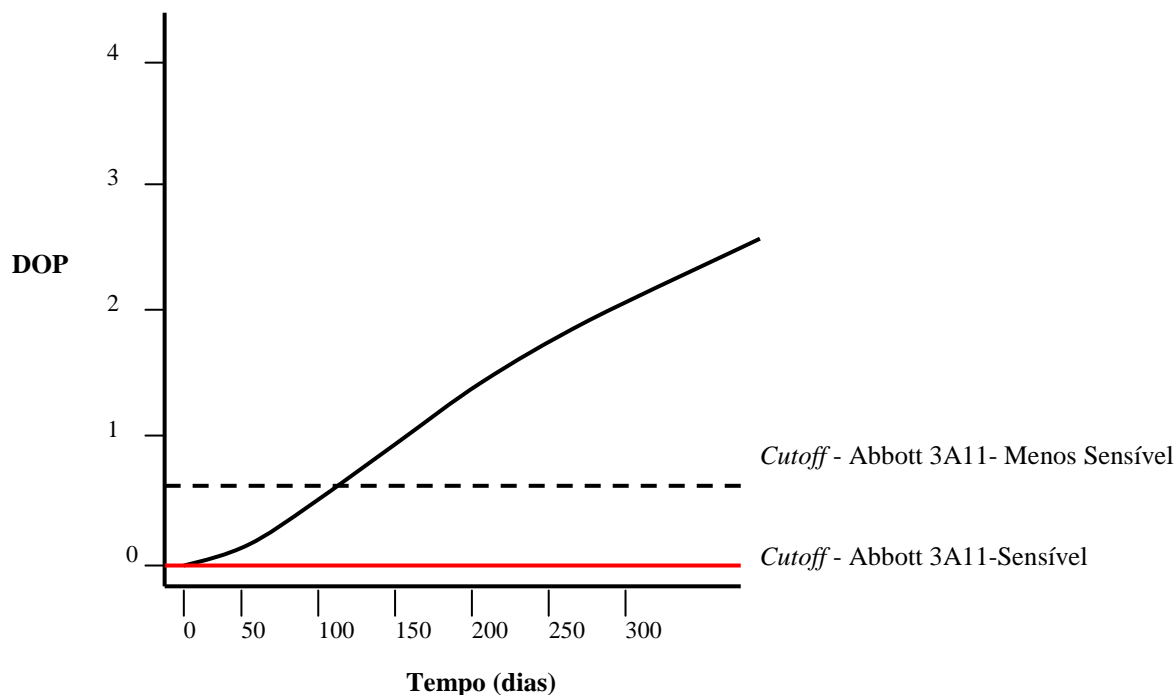


Figura 4: Curva da Densidade Óptica Padronizada (DOP) de amostras de soro analisadas para a presença de anticorpos anti-HIV por meio da testagem dupla sensível/menos-sensível, empregando-se o reagente Abbott 3A11, em função do número de dias decorrentes da soroconversão (Adaptado de Janssen et al. 1988).

Para os painéis de amostras analisadas, o período de janela de detecção da testagem dupla - sensível/menos-sensível, empregando-se o reagente Abbott 3A11, foi de 129 dias (IC 95%, 109-149 dias). Para este período de janela, o valor de CO para a DOP é de 0,75. Assim, valores de DOP acima de 0,75 correspondem a amostras de infecção antiga, crônica, de longo termo ou estabelecida; valores de $DOP < 0,75$ correspondem a amostras de soroconversão recente ou a infecção recente/incidente. Observou-se que algumas amostras, provenientes de pacientes em estágio avançado de Aids (2%) ou em tratamento anti-retroviral de longo termo (0,4%), poderiam ser classificadas incorretamente como amostras de infecção recente.

Janssen e colaboradores propuseram o emprego dos resultados do protocolo STARHS para a estimativa da incidência de HIV-1, levando-se

em consideração a proporção de amostras incidentes na população de susceptíveis, o período de janela de detecção e o período de 1 ano. Desta forma, a incidência (porcentagem de pessoas-ano) estimada poderia ser calculada segundo o modelo abaixo:

$$I_{dt} = \frac{n_{dt}}{N_{dt}} \times \frac{365}{T} \times 100$$

Onde:

I_{dt} = Incidência

n_{dt} = Número de pessoas com amostra "reagente" no ensaio Abbott 3A11/"não reagente" no ensaio Abbott 3A11 menos sensível

N_{dt} = Número de pessoas com amostra "não reagente" no ensaio Abbott 3A11 (HIV-1-negativo) + Número de pessoas com amostra "reagente" no ensaio Abbott 3A11 e "não reagente" no ensaio Abbott 3A11 menos sensível

T = Número médio estimado de dias correspondentes ao período de janela de detecção (neste caso, 129 dias)

Alguns estudos foram realizados para avaliar o desempenho do protocolo STARHS em diferentes populações, após sua padronização. Parekh e colaboradores (2001) avaliaram características de desempenho do reagente Abbott 3A11 na realização do protocolo STARHS (STARHS-3A11) em amostras provenientes da Tailândia. Neste estudo observou-se que as características de desempenho em amostras de infecção pelo HIV-1, subtipo E, eram diferentes daquelas estabelecidas para amostras de HIV-1, subtipo B. Para aquela população, os melhores índices de desempenho foram alcançados com um CO de 0,45 para a DOP, o qual determinava um período de 185 dias de janela de soroconversão entre o ensaio sensível e o menos sensível. Estes resultados apontaram para a necessidade de implementar ajustes finos no algoritmo, com base na diversidade do HIV-1 circulante na população a ser analisada.

Candal e colaboradores (2001) avaliaram a eficácia do protocolo STARHS-3A11 para o diagnóstico precoce de infecção pelo HIV-1 em crianças perinatalmente expostas. Eles encontraram especificidade de

90 a 100% e sensibilidade de 12 a 44% em amostras de crianças entre 4 e 6 meses de idade. Desta forma, em alguns casos, o diagnóstico de infecção pelo HIV poderia ser estabelecido após 4 meses de idade, embora um resultado "não reagente" no ensaio menos sensível não pudesse excluir a possibilidade de infecção, necessitando de um tempo maior de seguimento.

Machado e colaboradores (2002) analisaram por meio do protocolo STARHS-3A11, 281 amostras de plasma HIV+ de doadores de sangue dos Estados Unidos da América. Paralelamente, foram analisadas as características genotípicas do genoma viral presente nas amostras e o perfil da reatividade das amostras seqüenciais dos doadores no ensaio Abbott 3A11-menos sensível. Os autores observaram um padrão de DOP crescente nas amostras seqüenciais dos doadores, compatível com a dinâmica da maturação da resposta anticórpica pós-soroconversão, e um padrão de homogeneidade genética típico de indivíduos recém-infectados. Os autores concluíram que estes resultados validaram o algoritmo para identificação de infecções recentes/incidentes e sugeriram também o seu emprego para estudos de epidemiologia molecular a partir de amostras identificadas em estudos transversais de grande porte.

Devido à não continuidade da produção do reagente Abbott 3A11 cerca de um ano após a padronização do protocolo, o grupo de trabalho do CDC-EUA realizou estudos para a modificação e configuração de um outro reagente comercial de ELISA-HIV para um formato menos sensível. O novo protocolo foi estabelecido com o emprego do reagente Vironostika HIV-1 Microelisa System (Organon Teknika, EUA), um ELISA indireto em microplaca de 96 cavidades, também produzido a partir do lisado viral de HIV-1, subtipo B americano. O protocolo STARHS - Organon Teknika (STARHS-OT) foi padronizado (CDC-EUA, 2001; Rawal *et al.*, 2003) com as seguintes características:

- Valor de CO: 1,0
- Período de janela de detecção: de 170 dias (IC 95% 162 - 183 dias).
- DOP: passou a ser calculada com base nos valores de DO do CN, do CP forte, do CP fraco e do Calibrador (CAL): [DOP = (mediana

da DO da amostra - mediana da DO do CN)/(mediana da DO do CAL - mediana da DO do CN)], reagentes complementares ao conjunto de diagnóstico comercialmente disponível, produzidos pelo CDC-EUA.

Uma das limitações deste protocolo, relatada por Rawal e colaboradores (2003), foi a ocorrência de resultados falso-negativos no ensaio menos sensível em uma pequena porcentagem de amostras de indivíduos com infecção crônica, em estágio de Aids ou em tratamento anti-retroviral, em taxas semelhantes às observadas por Janssen e colaboradores.

Young e colaboradores (2003), estudando amostras de subtipo B' e E provenientes de estudo de coorte com usuários de drogas injetáveis da Tailândia, demonstraram que as características de detecção de infecções recentes por meio do protocolo STARHS-OT variavam dependendo do subtipo viral, a exemplo do que havia sido observado para o protocolo STARHS-3A11. Para amostras de subtipo B', o período de janela de detecção encontrado foi de 239 dias (IC 95% 208-287 dias) e para o subtipo E, este período foi de 356 dias (IC 95% 318-402 dias). Os autores concluíram que o bom desempenho deste protocolo requer o emprego de CO e períodos de janela de soroconversão adequados ao subtipo viral. Um outro estudo para avaliação das características de desempenho do protocolo STARHS-OT foi realizado em amostras de soroconvertores não tratados da Austrália (Wilson *et al.*, 2004) e os autores observaram um período de janela de detecção de 239 dias (IC 95% 208-287 dias), semelhante ao encontrado para amostras de HIV-1 subtipo B' da Tailândia.

A equivalência entre as características de desempenho dos dois métodos na estimativa da incidência de HIV-1 foi avaliada por meio de estudos comparativos. Kothe e colaboradores (2003) relataram ter encontrado 97% de concordância dos resultados do ensaio Vironostika/OT- menos sensível em relação aos resultados do ensaio Abbott 3A11- menos sensível em um painel de amostras de infecção recente e crônica; Murphy e colaboradores (2003) relataram coeficiente de correlação igual a 0,84 entre os dois métodos, quando analisaram 378 amostras; Rawal e colaboradores (2003) observaram alto grau de correlação ($r = 0,99$) entre as DOP dos dois

métodos. Estes estudos concluíram que o método Vironostika/OT-menos sensível era comparável e equivalente ao Abbott 3A11-menos sensível, com vantagens em relação ao nível de complexidade operacional, rapidez e praticidade (Figura 5).

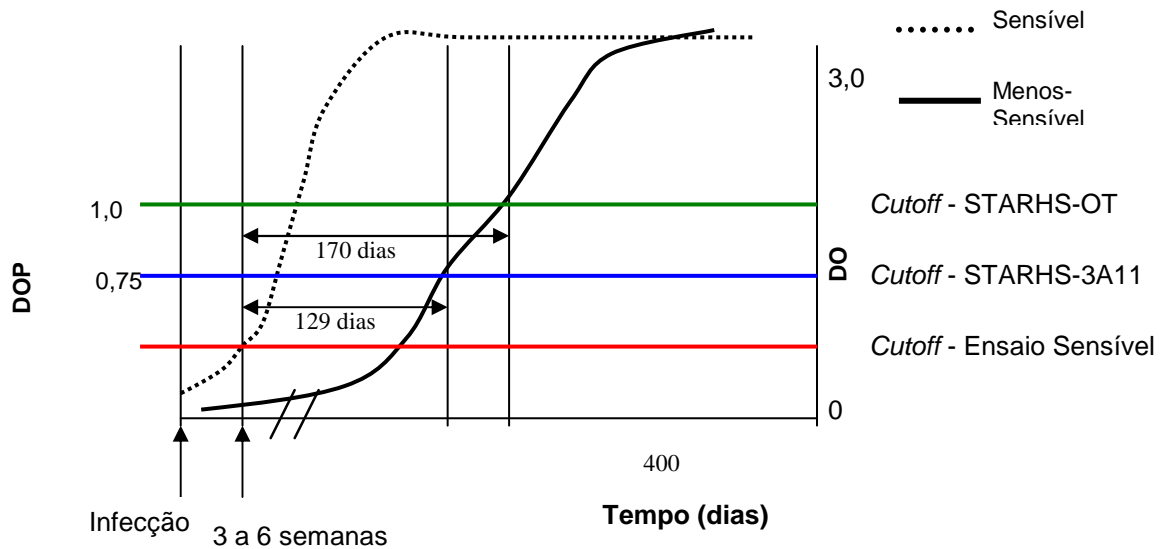


Figura 5: Perfil das curvas de anticorpos anti-HIV no período pós-oroconversão, segundo o método de análise: sensível (DO) e menos sensível (DOP).

Enquanto os protocolos STARHS (3A11 e OT) eram validados e recomendados oficialmente para a estimativa da incidência de HIV-1, como ferramenta auxiliar às iniciativas de vigilância e prevenção de HIV/Aids nos Estados Unidos (CDC-EUA, 2001), diferentes estudos eram conduzidos com o objetivo de desenvolver métodos laboratoriais alternativos, que pudessem superar as limitações técnicas impostas pela diversidade viral e pela dinâmica da progressão da doença.

Parekh e colaboradores (2001b) exploraram a cinética de maturação da resposta anticórpica contra os antígenos derivados dos genes *Env*, *Pol* e *Gag* em ensaios para medir a concentração dos anticorpos específicos (títulos), a afinidade da ligação antígeno-anticorpo (constante de

associação) e a quantidade proporcional de IgG específica. Avaliando o desempenho de 16 ensaios sorológicos diferentes frente a um painel de amostras de soroconversão (<6 meses) e a um painel de amostras de infecção crônica/estabelecida (>1 ano), incluindo o *Western blot* quantitativo, estes autores confirmaram os dados anteriormente descritos na literatura, demonstrando que os títulos de anticorpos anti-gp120 e gp41 eram mais baixos em amostras de soroconversão recente e mantinham-se estáveis em amostras de pacientes em diferentes estágios da infecção crônica. A partir dos padrões de reatividade no teste de *Western blot* quantitativo foi possível separar os grupos de amostras de infecção recente e antiga, com o mínimo de sobreposição entre os mesmos (Figura 6). Nesta avaliação, os perfis de anticorpos anti-gp160, p31 e p66 permitiram separar razoavelmente bem as amostras de infecção recente e antiga, porém com menos precisão. Quanto aos demais antígenos (p51, p24 e p17), não foram observados padrões de reatividade que permitissem estabelecer correlação com o tempo de soroconversão. As taxas de associação (K_a) e de dissociação (K_d) entre o *pool* de anticorpos policlonais presentes nas amostras e a gp41 foram avaliadas por meio de ensaio de ressonância plasmática superficial. A constante de associação (KA) foi calculada ($KA = K_a / K_d$), sendo maior para amostras de infecção antiga do que para amostras de infecção recente.

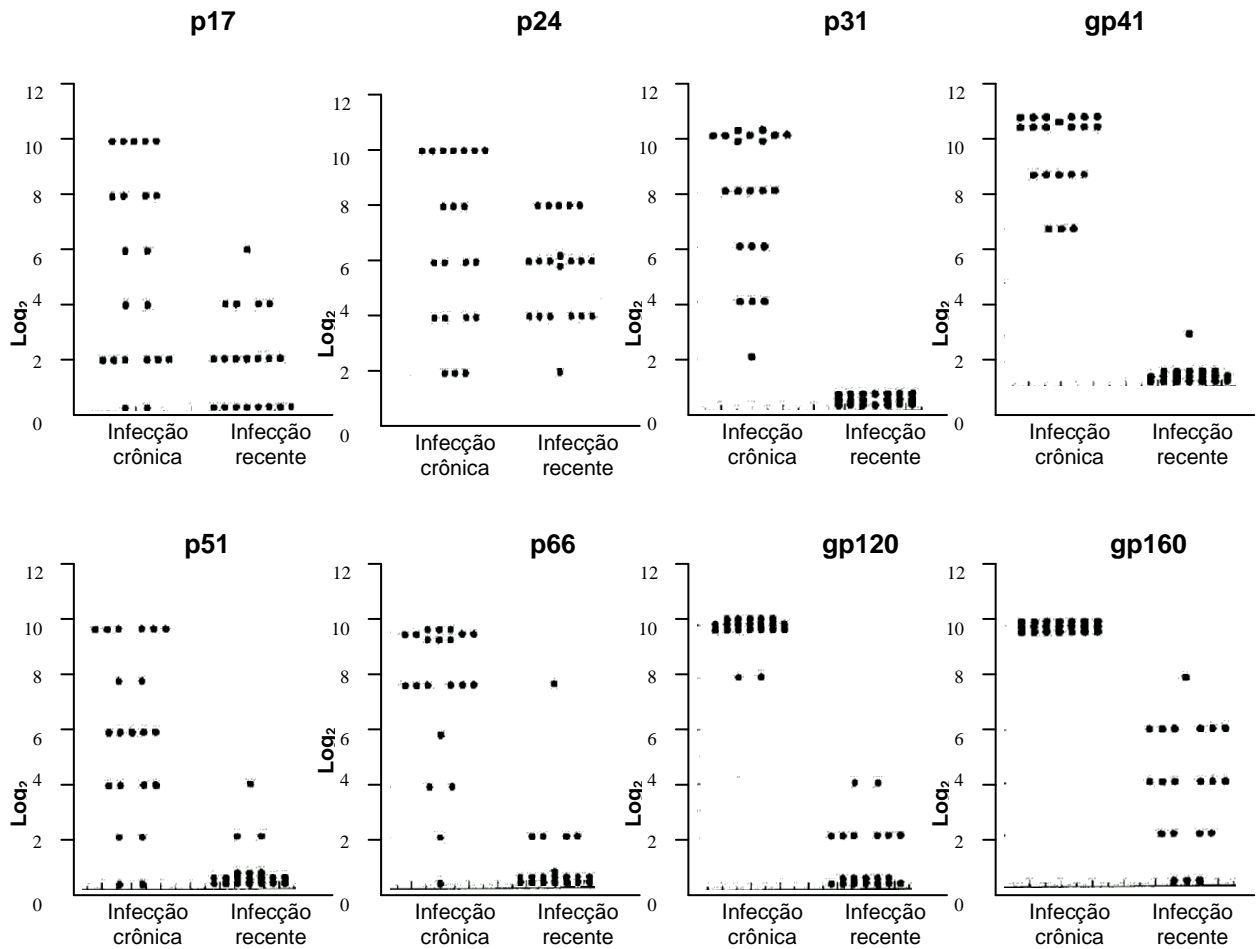


Figura 6: Títulos de anticorpos em ensaio de Western blot. Soros de pacientes infectados pelo HIV-1 que soroconverteram recentemente (2-6 meses) ou que tinham infecção estabelecida (soropositividade documentada há mais de um ano) foram analisados em diluições seriadas na base 4 para determinar o título final (visual) contra as proteínas do HIV-1. Os títulos estão expressos como log_2 (título/100) (Adaptado de Parekh et al., 2001b).

Um ensaio de ELISA de captura de IgG também foi avaliado, empregando-se antígeno solúvel recombinante do envelope viral contendo as seqüências imunodominantes da gp120 e da gp41 (antígeno CBR3) e um peptídeo sintético solúvel correspondente à região imunodominante da gp41, representativo dos subtipos A-E do HIV-1. Neste ensaio de captura, a DO da amostra refletiu a proporção de IgG específica (anti-HIV) em relação ao total de IgG circulante, uma vez que a captura é inespecífica. Neste estudo, Parekh e colaboradores verificaram que a mediana das DO das amostras de infecção antiga eram 7,6 e 8,0 vezes maior do que as medianas das DO das amostras de infecção recente, para os antígenos CBR3 e gp41, respectivamente.

Com base nos resultados que mostraram uma distinção entre o título, a afinidade e a quantidade proporcional de anticorpos dirigidos contra a gp41, Parekh e colaboradores (2001b) desenvolveram um novo método, chamado de Ensaio Imunoenzimático-BED de Captura de IgG (IgG-Capture BED-EIA), baseado na detecção de proporções crescentes de IgG específica após soroconversão. Realizado em microplacas com 96 cavidades, este método utiliza, como antígenos, peptídeos derivados da região imunodominante da gp41, contendo seqüências dos subtipos B, E e D, representativas de múltiplos subtipos do HIV-1 (Parekh e McDougal, 2001; Parekh *et al.*, 2002). O período de janela para a soroconversão neste método é de 160 dias, empregando-se um CO de 1,0 para a DOP; o ensaio apresenta índices de sensibilidade e de especificidade para a identificação de amostras incidentes de 81,7% e 89,1%, respectivamente, e um índice de exatidão para a estimativa da incidência de 93%. O desempenho do método não é afetado pela diversidade do HIV-1, mas, da mesma forma como para os protocolos STARHS-3A11 e STARHS-OT, ele depende da imunocompetência do indivíduo cuja amostra será analisada (Parekh, 2002).

Dobbs e colaboradores (2004) avaliaram as características de desempenho do ensaio BED-CEIA, visando elaborar um algoritmo de testes sorológicos alternativo às estratégias de testagem dupla sensível/menos sensível para a detecção de infecções recentes pelo HIV-1. Os autores propuseram a inclusão de controles positivo-fraco e forte e do calibrador

(CDC-EUA) em cada corrida e a normalização da DO da amostra (DOP) frente às DO destes controles. O CO proposto para a discriminação de amostras de soroconversão recente e infecção crônica foi de 1,0 e o período de janela de detecção foi inicialmente de 160 dias, tendo sido posteriormente estabelecido em 153 dias (Calypste Biomedical Corporation, 2005).

Além do protocolo BED-CEIA, outros métodos têm sido padronizados e avaliados para a identificação de amostras de infecção recente pelo HIV-1. A medida do índice de avidéz da reação de anticorpos policlonais anti-HIV presentes em amostras de soro foi explorada como forma alternativa para a discriminação entre infecção crônica e recente pelo HIV-1. Suligoi e colaboradores (2002) padronizaram metodologia para a determinação do índice de avidéz de anti-HIV, empregando um ensaio de ELISA com micropartículas (AxSYM HIV 1/2gO, Abbott Diagnostics, Alemanha), comercialmente disponível. Não foram introduzidas modificações no procedimento original do ensaio, mas sim o pré-tratamento das amostras com guanidina 1M. Embora tenham sido obtidos altos índices de reprodutibilidade, a sensibilidade do método para o índice de avidéz $<0,6$, o qual incluiu a maioria das amostras com soroconversão <6 meses, foi de apenas 33,3%, enquanto a especificidade foi de 98,4%. Quando o CO foi elevado para um índice de avidéz de 0,9, a sensibilidade do método aumentou para 87,9%, porém a especificidade diminuiu para 86,3% e o período de janela de detecção aumentou para 9 meses. Apesar das vantagens do método (automação, não-modificação do ensaio comercial), os resultados preliminares e os resultados de um estudo posteriormente realizado (Suligoi *et al.*, 2003) indicaram que o mesmo, ao menos da forma em que tem sido proposto, tem desempenho inferior em relação aos protocolos STARHS já padronizados.

Considerando a especificidade do protocolo STARHS ($<100\%$), Constantine e colaboradores (2003) padronizaram um teste rápido menos-sensível para a detecção de anti-HIV e propuseram o seu emprego na realização do protocolo STARHS em duas etapas, para aprimorar o desempenho com relação à especificidade. Neste estudo, um teste rápido experimental (UNIGOLD HIV) foi calibrado para diferenciar amostras de

infecção recente de amostras de infecção crônica a partir de 133 dias após a soroconversão. Amostras assim identificadas foram seqüencialmente submetidas ao protocolo STARHS-OT que teve o valor do CO para a DOP reduzido de 0,75 para 0,4, para adequação do período de janela de detecção padronizado para a etapa de triagem. Neste estudo, foram observados resultados satisfatórios quanto à correta identificação de amostras incidentes, mas os mesmos não foram confirmados por outros estudos.

Com base no padrão de resposta das subclasses de IgG específica para os antígenos do HIV-1, Wilson e colaboradores (2004) padronizaram um ensaio de *Western blot* isotópico-específico, capaz de discriminar amostras de infecção recente pelo HIV-1. Empregando antígeno obtido a partir do lisado viral de HIV-1 (Zeptomatrix, EUA) e um sistema automatizado de densitometria para a leitura semiquantitativa das fitas de reação, o método padronizado demonstrou que a resposta de anticorpos IgG3 contra a fração p24 em amostras de pacientes não tratados com antiretrovirais era mais intensa no período de soroconversão recente, alcançando níveis mais altos cerca de 1 mês pós-infecção, persistindo por até 4 meses e declinando posteriormente até níveis mais baixos. Os pesquisadores padronizaram ensaio imunoenzimático para detecção de IgG3 anti-p24 e propuseram que o mesmo fosse utilizado em algoritmo de testes em paralelo com ensaio para detecção de antígeno p24, com identificação otimizada de infecções recentes, ocorridas de 15 a 120 dias pós-infecção.

1.7. Emprego de algoritmos de testes sorológicos para a estimativa da incidência de infecção pelo HIV-1

O protocolo STARHS tem sido adotado em diversos países para a realização de estudos científicos no campo das ciências biomédicas, da epidemiologia e da clínica, ou ainda como atividade rotineira dentro das

atividades da vigilância e prevenção de HIV e Aids (UNAIDS/WHO, 2001; NYC Health, 2001; Hamers *et al.*, 2004; CDC, 2005).

Várias populações têm sido avaliadas nesses estudos, com desenhos variados. No quadro a seguir foram resumidos os dados dos principais trabalhos publicados referentes a estudos que empregaram o protocolo STARHS:

Quadro 3: Estimativa da incidência de infecção pelo HIV em diferentes populações, calculada por meio de algoritmos de testes sorológicos, segundo o grupo populacional e método de avaliação:

(continua)

População analisada	Método utilizado	Estimativa da incidência			Referência
		N.º de amostras	N.º infecções recentes (%)	% pessoas-ano (IC 95%)	
Doadores de sangue, EUA	STARHS-3A11	547	69 (12,6)	0,0072 (0,005 - 0,011)	Janssen <i>et al.</i> , 1998
Homens presidiários, Brasil, 1998	STARHS-3A11	78	5 (6,0)	2,8 (2,4 - 3,4)	Diaz <i>et al.</i> , 1999
Usuários de CTA, São Francisco, EUA	STARHS-OT	452	79 (17,5)	1,1 (0,6 - 1,6)	McFarland <i>et al.</i> , 1999; Rutherford <i>et al.</i> , 2000
Usuários de CTA, heterossexuais, Rio de Janeiro, Brasil	STARHS-3A11	1.050	84 (8,0)	Mulheres = 1,9 (0,9-3,9) Homens = 2,8 (1,4 - 5,3)	Schechter <i>et al.</i> , 2000
HSH, 7 cidades dos EUA	STARHS-3A11	3.449	29 (12,9)	2,6 (1,5 - 4,4)	CDC-EUA, 2001
Pacientes de clínicas DST - São Francisco, EUA	STARHS-3A11	3.225	-	1,6	Schwarcz <i>et al.</i> , 2001
HSH de clínica de DST; Amsterdã/Holanda	STARHS-OT	422	37 (8,8)	3,2 (2,0 - 4,8)	Dukers <i>et al.</i> , 2002

Quadro 3: Estimativa da incidência de infecção pelo HIV em diferentes populações, calculada por meio de algoritmos de testes sorológicos, segundo o grupo populacional e método de avaliação:

(continuação)

População analisada	Método utilizado	Estimativa da incidência			Referência
		N.º de amostras	N.º infecções recentes (%)	% pessoas-ano (IC 95%)	
Usuários de cocaína, São Paulo, Brasil	STARHS-3A11	41	2 (5,9)	0,71 (0,07 - 3,03)	Turchi <i>et al.</i> , 2002
Pacientes de clínicas DST, 9 cidades dos EUA	STARHS-3A11	4.688	362 (7,7)	0,8 (0,6 - 1,1)	Weinstock <i>et al.</i> , 2002
Usuários de CTA, Santos, Brasil, 1996 – 1999	STARHS-3A11/OT	350	36 (10,3)	2,0 (1,1 - 3,5)	Alves <i>et al.</i> , 2003
Usuários de CTA e clínicas DST, São Francisco, EUA, 1997 a 2003	STARHS-OT	-	-	1999 = 4,0 2000 = 3,1 2003 = 2,9	San Francisco Dept. of Public Health, 2003
Pacientes de alto risco para HIV, Calcutá, Índia	STARHS	484	-	7,0 (?)	Gupta <i>et al.</i>
UDI, Bangkok, Tailândia	BED-CEIA	594	113 (19,0)	17,3 (12,8 - 24,2)	Hu <i>et al.</i> , 2003
HSH sífilis 1ª/2ª - São Francisco, EUA- 2002/2003	STARHS-OT	16	4 (25,0)	13,9 (0,3 - 27,5)	CDC-EUA, 2004
HSH de clínicas DST, Reino Unido 1995 a 2001	STARHS-OT/3A11	1.645	317 (19,3)	1995 = 3,0 1998 = 2,33 2001 = 2,45	Murphy, <i>et al.</i> , 2004
UDI e ex-UDI, Rio de Janeiro, Brasil	STARHS-OT	48	4 (8,3)	0,76	Teixeira <i>et al.</i> , 2004
Usuários de CTA, Nova Iorque, EUA, 2001.	STARHS-OT	1.022	151 (14,8)	0,29 (0,20 - 0,38)	Nash <i>et al.</i> , 2005
Mulheres grávidas de Atlanta, EUA, 1991 – 1998.	-	-	-	0,24 (0,20 - 0,29)	Nesheim <i>et al.</i> , 2005

Quadro 3: Estimativa da incidência de infecção pelo HIV em diferentes populações, calculada por meio de algoritmos de testes sorológicos, segundo o grupo populacional e método de avaliação:

População analisada	Método utilizado	Estimativa da incidência			Referência
		N.º de amostras	N.º infecções recentes (%)	% pessoas-ano (IC 95%)	
Amostras do Programa de Vigilância Sentinela para HIV-1, Camboja, 1999, 2000, 2002	BED-CEIA	3.486	-	Diversos valores, de acordo com os cortes populacionais estudados	Saphonn <i>et al.</i> , 2005
HSH com sífilis recente - Los Angeles, EUA, 2002-2004	STARHS-OT	74	12 (16,2)	26 (19 - 33)	Taylor <i>et al.</i> , 2005

Legendas: HSH = homens que fazem sexo com homens/homossexuais masculinos; UDI = usuários de drogas injetáveis; CTA = centros de testagem e aconselhamento; DST = doenças sexualmente transmissíveis.

Com esta revisão da literatura disponível, fica claro que as estimativas de incidência da infecção pelo HIV calculadas com base em métodos para detecção de infecção recente/incidente variam de acordo com a região e com as populações analisadas e são dependentes do subtipo viral predominante. Além disto, os dados disponíveis indicam associação entre o perfil da resposta de anticorpos anti-HIV presentes no soro de indivíduos infectados e a história natural da doença, na qual se baseiam os algoritmos de testes laboratoriais para a detecção de infecção incidente pelo HIV.

Alguns estudos foram realizados no Brasil, mas foram analisadas somente populações de alta vulnerabilidade, nas quais a prevalência é superior a 3%. Além disto, não existem relatos de estudos de avaliação dos testes para identificação de infecção recente pelo HIV em função da resposta de anticorpos de indivíduos do nosso meio.

Assim, justificamos a proposta deste estudo no qual foi estimada a incidência da infecção pelo HIV a partir de amostras de soro provenientes de duas populações com características epidemiológicas

distintas e foi avaliada a associação entre a especificidade dos anticorpos anti-HIV presentes nestes soros com os resultados do protocolo STARHS-OT.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Estimar a taxa de incidência da infecção pelo HIV a partir de amostras de soro (soroincidência) de gestantes e de usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA), provenientes da região metropolitana da Grande São Paulo, positivas para anticorpos anti-HIV;
- Avaliar, nessas amostras, o perfil da reatividade de anticorpos específicos contra as frações antigênicas do HIV-1 com base em avaliações quantitativas e/ou qualitativas dos resultados dos testes de ELISA e de *Western blot* para HIV;
- Correlacionar o padrão de bandas presentes no teste de *Western blot* com os resultados do algoritmo de testes sorológicos STARHS.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Para a realização deste estudo, foram selecionadas amostras de soro/plasma positivas para anticorpos anti-HIV, provenientes das sorotecas de dois diferentes laboratórios que participaram do mesmo. A definição dos grupos de amostras estudados foi feita de acordo com os seguintes critérios:

- GIAL: amostras de soro de gestantes, encaminhadas à Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de 1991 a 2002, para detecção de anticorpos anti-HIV;
- SC-IAL: amostras de soro de pacientes soroconvertores para anticorpos anti-HIV encaminhadas à Seção de Sorologia do IAL de 1994 a 1995, com referências sobre a data do último teste negativo para o HIV do respectivo paciente, sendo este período de 8 meses ou menos;
- RIAL: amostras de soro de pacientes de ambulatório de especialidades, encaminhadas ao Laboratório de Retrovírus do IAL de 1993 a 2000, com indicação de suspeita de soroconversão recente para o HIV;
- LIS: amostras de soro de usuários de Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA), encaminhadas ao Laboratório Local de Itapeverica da Serra – Secretaria de Estado de Saúde-SP (LIS) para detecção de anticorpos anti-HIV, de 2000 a 2002.

Todas as amostras estavam armazenadas a -20°C no momento da seleção para o estudo. A presença de anticorpos anti-HIV foi definida com base nos registros dos respectivos laboratórios. Foram selecionadas somente as amostras cujo volume permitisse a retirada de uma alíquota para análise e a manutenção de volume remanescente armazenado na respectiva soroteca.

As amostras foram codificadas a partir dos seus números de registro originais. Os dados referentes ao sexo e à idade dos indivíduos,

quando existentes nos registros, foram coletados de forma anônima e desvinculados para garantir o sigilo e a confidencialidade em relação à identidade dos mesmos.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Detecção de anticorpos anti-HIV e avaliação dos índices de reatividade em ensaios realizados a partir de métodos Sensíveis

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV tem sido realizado rotineiramente por meio da detecção de anticorpos específicos anti-HIV no soro ou plasma dos indivíduos sob investigação. De acordo com normas preconizadas internacionalmente, a caracterização das amostras de soro ou plasma quanto à presença de anticorpos anti-HIV deve ser feita em duas etapas: triagem e confirmação sorológica.

No Brasil, o Ministério da Saúde tem recomendado, desde 1988, o emprego de algoritmos/fluxogramas de testes para a detecção de anticorpos anti-HIV, com vistas ao diagnóstico e à seleção de doadores de sangue.

Os dados referentes aos resultados dos métodos sensíveis foram coletados a partir dos registros dos laboratórios participantes do estudo. As amostras coletadas de 1991 a 1995 foram analisadas empregando-se o algoritmo de testes apresentado no Anexo 1 (Brasil, 1988); as amostras coletadas de 1995 a 2003, foram analisadas empregando-se os algoritmos de testes apresentados nos Anexos 2 e 3 (Brasil, 1995; Brasil, 1998).

3.2.1.1. Metodologias utilizadas na etapa de triagem sorológica

De 1991 a 1995, a triagem para anticorpos anti-HIV foi feita por meio do emprego de um ensaio imunoenzimático (ELISA) individual ou dois ELISA combinados, dependendo da disponibilidade dos reagentes. De 1995

a 2002, a triagem sorológica foi realizada pelo emprego de 2 ELISAs de princípios metodológicos ou antígenos distintos.

Foram empregados conjuntos de diagnóstico de diferentes procedências, fabricantes, formatos, tipos de antígenos, versões e números de lote, comercialmente disponíveis no mercado brasileiro de 1991 a 2002, período referente à coleta das amostras analisadas neste estudo. A comercialização destes produtos no período citado foi regulada pelo Sistema de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, por meio de leis especificamente instituídas visando garantir o desempenho adequado dos produtos de diagnóstico de uso *in vitro* (Brasil, 1976; 1977; 1994).

Relação dos conjuntos de reagentes utilizados para realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) Sensíveis:

- a) Ensaios de 1^a geração (antígeno da fase sólida constituído de mistura do lisado viral, obtido a partir de culturas celulares):
- Abbott HTLV-III EIA (Abbott Diagnostics, EUA)
 - DAGS HTLV-III EIA (Roche Diagnostics, EUA)
 - ELAVIA (Sanofi Pasteur, França)
 - Genetic Systems LAV EIA (Genetic Systems Inc., EUA)
 - HBK-184 HIV-1 EIE (Embrabio, Brasil)
 - Vironostika HIV Uniform (Organon Teknika, Holanda)
- b) Ensaios de 2/3^a geração (antígeno da fase sólida constituído de mistura de proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos, representativos de regiões conservadas do HIV-1 ou do HIV-1+2):
- Abbott 2nd Generation HIV-1 EIA (Abbott Diagnostics, Alemanha)
 - Abbott 3rd Generation HIV-1/2 EIA (Abbott Diagnostics, Alemanha)
 - Abbott 3rd Generation Plus O HIV-1/2 EIA (Abbott Diagnostics, Alemanha)
 - AxSYM HIV-1/2 MEIA (Abbott Diagnostics, Alemanha)
 - GENELAVIA I/II (Sanofi Pasteur, França)
 - Genscreen HIV-1/2 (Sanofi Pasteur, França)
 - Genscreen HIV-1/2 Ag-Ab EIA (Bio Rad Diagnostics, França)
 - Murex HIV 1.2 EIA (Murex Diagnostics, Reino Unido)

- Murex HIV-1/2 EIA (Murex Diagnostics, Reino Unido)
- Murex ICE HIV 1.O.2 (Murex Diagnostics, Reino Unido)
- Ortho HIV-1/2 EIA (Ortho Diagnostics, EUA)
- Recombigen HIV-1 EIA (Ortho Diagnostics, EUA)
- Vironostika HIV Uniform II (Organon Teknika, Holanda)
- Vironostika HIV Uniform II Plus O (Organon Teknika/Biolab Merièux, Holanda)
- Wellcozyme HIV EIA (Wellcome Diagnostics, Reino Unido)

Todos os ensaios foram realizados seguindo-se estritamente as recomendações dos fabricantes de cada um dos conjuntos de diagnóstico utilizados.

3.2.1.2. Cálculo dos índices de reatividade dos ensaios de triagem de 1ª e de 2ª/3ª geração Sensíveis

Os valores das densidades ópticas (DOs) das amostras nos ensaios de ELISA de 1ª e de 2/3ª geração sensíveis, obtidos a partir dos registos dos laboratórios, foram utilizados para avaliar o índice de reatividade (IR) das mesmas nestes ensaios.

O IR foi calculado dividindo-se o valor de cada DO pelo valor do *Cut Off* (CO), ou limite de reatividade, do respectivo ensaio. A relação DO/CO tem sido empregada na avaliação dos resultados dos testes de ELISA, para inferir sobre o grau da intensidade com que amostras reagem frente a estes testes e para verificar a capacidade que os mesmos possuem para discriminar amostras negativas e positivas entre si em uma mesma corrida (Crofts *et al.*, 1988; Maskill *et al.*, 1988; WHO, 1999). Sendo o IR um valor arbitrário, normalizado pela proporcionalidade da DO em relação ao CO, o mesmo também permite a avaliação da variação dos resultados intra- e inter-ensaio, bem como a comparação dos resultados de testes de formatos diferentes, entre si.

As amostras selecionadas para este estudo foram analisadas, na etapa de triagem sorológica, por meio de testes sensíveis de diferentes

formatos, marcas e procedências. O valor máximo da DO dos diferentes testes variou, dependendo do limite ou da capacidade de leitura do espectrofotômetro utilizado em cada caso (padronizado pelo respectivo fabricante). Quando o valor da DO era maior do que o valor máximo detectável - >2,0, >3,0 ou >4,0, - o valor a DO foi arbitrariamente atribuído ao valor do limite de detecção, ou seja, 2,0, 3,0 ou 4,0, respectivamente.

Os valores dos IRs das amostras foram agrupados segundo a geração do teste de ELISA (1ª ou 2/3ª) e, em seguida, o intervalo compreendido entre o valor mínimo e o valor máximo observados em cada grupo foi dividido em 4 faixas, cujos limites foram definidos pela aproximação aos valores dos seus respectivos quartis. As 4 faixas do intervalo em cada um dos dois grupos foram utilizadas para agrupar as amostras de acordo com a intensidade dos seus respectivos IR, segundo os seguintes critérios:

- a)** Intensidade baixa: relação DO/CO $\leq 5,0$;
- b)** Intensidade moderada baixa: relação DO/CO de 5,1 a 10,0;
- c)** Intensidade moderada alta: relação DO/CO de 10,1 a 15,0;
- d)** Intensidade alta: relação DO/CO $\geq 15,1$.

3.2.2. Metodologias utilizadas na etapa de confirmação sorológica

A confirmação de anticorpos específicos anti-HIV foi realizada por meio de testes suplementares de Imunofluorescência Indireta para HIV-1 (IFI) e/ou de *Western blot* (WB), de acordo com as orientações contidas nos algoritmos de testes nos diferentes períodos.

- Conjunto de reagentes para ensaio de IFI: conjunto de diagnóstico produzido pelo Laboratório de Reativos de Biomanguinhos-FIOCRUZ, composto de lâminas de vidro para microscopia com demarcações contendo células da linhagem K37-3 (cronicamente infectadas pelo HIV-1) fixadas, anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com

isotiocianato de fluoresceína (FITC), soros-controle, solução de Azul de Evans a 0,01% e glicerina tamponada, pH 9,5. A solução salina tamponada com fosfatos (PBS) para a diluição das amostras e do conjugado e para a lavagem das lâminas foi preparada no laboratório, de acordo com a fórmula apresentada no anexo 1. O teste de IFI foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e a interpretação foi feita considerando-se os perfis de reatividade estabelecidos para o ensaio.

- Conjuntos de reagentes para ensaio de WB: foram utilizados conjuntos de reagentes para realização de teste de WB de diferentes procedências, cepas virais e números de lote, comercialmente disponíveis nos períodos em que as amostras foram encaminhadas para diagnóstico. Os conjuntos de reativos utilizados eram compostos de fitas de nitrocelulose contendo frações antigênicas do HIV-1, separadas de acordo com o peso molecular. O antígeno, transferido eletricamente a partir da corrida eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi purificado do lisado viral do HIV-1 propagado em linhagens celulares de origem linfóide humana.

Relação dos conjuntos de reagentes utilizados para realização dos ensaios de WB:

- Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot Kit (Cambridge Biotech, EUA)
- DuPont HIV-1 Western Blot Kit (Cambridge Biotech, EUA)
- Genelabs Blot HIV 1.2 (Genelabs Diagnostics, Cingapura)
- HIV-1 IgG Western Blot Kit (Calypte Inc., EUA)
- New LAV Blot I (Sanofi Pasteur Diagnostic, França)

Todos os ensaios foram realizados seguindo-se estritamente as recomendações dos fabricantes de cada um dos conjuntos de diagnóstico utilizados.

3.2.3. Detecção de anticorpos anti-HIV por meio do método menos sensível e identificação de amostras de infecção recente pelo HIV

A detecção de infecções recentes pelo HIV-1 foi realizada por meio do algoritmo STARHS-OT, empregando-se o conjunto de reagentes Organon Teknika Corporation (OTC) Vironostika Less Sensitive HIV-1 Microelisa System (Organon Teknika, EUA) - ensaio OTC Vironostika-LS, (Rawal *et al.*, 2003).

Ensaio Vironostika-LS:

Este teste deve ser realizado em duas etapas, uma de triagem e uma confirmatória. O ensaio Vironostika-LS é um ELISA indireto no qual as cavidades da microplaca - fase sólida - são sensibilizadas com antígeno purificado e inativado do HIV-1, obtido a partir do lisado de cultura de linfócitos T infectados. Um soro controle negativo (CN) (do próprio conjunto de reagentes), um soro controle positivo forte (PF), um soro controle positivo fraco (PFR) e um soro calibrador (CAL) (Boston Biomedica Incorporation/ CDC, EUA) devem ser analisados em todas as corridas.

Execução do Ensaio:

As amostras de soro ou plasma do estudo (amostras-teste), os soros-controle e o calibrador foram diluídos em série em solução diluente DILSIM II® (OTC, EUA), até a diluição final de 1:20.000. Duzentos microlitros da diluição final das amostras-teste, CN, PF, PFR e CAL foram transferidos para as cavidades da microplaca, que foi incubada imediatamente após a transferência das diluições a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 minutos.

Na etapa de triagem, cada amostra teste foi incluída no ensaio uma única vez; na etapa confirmatória, as amostras-teste foram analisadas em triplicata a partir de três diluições independentes da amostra original. Os soros-controle e o calibrador foram incluídos em cada microplaca em triplicata, a partir de diluições independentes de cada um.

O material não imobilizado na fase sólida após a incubação de amostras-teste e controles foi removido com uma lavagem das cavidades da microplaca, de 4 ciclos em lavador automático. Em seguida, foram

adicionados a cada cavidade 150 µL de conjugado EnzAbody® (OTC, EUA) reconstituído, composto de anticorpo de cabra anti-IgG humana ligado à peroxidase, para a demonstração da presença de complexos antígeno-anticorpo na fase sólida. A incubação do conjugado foi feita à 37 ± 2°C por 30 minutos.

Após o ciclo de lavagens para remoção do excesso de conjugado, 150 µL do substrato cromógeno ABTS (2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foram adicionados às cavidades da microplaca, a qual foi incubada no escuro, à temperatura ambiente (18 à 25°C), por 10 a 13 minutos para o desenvolvimento da cor.

A reação foi bloqueada pela adição de 150 µL de fluoreto de sódio a 0,28% em água. A intensidade de cor em cada cavidade, que é proporcional à quantidade de anticorpo imobilizado, foi determinada pela leitura da absorbância das mesmas em espectrofotômetro de microplacas com filtro de 405 nm, expressada em unidades de densidade óptica (D.O.).

Cálculos e interpretações:

Todas as interpretações foram realizadas com base no valor da densidade óptica padronizada (DOP), calculada por meio da seguinte fórmula:

$$DOP = \frac{(\text{valor da D.O. da amostra} - \text{valor mediano da D.O. do CN})}{(\text{valor mediano da D.O. do CAL} - \text{valor mediano da D.O. do CN})}$$

Na etapa de triagem, todas as amostras-teste com DOP < 2,000, suspeitas de representar soroconversão recente, foram selecionadas para uma análise subsequente na etapa confirmatória. Todas as amostras-teste com DOP ≥ 2,000 na etapa de triagem foram consideradas como representativas de soroconversão antiga.

Na etapa confirmatória, a DOP das amostras-teste foi calculada com base na mediana dos valores de D.O. de cada replicata independente. Todas as amostras-teste com DOP mediana < 1,000 foram classificadas

como “Não Reagentes” no ensaio e foram consideradas como amostras representativas de soroconversão recente para o HIV-1; amostras com $DOP \geq 1,000$ foram classificadas como Reagentes e foram consideradas como amostras representativas de soroconversão antiga.

Tempo decorrido pós-soroconversão, de acordo com os resultados obtidos:

- Infecção recente ou incidente: menos de 170 dias pós-soroconversão (IC 95% = 162 - 183 dias);
- Infecção crônica, antiga ou estabelecida: 170 dias pós-soroconversão, ou mais.

Critérios de Controle de Qualidade para validação dos ensaios (estabelecidos pelos CDC-EUA):

- a)** Limites de referência 99% superior e inferior:
- PFR: valor da DOP deveria estar compreendido no intervalo 0,204 - 0,733
 - PF: valor da DOP deveria estar compreendido no intervalo 0,539 - 2,105
- b)** Intervalo de variação entre a DOP máxima e a DOP mínima em cada triplicata dos soros-controle, incluídas em todas as corridas:
- PFR: o valor ‘DOP máxima - DOP mínima’ deveria ser $\leq 0,247$.
 - PF: o valor ‘DOP máxima - DOP mínima’ deveria ser $\leq 1,000$.

A corrida foi repetida quando os critérios acima não foram alcançados.

Critérios de Controle de Qualidade para validação dos resultados da análise em triplicata de amostras-teste em ensaios confirmatórios (estabelecidos pelos CDC-EUA):

- DOP mediana $\leq 0,300$: o valor ‘DOP máxima - DOP mínima’ deveria ser menor do que $0,824 \times DOP$ mediana.
- $0,300 < DOP$ mediana $< 2,000$: o valor ‘DOP máxima - DOP mínima’ deveria ser menor do que $0,618 \times DOP$ mediana.

- DOP $\geq 2,000$: o valor 'DOP máxima - DOP mínima' deveria ser menor do que $0,412 \times$ DOP mediana.

Se os critérios acima não foram alcançados a respectiva amostra-teste foi reanalisada em outra corrida, em triplicata, a partir de novas diluições.

3.2.3. Cálculo da estimativa da incidência de HIV-1

A estimativa da incidência de infecção pelo HIV-1 foi calculada entre as amostras do estudo para as quais o universo de origem ou número de susceptíveis era conhecido (conjunto de amostras submetidas ao ensaio de triagem sorológica, do qual originam as amostras incluídas neste estudo)

A estimativa da incidência anual foi calculada de acordo com o método proposto por Janssen e colaboradores (1998), seguindo-se as orientações do CDC-EUA (2001) para os cálculos utilizando resultados obtidos por meio do ensaio Vironostika-LS. Os intervalos de confiança 95% foram calculados por meio do procedimento de Bonferroni (Janssen *et al.*, 1998), empregando-se a tabela de Intervalos de Confiança Poisson 97,5% contidas no manual dos CDC-EUA (2001). A fórmula utilizada para o cálculo da estimativa de incidência anual de HIV-1 foi a seguinte:

$$I_{dt} = \frac{n_{dt}}{N_{dt}} \frac{365,25}{T} \times 100$$

Onde:

I_{dt} = Incidência anual estimada

n_{dt} = Número de amostras "reagentes" nos ensaios de ELISA sensíveis/"não reagentes" no ensaio Vironostika-LS

N_{dt} = Número de amostras "não reagentes" nos ensaios de ELISA sensíveis (HIV-1-negativo) + Número de amostras "reagentes" nos ensaios de ELISA sensíveis/"não reagentes" no ensaio Vironostika-LS

T = 170 dias (número médio estimado de dias correspondentes ao período de janela de detecção)

Todos os cálculos foram realizados por meio de planilha eletrônica (Excel 97, Microsoft Corporation, EUA), empregando-se um programa de cálculo criado *in-house* para este estudo a partir das fórmulas existentes (Janssen *et al.*, 1998; CDC-EUA, 2001).

3.2.4. Teste de *WB* para a análise do padrão de bandas

A detecção e a identificação de anticorpos específicos contra os antígenos estruturais do HIV-1 foram realizadas com o emprego do conjunto de reagentes diagnóstico Genelabs HIV Blot 2.2 (Genelabs Diagnostics, Cingapura), composto de fitas de nitrocelulose, enumeradas e sensibilizadas com antígenos do HIV-1 obtidos pela propagação do vírus em linhagem de células CEM, lise celular e purificação. As proteínas purificadas foram separadas de acordo com o peso molecular, por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e foram transferidas para a nitrocelulose por meio de eletrotransferência. Os antígenos presentes nas fitas sensibilizadas são os seguintes: gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24 e p17 (Figura 1). Além das fitas previamente sensibilizadas e bloqueadas, o conjunto de reagentes contém: um soro controle positivo forte, apresentando reatividade contra todos os antígenos presentes na fita de reação, um soro controle positivo fraco, apresentando reatividade contra gp160, gp41 e p24 e um soro controle negativo para anticorpos anti-HIV; conjugado anticorpo de cabra anti-IgG humana, ligado à fosfatase alcalina, solução cromógena BCIP-NBT (5-bromo, 3-cloro indolil fosfato e nitroblue tetrazolium), solução de lavagem concentrada e solução de incubação concentrada.

Execução do ensaio:

Os procedimentos para a execução dos ensaios foram realizados estritamente de acordo com as instruções do fabricante do conjunto de diagnóstico, incluindo a preparação e o armazenamento dos reagentes. Os soros controle positivo forte, positivo fraco e negativo foram incluídos em

cada ensaio. As amostras e os controles foram diluídos em tampão diluente de amostra na proporção de 1:2.000 e foram incubados na presença das fitas de reação, em canaletas da placa de reação de WB, à temperatura ambiente (18 a 30°C), sob agitação constante durante toda a noite (16 a 20 horas).

Após a incubação, as fitas de reação foram lavadas por cinco minutos, 3 vezes cada uma, com solução de lavagem, sob agitação. Após o ciclo de lavagens, 2 mL de conjugado diluído a 1:1.000 foram adicionados a cada canaleta. A incubação do conjugado foi realizada em temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos.

Após a incubação do conjugado, as fitas foram lavadas por cinco minutos, 3 vezes, com solução de lavagem, sob agitação. Após a última lavagem, a solução foi aspirada e foram adicionados, a cada canaleta, 2 mL de substrato pronto para uso.

A incubação do substrato foi realizada em temperatura ambiente por 15 minutos, sob agitação. Após a incubação do substrato, as fitas foram lavadas 3 vezes com 2 mL de H₂O destilada, sob agitação manual, com intervalo de 1 a 2 minutos. Após a última lavagem, a água foi aspirada e as fitas foram mantidas em temperatura ambiente, ao ar livre e ao abrigo da luz até a completa secagem.

A leitura das fitas foi realizada após a secagem, da seguinte forma:

a) Identificação das bandas: As bandas presentes em cada fita correspondente ao teste da respectiva amostra foram identificadas de acordo com o peso molecular e com o padrão típico esperado para as frações antigênicas presentes na fase sólida, empregando-se a fita do controle positivo forte como guia. As bandas ausentes nas fitas de teste de amostra foram registradas como "negativas".

b) Graduação da intensidade de reação das bandas presentes: A intensidade de reação observada em cada fita de amostra-teste foi medida por comparação visual com a banda p24 da fita de reação do soro controle positivo fraco, em dois níveis:

- Intensidade igual ou maior do que a da banda p24 presente na fita de teste do soro controle positivo fraco: a banda da amostra-teste foi classificada como "positiva".
- Intensidade menor do que a da banda p24 presente na fita de teste do soro controle positivo fraco: a banda foi classificada como "indeterminada".

Devido à subjetividade que pode ocorrer na interpretação da graduação das bandas presentes, a leitura das fitas foi feita de forma cega, de forma que o observador desconhecia o resultado do ensaio Vironostika-LS obtido na análise das amostras que estavam sendo interpretadas.

3.2.5. Análise dos dados

O banco de dados do estudo foi elaborado empregando-se o programa EPI-Info, Versão 6.04d (CDC-Atlanta, EUA), de domínio público (Disponível em: [<http://www.cdc.gov/software>]).

Os cálculos estatísticos e os gráficos foram feitos com os recursos dos *softwares* EPI-Info, Excel 2003 (Microsoft Office, Microsoft Corporation/EUA), MULTLR Versão 7/89 (Campos-Filho e Franco, 1989) e Prism-Versão 3 (GraphPad Software Inc., EUA).

A análise descritiva foi realizada empregando-se a média e a mediana como medidas de tendência central. As associações de interesse para o estudo foram verificadas por meio do teste do Qui-quadrado, com correção de Yates. O teste exato de Fischer (bi-caudal) foi adotado para a análise de tabelas contendo caselas com valores inferiores a 5. As variáveis contínuas foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis. Para os testes de correlação, foi empregado o coeficiente de correlação de Spearman (r).

O estudo da associação entre os resultados do STARHS (variável dependente) e os perfis de reatividade das bandas presentes no teste de Western blot (variáveis independentes) foi realizado por meio de análise hierarquizada. Na análise bivariada (Qui-quadrado) foram calculados os

valores de *Odds Ratio* brutos. Todas as variáveis com valor de $p \leq 0,1$ nesta etapa foram posteriormente submetidas à análise de regressão logística múltipla, com a estimativa de *Odds Ratio* ajustada para as variáveis: sexo, idade e procedência.

Para as análises estatísticas, foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

3.2.6. Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) e pelas Comissões Científicas da Divisão de Biologia Médica e do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CCD-BM e CTCIAL, respectivamente), tendo sido cadastrado sob nº CCD-BM nº 11/04 (Anexo 4). Este estudo é parte integrante do projeto intitulado "Estimativa do tempo de infecção e características moleculares em amostras reativas para determinantes antigênicos do HIV-1", aprovado pela CEPIAL, pela CCD-BM e pelo CTCIAL, tendo sido registrado nestes comitês sob nº CCD-BM nº 28/01. O mesmo foi aprovado e registrado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/CNS/MS sob nº 11024.

Não foi obtido o consentimento pós-informação dos sujeitos da pesquisa, por tratar-se de levantamento sorológico anônimo desvinculado, a partir de amostras armazenadas em bancos de soros. O sigilo e a confidencialidade a respeito dos dados disponíveis dos indivíduos cujas amostras foram analisadas neste estudo foram preservados, não tendo sido utilizados os nomes ou outros identificadores destes sujeitos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Descrição da casuística

Com base nos critérios definidos, foram selecionadas 191 amostras de soro/plasma para compor a casuística deste estudo, assim distribuídas:

- GIAL: 106 amostras (55,5%)
- SC-IAL: 6 amostras (3,1%)
- RIAL: 37 amostras (19,4%)
- LIS: 42 amostras (22,0%)

Do total de amostras do estudo, 38,2% (73/191) não possuíam dados a respeito do sexo; 57,6% (110/191) eram amostras de pessoas do sexo feminino e 4,2% (8/191) eram de pessoas do sexo masculino.

Quanto à idade, o valor da mediana foi de 26 anos (16-49) e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos cujos dados estavam disponíveis ($p = 0,1070$) (Tabela 1; Figura 7).

Tabela 1: Características demográficas dos indivíduos testados para diagnóstico de infecção pelo HIV e resultado de bandas no teste de Western blot.

Procedência	N (%)	Sexo - N (%)			Idade Mediana ⁽⁴⁾ (anos) [Intervalo]
		Masc ⁽¹⁾	Fem ⁽²⁾	Desc. ⁽³⁾	
SC - IAL⁽⁵⁾	6 (3,1)	6 (100,0)	-	-	29 [23 - 37]
RIAL⁽⁶⁾	37 (19,4)	***	***	37 (100,0)	***
GIAL⁽⁷⁾	106 (55,5)	-	106 (100,0)	-	26 [16 - 39]
LIS⁽⁸⁾	42 (22,0)	2 (4,8)	4 (9,5)	36 (85,7)	26 [21 - 49]
Total	191 (100,0)	8 (4,2)	110 (57,6)	73 (38,2)	26 [16 - 49]

(1) Masculino; (2) Feminino; (3) Desconhecido; (4) $p=0,107$ - Teste de Kruskal-Wallis; (5) Amostras de soroconversores analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (6) Amostras de soroconversão recente analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (7) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (8) Amostras de clientes de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA analisadas no Laboratório Local de Iapexcerica da Serra.

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

*** Dado não disponível.

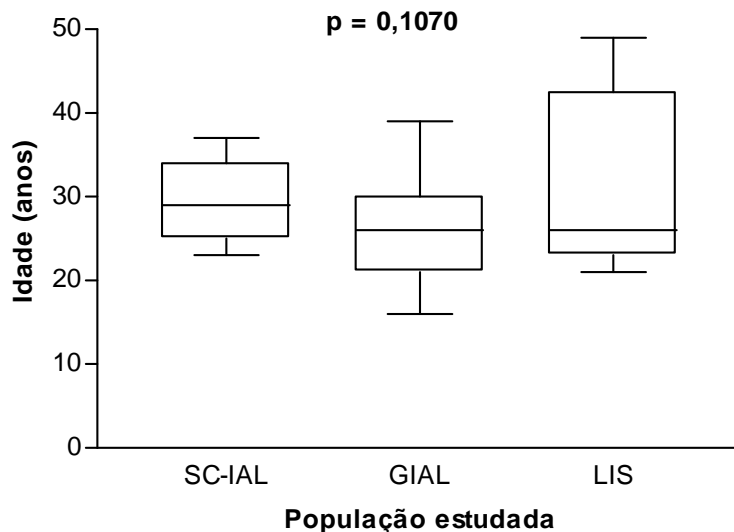


Figura 7: Comparação entre os valores das medianas da idade do grupo de soroconversores para HIV (SC-IAL), de gestantes (GIAL) e de usuários de CTA (LIS).

4.2. Análise do índice de reatividade em testes de ELISA sensíveis

A análise quantitativa da reatividade das amostras nos testes de ELISA sensíveis foi feita com base na relação DO/CO ou IR. Os ensaios sensíveis foram classificados em ensaios de 1ª geração e ensaios de 2ª/3ª geração, de acordo com a composição de antígenos empregados para a detecção de anticorpos anti-HIV. O intervalo de valores do IR variou de 1,3 a 18,0, para os ensaios de 1ª geração e de 0,9 a 23,8, para os ensaios de 2ª/3ª geração.

Do total, 122 amostras (63,9%) provenientes dos grupos SC-IAL, GIAL e LIS foram analisadas por meio de ensaios sensíveis de 1ª geração durante os procedimentos para o diagnóstico de infecção pelo HIV. Entre as amostras incidentes, 51,5% (17/33) apresentaram reatividade baixa, com IR $\leq 5,0$. Entre as amostras de infecção crônica, 69,6% (64/89) apresentaram reatividade moderada, com IR entre 5,1 e 15,0. O perfil de reatividade foi significativamente diferente quando comparados os grupos de amostras recentes e crônicas ($p = 0,019$). Quando a comparação foi feita segundo o grupo de população, observamos que a diferença entre o perfil de amostras recentes e de amostras crônicas manteve-se significativa para as amostras de gestantes ($p = 0,017$), mas não para a população de usuários de CTA ($p=0,545$) (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2: Valores do índice de reatividade (IR) ⁽¹⁾ obtido no ELISA sensível de 1ª e de 2/3ª geração, segundo os grupos de população avaliados.

Tipo de ELISA	Grupo de População			p
	SC-IAL ⁽²⁾	GIAL ⁽³⁾	LIS ⁽⁴⁾	
1ª Geração	5,55	7,30	6,60	0,4745
2/3ª geração	12,75	9,35	17,70	0,0004

(1) Mediana; (2) Amostras de soroconvertedores analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (3) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (4) Amostras de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA, analisadas no Laboratório Local de Itapeçerica da Serra.

Tabela 3: Resultado da avaliação da reatividade sorológica (IR) das amostras recentes e crônicas pelo HIV nos testes ELISA sensíveis de 1ª geração, por grupo de população analisada.

População	IR ⁽¹⁾	Infecções Recentes N (%)	Infecções Crônicas N (%)	Total N (%)	p ⁽²⁾
SC - IAL⁽³⁾	≤ 5,0	3 (50,0)	-	3 (50,0)	**
	5,1 - 10,0	2 (33,3)	-	2 (33,3)	
	10,1 - 15,0	1 (16,7)	-	1 (16,7)	
	≥ 15,1	-	-	-	
GIAL⁽⁴⁾	≤ 5,0	11 (61,1)	19 (25,3)	30 (32,3)	0,0174
	5,1 - 10,0	4 (22,2)	36 (48,0)	40 (43,0)	
	10,1 - 15,0	1 (5,6)	15 (20,0)	16 (17,2)	
	≥ 15,1	2 (11,1)	5 (6,7)	7 (7,5)	
LIS⁽⁵⁾	≤ 5,0	3 (33,3)	2 (14,3)	5 (21,7)	0,545
	5,1 - 10,0	2 (22,2)	7 (50,0)	9 (39,1)	
	10,1 - 15,0	3 (33,3)	4 (28,6)	7 (30,4)	
	≥ 15,1	1 (11,1)	1 (7,1)	2 (8,7)	
Todos os grupos	≤ 5,0	17 (51,5)	21 (23,6)	38 (31,1)	0,019
	5,1 - 10,0	8 (24,2)	43 (48,3)	51 (41,8)	
	10,1 - 15,0	5 (15,2)	19 (21,3)	24 (19,7)	
	≥ 15,1	3 (9,1)	6 (6,7)	9 (7,4)	
Total		33 (100,0)	89 (100,0)	122 (100,0)	

(1) Índice de reatividade; (2) Teste Qui-quadrado; (3) Amostras de soroconvertedores analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (4) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (5) Amostras de clientes de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA analisadas no Laboratório Local de Iapeçerica da Serra.

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

** Não se aplica ao dado obtido.

De 191 amostras que compuseram esta casuística, 135 (70,7%) foram analisadas por meio de ensaios sensíveis de 2ª/3ª geração durante os procedimentos rotineiros de diagnóstico. O estudo do perfil da reatividade destas amostras, avaliado por meio do IR, indicou que não houve diferença significativa em relação à distribuição das amostras, tanto para as amostras recentes quanto para as amostras crônicas ($p = 0,720$). A distribuição de

freqüências nos intervalos de valor do IR também não variou significativamente quando as amostras foram agrupadas segundo o tipo de população, embora uma diferença de significância limiar ($p = 0,146$) tenha sido observada entre amostras recentes e crônicas provenientes de usuários de CTA. Neste grupo, 92,8% das amostras (13/14) crônicas apresentaram IR > 10,1 (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da reatividade sorológica (IR) das amostras recentes e crônicas pelo HIV nos testes ELISA sensíveis de 2/3ª geração, por grupo de população analisada.

População	ÍR ⁽¹⁾	Infecções Recentes N (%)	Infecções Crônicas N (%)	Total N (%)	p ⁽²⁾
SC - IAL⁽³⁾	≤ 5,0	-	-	-	**
	5,1 - 10,0	2 (33,3)	-	2 (33,3)	
	10,1 - 15,0	3 (50,0)	-	3 (50,0)	
	≥ 15,1	1 (16,7)	-	1 (16,7)	
GIAL⁽⁴⁾	≤ 5,0	1 (5,6)	8 (9,1)	9 (8,5)	0,342
	5,1 - 10,0	12 (66,7)	38 (43,2)	50 (47,2)	
	10,1 - 15,0	2 (11,1)	19 (21,6)	21 (19,8)	
	≥ 15,1	3 (16,7)	23 (26,1)	26 (24,5)	
LIS⁽⁵⁾	≤ 5,0	2 (22,2)	-	2 (8,7)	0,146
	5,1 - 10,0	2 (22,2)	1 (7,1)	3 (13,0)	
	10,1 - 15,0	0 (0,0)	1 (7,1)	1 (4,3)	
	≥ 15,1	5 (55,6)	12 (85,7)	17 (73,9)	
Todos os grupos	≤ 5,0	3 (9,1)	8 (7,8)	11 (8,1)	0,720
	5,1 - 10,0	16 (48,5)	39 (38,2)	55 (40,7)	
	10,1 - 15,0	5 (15,2)	20 (19,6)	25 (18,5)	
	≥ 15,1	9 (27,3)	35 (34,3)	44 (32,6)	
Total		33 (100,0)	102 (100,0)	135 (100,0)	

(1) Índice de reatividade; (2) Teste Qui-quadrado; (3) Amostras de soroconvertedores analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (4) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (5) Amostras de clientes de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA analisadas no Laboratório Local de Iapeçerica da Serra.

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

** Não se aplica ao dado obtido.

Com a finalidade de comparar os padrões de reatividade das amostras nos ensaios sensíveis de 1ª e de 2/3ª geração, 96 pares de

resultados foram normalizados por meio de transformação logarítmica (base 10) e analisados quanto à média e desvio padrão dos valores do IR. A correlação entre os valores do IR das amostras nos dois tipos de ensaio foi baixa ($r = 0,373$), sugerindo padrões distintos para cada um. A média do Log_{10}IR dos testes de 1ª geração ($0,892 \pm 0,022$) foi significativamente menor ($p < 0,0001$) do que a média do IR dos testes de 2ª/3ª geração ($1,045 \pm 0,018$) (Figura 8).

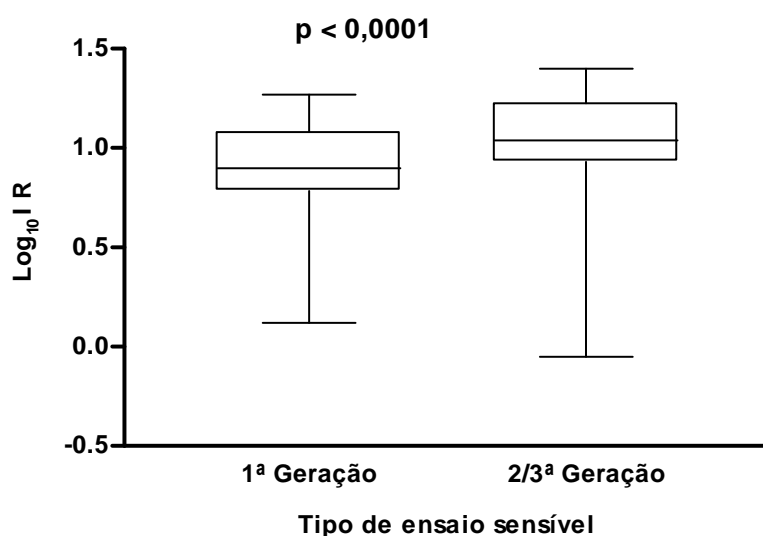


Figura 8: Comparação entre os valores do IR (Log_{10}) das amostras nos testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-HIV sensíveis de 1ª e de 2ª/3ª geração.

4.3. Identificação de amostras de infecção recente

Na avaliação feita por meio do protocolo STARHS-OT, foram observadas 47 amostras com perfil compatível com infecção recente pelo HIV-1 ($\text{DPO} < 1,0$) (amostras recentes ou incidentes), sendo 6 (12,8%) provenientes de pacientes com soroconversão ocorrida há menos de 8 meses (média de 188 dias; 106-242 dias), 11 (23,4%) provenientes de

pacientes suspeitos de infecção recente pelo HIV, 12 (25,5%) provenientes de usuários de CTA e 18 (38,3%) provenientes de gestantes. Quanto à frequência, foram encontradas 6/6 (100,0%) amostras de infecção recente no grupo de soroconvertores, 11/37 (29,7%) no grupo de pacientes suspeitos de infecção recente, 12/42 (28,6%) no grupo de usuários de CTA e 18/106 (17,0%) no grupo de gestantes (Tabela 5). Amostras de infecção crônica (DOP \geq 1,0) foram observadas em maior proporção no grupo proveniente de gestantes (83,0%), seguido pelo grupo de usuários de CTA (71,4%) e pacientes suspeitos de infecção recente (70,3%). Nenhum caso foi observado entre os pacientes com soroconversão <8 meses (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência de soroconversões recentes e crônicas para o HIV, segundo o resultado do protocolo STARHS e a procedência das amostras.

População Procedência	Tipo de soroconversão para o HIV ⁽¹⁾		Total
	Recente	Crônica	
SC - IAL ⁽²⁾	6 (100,0)	-	6 (3,1)
RIAL ⁽³⁾	11 (29,7)	26 (70,3)	37 (19,4)
GIAL ⁽⁴⁾	18 (17,0)	88 (83,0)	106 (55,5)
LIS ⁽⁵⁾	12 (28,6)	30 (71,4)	42 (22,0)
Total	47 (24,6)	144 (75,4)	191 (100,0)

(1) $p = 0,1439$ (teste do Qui-quadrado), excluindo-se o grupo de SC-IAL; (2) Amostras de soroconvertores analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (3) Amostras de soroconversão recente analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (4) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (5) Amostras de clientes de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA analisadas no Laboratório Local de Iapeperica da Serra.

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

Excluindo-se o grupo de soroconvertores da análise, não foi observada diferença significativa no padrão de distribuição de amostras de infecção recente e crônica entre os demais grupos ($p = 0,1439$) (Figura 9).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição das amostras de infecção recente e crônica segundo a idade, agrupada em faixas de 5 em 5 anos ($p=0,7449$), sendo que a informação referente à mesma não estava disponível para 83/191 (43,5%) das amostras analisadas (Figura 10).

As amostras provenientes de gestantes foram agrupadas segundo o ano de colheita, para a avaliação da tendência relativa à frequência de infecções recentes e antigas no período analisado. A proporção de infecções recentes variou de zero, nos anos de 1996, 2000 e 2001, a 66,7% (2002), com uma média de 17% (Tabela 6).

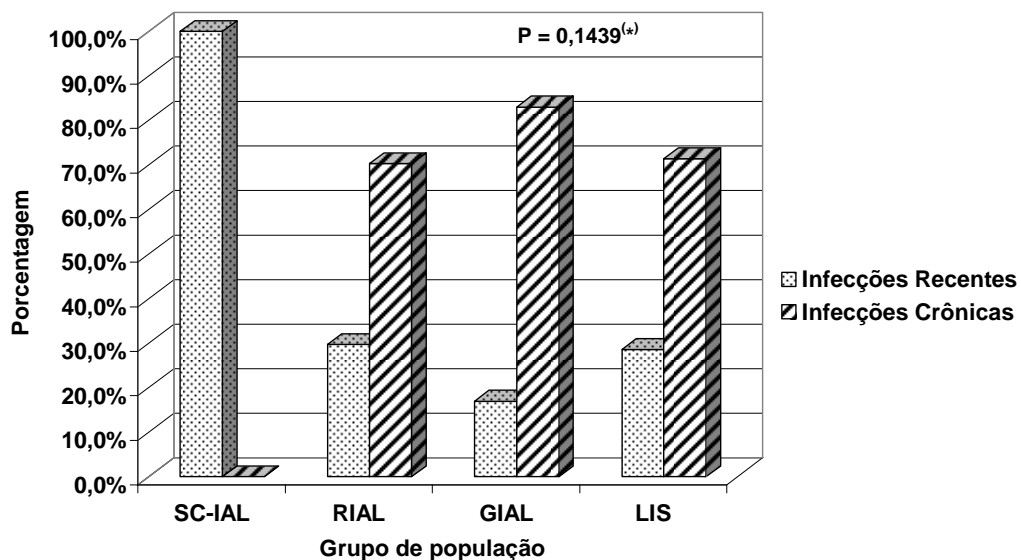


Figura 9: Distribuição das amostras de infecção recente e infecção crônica pelo HIV, segundo o grupo de população analisada.

(*) Excluindo-se o grupo de soroconvertores.

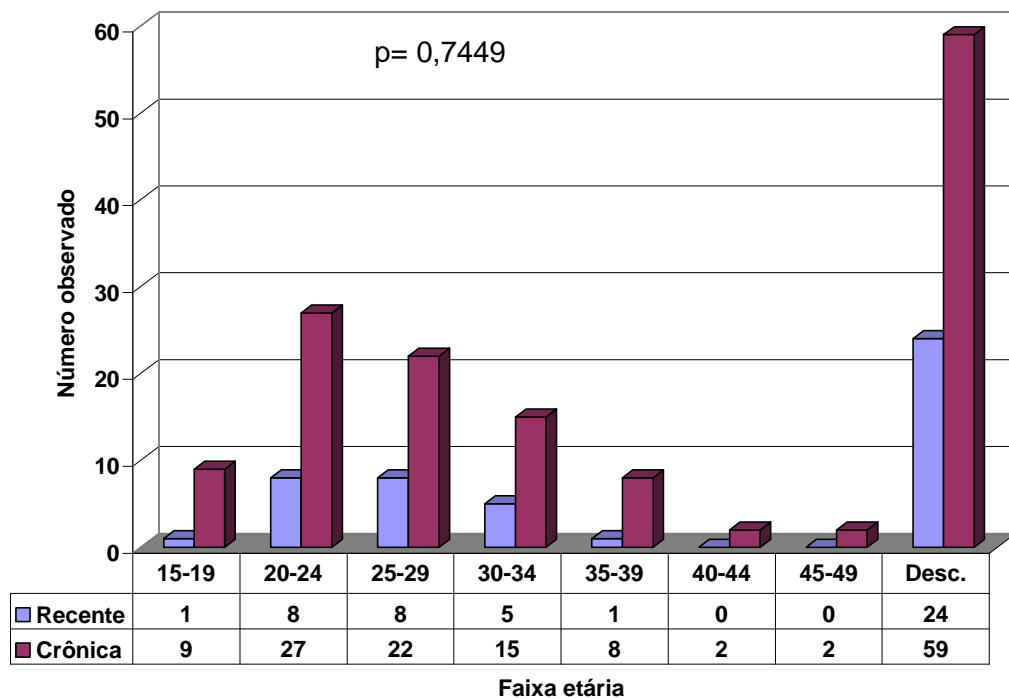


Figura 10: Distribuição do número de infecções recentes e crônicas pelo HIV, segundo a faixa etária (anos) correspondente às amostras de soro analisadas.

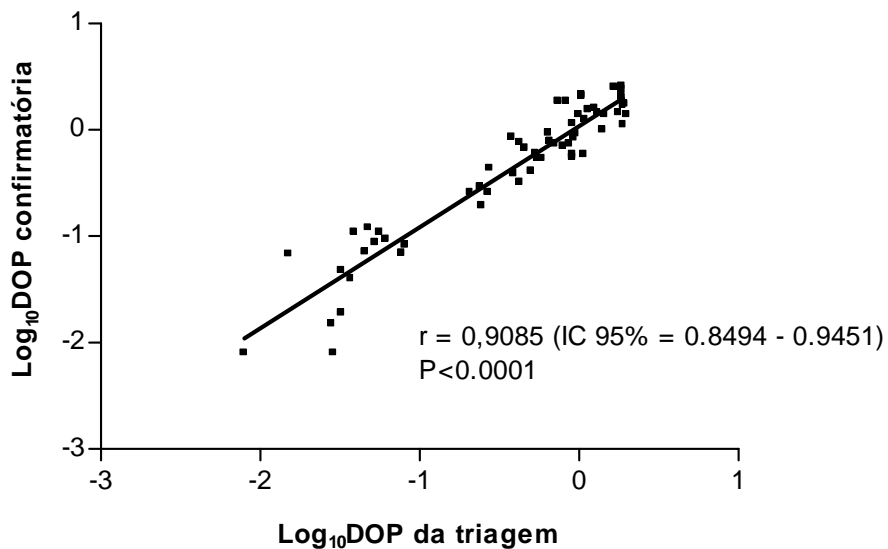


Figura 11: Correlação entre os valores da DOP-inicial (ensaio de triagem) e da DOP-confirmatória, resultantes da avaliação de amostras de infecção recente pelo HIV por meio do protocolo STARHS-OT.

Tabela 6: Frequência de soroconversões recentes e crônicas para o HIV, segundo o resultado do protocolo STARHS e o ano de coleta das amostras de soro.

Ano de coleta	Tipo de Infecção ⁽¹⁾		Total de Amostras HIV+
	Recente N (%)	Crônica N (%)	
1991	3 (30,0)	7 (70,0)	10
1992	1 (20,0)	4 (80,0)	5
1993	4 (25,0)	12 (75,0)	16
1994	1 (5,9)	16 (94,1)	17
1995	3 (15,8)	16 (84,2)	19
1996	-	9 (100,0)	9
1997	1 (12,5)	7 (87,5)	8
1998	1 (20,0)	4 (80,0)	5
1999	2 (28,6)	5 (71,4)	7
2000	-	3 (100,0)	3
2001	-	4 (100,0)	4
2002	2 (66,7)	1 (33,3)	3
Total	18 (17,0)	88 (83,0)	106

(1) $p = 0,3060$ (teste do Qui-quadrado).

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

4.3.1. Análise da reprodutibilidade do ensaio menos sensível em amostras de infecção recente

Tendo em vista que a confirmação do resultado inicial do ensaio menos sensível foi feita por meio da repetição dos testes em triplicatas individuais, a reprodutibilidade do mesmo foi avaliada comparando-se os valores de $\text{Log}_{10}\text{DOP}$ inicial com os valores de $\text{Log}_{10}\text{DOP}$ mediana referente

às três replicatas do teste de confirmação. Na comparação realizada em 68 pares de resultados, o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9085 (Intervalo de Confiança 95% 0,8494-0,9451) ($p < 0,0001$) (Figura 11).

4.4. Análise da estimativa da incidência da infecção pelo HIV

A incidência da infecção pelo HIV foi estimada para o grupo de amostras de gestantes, coletadas entre janeiro/99 a abril/2002, e para o grupo de amostras de usuários de CTA, coletadas entre outubro/00 e outubro/2001. Nestes períodos foi possível determinar, através dos registros existentes, o número inicial do universo amostral do qual se originaram as amostras disponíveis para o estudo, ou seja, o número total de amostras provenientes destas mesmas populações, analisadas paralelamente durante os procedimentos de diagnóstico.

De acordo com os registros da Seção de Sorologia do IAL, no período de janeiro/99 a abril/02 foram registradas 4.247 amostras identificadas como amostras de gestantes, encaminhadas para o diagnóstico laboratorial de infecção pelo HIV. Destas, 14 (0,33%) foram classificadas como "Amostras Positivas para HIV-1" após a realização dos procedimentos preconizados pela legislação vigente. Treze destas 14 amostras (92,9%) estavam disponíveis para a realização do ensaio menos sensível para detecção de infecção recente pelo HIV. A estimativa da incidência de infecção pelo HIV a partir de soros de gestantes analisados na Seção de Sorologia do IAL entre 1999 e 2002 foi de 0,2/100 amostras de soro-ano (IC 95%= 0,041-0,608/100 amostras de soro-ano), com uma curva de tendência variando entre zero e 0,5/100 amostras de soro-ano (Tabela 7; Figura 12).

Tabela 7: Soroincidência (ajustada) de infecção pelo HIV entre as amostras de soro de gestantes, segundo o ano de coleta, de 1999 a 2002.

Ano	Nº Amostras	N.º HIV + (%)	N.º STARHS	N.º (%) Infecções Recentes	Incidência Ajustada/100 amostras de soro-ano (IC 95%)
1.999	2.205	5 (0,2)	4	2 (50,0)	0,234 (0,015 - 0,843)
2.000	683	2 (0,3)	2	-	0 (0 - 1,237)
2.001	845	4 (0,5)	4	-	0 (0 - 1,001)
2.002	514	3 (0,6)	3	2 (66,7)	0,838 (0,064 - 3,627)
Total	4.247	14 (0,3)	13	4 (30,8)	0,218 (0,041 - 0,608)

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

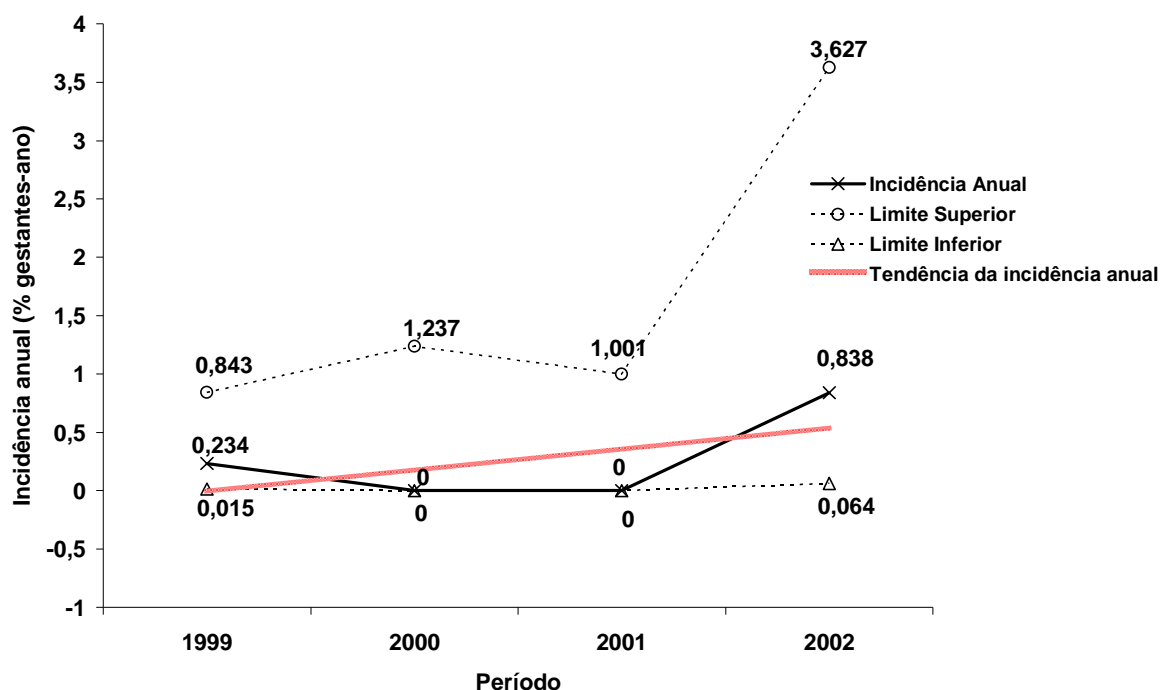


Figura 12: Avaliação da tendência da soroincidência da infecção pelo HIV com amostras de gestantes (incidência/100 amostras de soro-ano) analisadas no IAL de 1999 a 2002.

Com relação à soroteca do Laboratório de Itapeçerica da Serra, no período de outubro/2000 a outubro/2001 foram registradas 846 amostras procedentes de usuários de CTA, das quais 46 (5,44%) eram positivas para o HIV. Destas 46 amostras, 42 (91,3%) estavam disponíveis para a realização do ensaio menos-sensível. A incidência estimada de infecção pelo HIV a partir de soros de usuários de CTA foi de 3,3/100 amostras de soro-ano (IC 95%= 1,426 - 6,345/100 amostras de soro-ano).

Os cálculos para as estimativas de incidência da infecção pelo HIV e respectivos intervalos de confiança 95% foram realizados com base na proporção ajustada de amostras incidentes no período estudado, considerando-se as perdas relativas às amostras não disponíveis para análise, conforme o método proposto por Janssen e colaboradores (1998). Na Tabela 7 encontram-se as proporções de amostras HIV+ e as estimativas de incidência de infecção pelo HIV, observadas a partir de amostras de gestantes, segundo período anual; na Tabela 8, encontram-se as estimativas calculadas a partir de amostras de gestantes e de usuários de CTA, compreendendo os períodos analisados em cada caso.

Tabela 8: Estimativa da soroincidência de infecção pelo HIV entre amostras de soro de gestantes e de usuários de CTA⁽¹⁾ analisadas no Instituto Adolfo Lutz e no Laboratório Local de Itapeçerica da Serra, respectivamente, selecionadas para o estudo; São Paulo, 1999-2002 e 2000-2001, respectivamente.

Grupo	Período	N	Nº (%) HIV+	Nº (%) Amostras STARHS	Nº (%) Amostras Incidentes	Incidência Anual/ 100 amostras de soro-ano (IC - 95%) ⁽⁶⁾
GIAL ⁽²⁾	1999 - 2002 ⁽⁴⁾	4.247	14 (0,3)	13 (92,9)	4 (30,8)	0,2 (0,041 - 0,608)
LIS ⁽³⁾	2000 - 2001 ⁽⁵⁾	846	46 (5,4)	42 (91,3)	12 (28,6)	3,3 (1,426 - 6,345)

(1) Centros de Testagem e Aconselhamento; (2) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (3) Amostras de clientes de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA analisadas no Laboratório Local de Itapeçerica da Serra; (4) Janeiro a Abril, 2002; (5) Outubro, 2000 a Outubro, 2001; (6) Intervalo de confiança 95%.

Nota: Dados percentuais arredondados.

4.5. Análise do perfil de bandas no teste de *Western blot*

Na análise dos perfis da reatividade dos anticorpos IgG dirigidos contra as frações antigênicas da estrutura do HIV-1, analisados por meio do teste de *Western blot* em 190 amostras (99,5%), observou-se que, em linhas gerais, as amostras de infecção recente produziram um padrão de coloração das bandas menos intenso do que o observado na avaliação das amostras de infecção crônica (Apêndices 1 a 4). Com exceção de gp160, p24 e p17, a frequência de bandas com padrão "positivo", "positivo fraco" e "negativo" foi diferente entre amostras incidentes e crônicas. Observou-se um número proporcionalmente maior de bandas com reatividade negativa entre as amostras incidentes e um número proporcionalmente maior de bandas com reatividade positiva entre as amostras crônicas (Tabela 9).

Tabela 9: Número e porcentagem de vezes em que foram observados os padrões de reatividade positivo forte, positivo fraco e negativo no teste de Western blotting para HIV, segundo o tempo de infecção pelo HIV e a fração antigênica (banda).

Banda	Padrão	Infecções Recentes	Infecções Crônicas	P⁽¹⁾
gp160	P ⁽²⁾	46 (100,0)	144 (100,0)	1,0
	PF ⁽³⁾	-	-	
	N ⁽⁴⁾	-	-	
gp120	P	41 (89,1)	142 (98,6)	0,0098
	PF	5 (10,9)	2 (1,4)	
	N	-	-	
p66	P	30 (65,2)	134 (93,1)	<0,0001
	PF	13 (28,3)	9 (6,3)	
	N	3 (6,5)	1 (0,7)	
p55	P	11 (23,9)	92 (63,9)	<0,0001
	PF	12 (26,1)	30 (20,8)	
	N	23 (50,0)	22 (15,3)	
p51	P	23 (50,)	129 (89,6)	<0,0001
	PF	15 (32,6)	11 (7,6)	
	N	8 (17,4)	4 (2,8)	
gp41	P	15 (32,6)	143 (99,3)	<0,0001
	PF	25 (54,3)	-	
	N	6 (13,0)	1 (0,7)	
p31	P	20 (43,5)	133 (92,4)	<0,0001
	PF	21 (45,7)	11 (7,6)	
	N	5 (10,9)	-	
p24	P	44 (95,6)	132 (91,7)	0,2962
	PF	1 (2,2)	11 (7,6)	
	N	1 (2,2)	1 (0,7)	
p17	P	30 (65,2)	99 (68,8)	0,3484
	PF	12 (26,1)	40 (27,8)	
	N	4 (8,7)	5 (3,5)	

(1) Teste de Qui-quadrado; (2) positivo forte; (3) positivo fraco; (4) negativo.

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento.

Quando as amostras foram agrupadas segundo a população, estas tendências foram mantidas, com variações nas proporções e nos níveis de significância (Tabela 10).

A fim de comparar visualmente os padrões de bandas presentes em fitas de amostras classificadas como infecção recente e fitas de amostras classificadas como infecção crônica, uma análise semiquantitativa foi realizada. Para isso, foram selecionadas, por meio de sorteio aleatório, 14 fitas de teste correspondentes a amostras de infecção recente e 16 fitas correspondentes a amostras de infecção crônica, as quais foram alinhadas de acordo com os valores da DOP inicial, em ordem crescente. Nesta avaliação, observou-se a presença de um padrão relativamente homogêneo que distingue o grupo de fitas de amostras incidentes do grupo de amostras crônicas. No geral, as bandas presentes nas fitas de teste do grupo de amostras incidentes têm coloração menos intensa, são mais nítidas e se apresentam em menor número do que as bandas presentes nas fitas de teste do grupo de amostras crônicas (Figura 13).

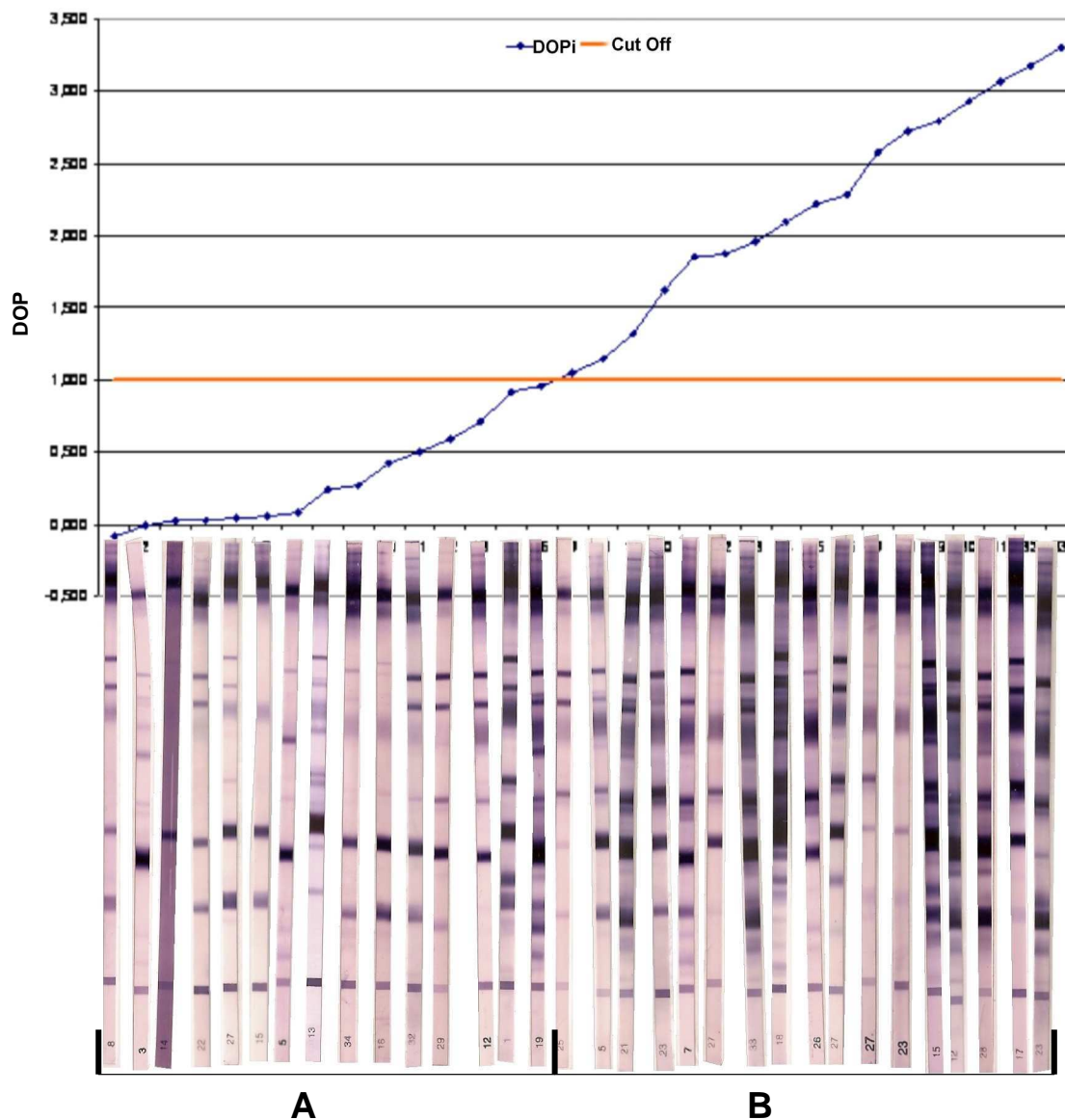


Figura 13: Perfil de bandas presentes em 32 fitas do teste de Western Blot para detecção de anticorpos anti-HIV, selecionadas por meio de sorteio a partir das 191 fitas referentes às amostras de soro analisadas. As fitas, agrupadas segundo o tempo de infecção pelo HIV (recente ou crônica), foram alinhadas de acordo com o valor crescente da Densidade Óptica Padronizada inicial (DOPi) observada no protocolo STARHS-OT. **A:** amostras de infecção recente (da esquerda para a direita, os números do WB são os seguintes: 107, 152, 111, 144, 100, 92, 154, 191, 3, 2, 142, 29, 160, 76 e 167). **B:** amostras de infecção crônica (da esquerda para a direita, os números do WB são os seguintes: 14, 54, 119, 136, 156, 12, 143, 99, 174, 73, 35, 39, 112, 122, 11, 114 e 133). Figura confeccionada empregando-se método descrito por Parekh (2006).

Tabela 10: Perfil da reatividade dos anticorpos séricos anti-HIV observado no teste de Western blot, segundo a procedência das amostras, o tempo de infecção pelo HIV e fração antigênica.

(continua)

Banda	Padrão	SC - IAL ⁽¹⁾		RIAL ⁽²⁾		GIAL ⁽³⁾		LIS ⁽⁴⁾	
		N = 6		N = 36		N = 106		N = 42	
		Recente	Antiga	Recente	Antiga	Recente	Antiga	Recente	Antiga
Gp160	P ⁽⁵⁾	6 (100,0)	-	10 (100,0)	26 (100,0)	18 (100,0)	88 (100,0)	12 (100,0)	30 (100,0)
	PF ⁽⁶⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
	N ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-	-	-
	Valor de p⁽⁸⁾	**		1,000		1,000		1,000	
Gp120	P	6 (100,0)	-	10 (100,0)	26 (100,0)	16 (88,9)	86 (97,7)	9 (75,0)	30 (100,0)
	PF	-	-	-	-	2 (11,1)	2 (2,3)	3 (25,0)	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-
	Valor de p	**		1,000		0,0743		0,0050	
P66	P	4 (66,7)	-	4 (40,0)	23 (88,5)	13 (72,2)	81 (92,0)	9 (75,0)	30 (100,0)
	PF	1 (16,7)	-	5 (50,0)	3 (11,5)	4 (22,2)	6 (6,8)	3 (25,0)	-
	N	1 (16,7)	-	1 (10,0)	-	1 (5,6)	1 (1,1)	-	-
	Valor de p	**		0,0091		0,0521		0,0194	
P55	P	4 (66,7)	-	2 (20,0)	20 (76,9)	8 (44,4)	53 (60,2)	1 (8,3)	19 (63,3)
	PF	-	-	2 (20,0)	3 (11,5)	4 (22,2)	17 (19,3)	4 (33,3)	2 (6,7)
	N	2 (33,3)	-	6 (60,0)	3 (11,5)	6 (33,3)	18 (20,5)	7 (58,3)	9 (30,0)
	Valor de p	**		0,0048		0,4090		0,0036	
P51	P	1 (16,7)	-	3 (30,0)	23 (88,5)	11 (61,1)	76 (86,4)	8 (66,7)	30 (100,0)
	PF	3 (50,0)	-	3 (30,0)	3 (11,5)	6 (33,3)	8 (9,1)	3 (25,0)	-
	N	2 (33,3)	-	4 (40,0)	-	1 (5,6)	4 (4,5)	1 (8,3)	-
	Valor de p	**		0,0006		0,0206		0,0045	

Tabela 10: Perfil da reatividade dos anticorpos séricos anti-HIV observado no teste de Western blot, segundo a procedência das amostras, o tempo de infecção pelo HIV e fração antigênica (conclusão)

Banda	Padrão	SC - IAL N = 6		RIAL N = 36		GIAL N = 106		LIS N = 42	
		Recente	Antiga	Recente	Antiga	Recente	Antiga	Recente	Antiga
Gp41	P	1 (16,7)	-	1 (40,0)	26 (100,0)	8 (44,4)	88 (100,0)	5 (41,7)	29 (96,7)
	PF	4 (66,7)	-	7 (70,0)	-	8 (44,4)	-	6 (50,0)	-
	N	1 (16,7)	-	2 (20,0)	-	2 (11,1)	-	1 (8,3)	1 (3,3)
Valor de p		**		<0,0001		<0,0001		0,0001	
P31	P	2 (33,3)	-	1 (10,0)	23 (88,5)	11 (61,1)	81 (92,0)	6 (50,0)	29 (96,7)
	PF	-	-	8 (80,0)	3 (11,5)	6 (33,3)	7 (8,0)	3 (25,0)	1 (3,3)
	N	4 (66,7)	-	1 (10,0)	-	1 (5,6)	-	3 (25,0)	-
Valor de p		**		0,0001		0,0008		0,0011	
P24	P	6 (100,0)	-	8 (80,0)	24 (92,3)	18 (100,0)	82 (93,2)	12 (100,0)	26 (86,7)
	PF	-	-	1 (10,0)	2 (7,7)	-	5 (5,7)	-	4 (13,3)
	N	-	-	1 (10,0)	-	-	1 (1,1)	-	-
Valor de p		**		0,2602		0,5250		0,4218	
P17	P	4 (66,7)	-	4 (40,0)	13 (50,0)	15 (83,3)	62 (70,5)	7 (58,3)	24 (80,0)
	PF	2 (33,3)	-	6 (60,0)	10 (38,5)	1 (5,6)	24 (27,3)	3 (25,0)	6 (20,0)
	N	-	-	-	3 (11,5)	2 (11,1)	2 (2,3)	2 (16,7)	-
Valor de p		**		0,3673		0,0415		0,0636	

(1) Amostras de soroconvertores analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (2) Amostras de soroconversão recente analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (3) Amostras de gestantes analisadas no Instituto Adolfo Lutz; (4) Amostras de clientes de Centro de Testagem e Aconselhamento – CTA analisadas no Laboratório Local de Iapicerica da Serra; (5) positivo forte; (6) positivo fraco; (7) negativo; (8) teste do qui-quadrado.

Notas: Dados percentuais arredondados.

Sinais convencionais utilizados:

- Dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento; ** Não se aplica ao dado obtido.

4.6. Associação entre os resultados do protocolo STARHS e o perfil das bandas no WB

Na análise univariada, a presença de reatividade positiva nas regiões correspondentes às frações gp120, p66, p55, p51, gp41 e p31 estava significativamente associada ($p < 0,0001$) à infecção crônica; por outro lado, a presença de reatividade negativa/positiva-fracas nestas regiões estava significativamente associada ($p < 0,0001$) à infecção recente (Tabela 9). Na análise bivariada, reatividades fracas ou ausentes nas regiões correspondentes às bandas (em ordem decrescente de importância) gp41, gp120, p31, p51, p66 e p55 mantiveram-se como fatores independentemente associados à probabilidade de resultado “recente” no STARHS. De acordo com o modelo de regressão testado na análise multivariada, apenas a reatividade fraca ou ausente na região da gp41 (estimativas ajustadas pela procedência, sexo e idade) foi mantida como fator independentemente associado ao aumento da probabilidade (cerca de 20 vezes) de classificação da amostra de soro como infecção recente (Odds Ratio (OR) = 16,44 (IC 95% = 6,32 - 42,75); $p < 0,0001$) (Tabela 11).

Tabela 11: Probabilidade (Odds Ratio) de ocorrência de bandas com perfil de reatividade “Negativo/“Indeterminado” no teste de Western blotting realizado em amostras de soro classificadas como “Infecção Recente” no protocolo STARHS.

Bandas	Odds Ratio (IC 95%)⁽¹⁾	p
gp41	16,44 (6,32 - 42,75)	<0.001
P31	6,15 (2,82 - 13,44)	<0,0001
p51	4,50 (2,08 - 9,73)	0,0001
P55	3,34 (1,66 - 6,75)	0,0005
P66	3,97 (1,68 - 9,37)	0,0019

(1) Ajustado pela idade, sexo e procedência.

Quando as demais variáveis (gp120, p66, p55, p51 ou p31) foram adicionadas a esse modelo de regressão, a associação entre padrão de reatividade fraca ou ausente e infecção recente deixou de ser significativa, apesar da probabilidade aumentada para a classificação como infecção recente nas amostras com baixa reatividade para estas bandas (gp41+p31: OR = 11,99 (3,65 - 39,46), p = 0,419; gp41+p51: OR =13,01 (4,52 -37,44), p = 0,345; gp41+p66: OR = 16,29 (5,39 - 49,27), p = 0,974).

Por outro lado, verificou-se que padrões de reatividade intensos (reatividade positiva) contra as frações codificadas pelo *Env* ou *Gag* estavam significativamente associados com a probabilidade de classificação da amostra como infecção crônica (p <0,0001). Esta foi 180 vezes maior entre as amostras que produziram bandas positivas nas regiões correspondentes às frações gp160, gp120 e gp41, simultaneamente, e 7 vezes maior entre as amostras com resultado positivo para as bandas p55, p24 e p17, simultaneamente. (Tabela 12).

Tabela 12: Probabilidade (Odds Ratio) de ocorrência de grupos de bandas com perfil de reatividade “Positivo” no teste de Western blot realizado em amostras de soro classificadas como “Infecção Crônica” no protocolo STARHS.

Combinação de frações estruturais do HIV-1	Odds Ratio (IC 95%)⁽¹⁾	P⁽²⁾
<i>Env</i> gp160 + gp120 + gp41	177,91 (22,6– 1400,8)	<0.001
<i>Pol</i> p66 + p51 + p31	0,79 (0,14 – 4,37)	0,7812
<i>Gag</i> p55 + p24 + p17	7,01(3,05 – 16,14)	<0,0001

(1) Não ajustado

(2) Ponderado pelo método de Mantel-Haenzel; teste exato de Fisher.

A partir dos dados referentes à análise das amostras de soro de gestantes, um manuscrito foi preparado, tendo sido submetido e aceito para publicação em 2005 (Apêndice 5).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A casuística deste estudo foi composta por amostras de soro encaminhadas aos laboratórios participantes para a realização de procedimentos com vistas ao diagnóstico de infecção pelo HIV. Amostras de soro de indivíduos considerados soroconvertores (com base na data do último teste negativo para o HIV) e de indivíduos suspeitos de soroconversão recente foram incluídas neste estudo como controles para avaliação dos perfis de reatividade nos ensaios realizados.

Algumas limitações deste estudo podem ter causado tendências e distorções nos resultados observados, as quais devem ser discutidas.

Os critérios para a seleção de amostras para o estudo, definidos com base na disponibilidade de dados registrados, não nos permitiram determinar e controlar alguns fatores que são relevantes para esta pesquisa. Entre eles, podemos citar: (i) presença de sintomas sugestivos de imunossupressão severa, (ii) diagnóstico de infecção pelo HIV/Aids já estabelecido no momento da coleta do sangue, (iii) uso da terapêutica antiretroviral, (iv) presença de co-infecções, (v) seleção prévia dos indivíduos os quais foram submetidos à testagem sorológica para o HIV e (vi) variabilidade viral.

Resultados falsamente negativos podem ser observados na realização do protocolo STARHS, quando são analisadas amostras provenientes de indivíduos com baixas contagens de células T CD4+ (Janssen *et al.*, 1998; Parekh *et al.*, 2002, Teixeira *et al.*, 2004).

Casos de sororeversão de anticorpos anti-HIV foram observados em indivíduos tratados precocemente, durante a fase aguda da doença, com terapia anti-retroviral (Kassutto *et al.*, 2005). Dukers e colaboradores (2002) relataram ter encontrado traços de drogas antiretrovirais no sangue de 21/58 (36,2%) voluntários homossexuais masculinos de Amsterdã, classificados como recém-infectados com emprego do protocolo STARHS-OT. Cornelissen e colaboradores (2006) observaram uma diminuição não significativa ($p = 0,056$) nos níveis de anticorpos anti-HIV no soro de 37/80 (46,3%) indivíduos tratados

há mais de cinco anos com drogas antiretrovirais, independentemente das oscilações da carga viral.

Em estudo conduzido por Marques e colaboradores (2002), no qual foram entrevistadas mulheres HIV+ que fizeram tratamento pré-natal em serviços públicos de três cidades do Estado de São Paulo, 45% (49/109) das gestantes soropositivas sabiam que eram portadoras do HIV ao engravidar. Dentre aquelas que se lembravam em que mês da gestação o teste anti-HIV havia sido oferecido, 64,3% (27/42) informaram que foi no 4º mês ou mais tarde (>120 dias de gestação).

Além disso, existe a possibilidade de que o encaminhamento das amostras para diagnóstico de infecção pelo HIV seja feito meramente por medidas protocolares, tais como a complementação de documentos para o prontuário médico ou para fins de vigilância epidemiológica.

As amostras analisadas neste estudo foram encaminhadas aos laboratórios para testes de triagem diagnóstica, mas não são provenientes de serviços de assistência especializada em HIV/Aids. Com relação às amostras provenientes do Laboratório de Itapeverica da Serra, o CTA local, em geral, realiza apenas a testagem e o aconselhamento pré e pós-teste, cabendo ao Serviço de Assistência Especializada em DST e Aids (SAE) do município o atendimento médico. Por isso, acreditamos que casos de indivíduos com baixas contagens de células T CD4+ e/ou em tratamento antiretroviral estejam pouco representados na casuística estudada.

A inclusão de critérios para a seleção prévia de pessoas que são submetidas ao teste para diagnóstico de infecção pelo HIV pode interferir nas proporções de amostras negativas e positivas observadas no teste de triagem (sensível). Assim, se considerarmos uma mesma população com acesso a dois serviços de saúde distintos, sendo que em um deles há ênfase na inclusão e em outro há ênfase na exclusão de casos com epidemiologia e/ou sintomatologia sugestivas de infecção pelo HIV, a incidência será superestimada no primeiro caso e subestimada no segundo. Desta forma, os dados de incidência obtidos a partir de populações atendidas em serviços de assistência podem refletir mais o acesso ao diagnóstico na região do que propriamente a dinâmica da transmissão do vírus em si.

No estudo realizado por Marques e colaboradores (2002), não foi encontrada diferença significativa quanto a fatores de vulnerabilidade para infecção pelo HIV entre as mulheres que já sabiam da soropositividade para o HIV ao iniciarem o pré-natal e aquelas que souberam durante o pré-natal ou após o parto. Também não foi encontrada associação entre oferecimento do teste para HIV no pré-natal e conhecimento prévio da soropositividade ($p=0,077$). Esses dados sugerem que as gestantes atendidas nos serviços de pré-natal das localidades estudadas tiveram acesso semelhante ao teste para diagnóstico de infecção pelo HIV. Podemos supor, desta forma, que não houve ênfase na pré-seleção das pacientes.

Considerando estas informações e também a semelhança entre a taxa de soroprevalência de HIV na população Sentinela de gestantes do Brasil em anos recentes (0,47%) (Brasil, 2002) e a taxa encontrada entre as amostras de soro de gestantes da nossa casuística (14/4.247; 0,33%), acreditamos que fatores como o acesso e a pré-seleção de pessoas para o diagnóstico da infecção pelo HIV não tenham influenciado de forma importante a taxa de soroincidência calculada a partir de amostras de soro destas gestantes.

Neste estudo não foi possível realizar análises sócio-comportamentais dos grupos populacionais cujas amostras de soro foram analisadas. Contudo, dados do Sistema de Informação de HIV Soropositivo Assintomático - SIHIV, do Programa Estadual de DST/Aids do Estado de São Paulo, sugerem que não houve alteração importante na distribuição das práticas e parcerias sexuais informadas nos casos de mulheres de 13 a 49 anos, notificados nos períodos de 1994-1998 e 1999 (CRT-DST/Aids, 2000). Com base nestas evidências, supomos que no período de 1999 a 2002 o padrão do comportamento sexual entre as gestantes das quais foram coletadas as amostras analisadas neste estudo permaneceu inalterado.

Finalmente, a diversidade genética dos vírus circulantes em São Paulo no período em que foram coletadas as amostras de soro deste estudo poderia contribuir para o mau desempenho do ensaio STARHS-OT, tendo em vista dados publicados na literatura que demonstram a necessidade de alterações no protocolo em função de alguns subtipos do HIV-1 (Young *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2004).

Estudos recentemente conduzidos para avaliação das características moleculares do HIV-1 circulante em São Paulo indicam, contudo, que os subtipos prevalentes nesta região são, em ordem decrescente, o B (79 a 95%), o F (7 a 19%) e o C (1 a 4%) (Turchi *et al.*, 2002; Brindeiro *et al.*, 2003; Brígido *et al.*, 2005; Barreto *et al.*, 2006). Não há, na literatura, relato de estudo de validação do protocolo STARHS-OT para amostras de subtipo F. Em estudo onde o protocolo STARHS-OT foi empregado na análise das amostras de doadores de sangue de São Paulo, observou-se que os perfis de resposta de anticorpos das amostras de subtipo F, B/C e B/F eram similares à resposta de anticorpos das amostras de subtipo B (Barreto *et al.*, 2006).

Em outro estudo, conduzido a partir de amostras de sangue coletadas de voluntários atendidos em Centros de Atendimento Especializado em DST e Aids da região Metropolitana de São Paulo, foi observada uma associação significativa entre subtipo F e população feminina recentemente infectada, embora a freqüência deste subtipo tenha sido minoritária, em relação ao subtipo B, na população estudada. De acordo com a discussão realizada pelos autores, este fato pode estar apenas refletindo o atual padrão de disseminação da epidemia em nosso meio, caracterizado pelo aumento da transmissão heterossexual (Brígido *et al.*, 2005), uma vez que não foi observada uma tendência de maior proporção de infecções incidentes entre as amostras de subtipo F, quando comparadas às demais amostras seqüenciadas.

As amostras deste estudo não foram avaliadas quanto às características moleculares do HIV-1. A variabilidade viral presente nestas amostras poderia se constituir em um fator de tendenciosidade para a determinação dos resultados do protocolo STARHS-OT, conforme já foi discutido.

Em uma recente investigação realizada em nosso laboratório (Oliveira *et al.*, 2006), algumas amostras da casuística do presente trabalho (amostras de gestantes, coletadas de 1999 a 2002) foram analisadas por meio da técnica para sorotipagem do HIV-1, baseada na reatividade de anticorpos contra a região V3 da gp120 (Pau *et al.*, 1993; Caterino-de-Araujo *et al.*, 1997; Bongertz *et al.*, 2000; Casseb *et al.*, 2002). Embora a técnica de sorotipagem do HIV-1 seja menos específica do que as técnicas baseadas na genotipagem

(Sherefa *et al.*, 1997), pudemos observar que os sorotipos mais prevalentes foram B (66,7%), C (20,0%) e F (6,7%), que correspondem, de acordo com os dados dos estudos moleculares, aos subtipos mais prevalentes em São Paulo.

Por outro lado, quando avaliamos os resultados das análises de amostras-controle incluídas no estudo, verificamos que o protocolo STARHS-OT nos permitiu identificar corretamente todas (6/6; 100%) as amostras de infecção recente pelo HIV, proveniente de indivíduos com soroconversão documentada, ocorrida em média há 188 dias.

Assim, as avaliações deste estudo foram baseadas no pressuposto de que os resultados do protocolo STARHS-OT não sofreram distorções devidas à variabilidade do HIV-1, tendo em vista que não há evidências de que a diversidade genotípica ou imunológica das cepas circulantes na região de procedência das amostras possam interferir no desempenho deste algoritmo.

5.1. Soroprevalência e soroincidência de HIV

Nos períodos de 1999 a 2002 e de 2000 a 2001, os dados referentes ao total de amostras de soro de gestantes e de usuários de CTA encaminhadas ao IAL e ao Laboratório de Itapeverica da Serra, respectivamente, para diagnóstico de infecção pelo HIV, estavam disponíveis. A partir destas informações, foi possível estabelecer a base populacional, ou seja, o total de amostras, positivas e negativas, correspondentes a cada um destes grupos, analisadas nestas instituições naqueles períodos.

Na casuística estudada, a prevalência de anticorpos anti-HIV entre as amostras de gestantes (0,3%) foi 18 vezes menor do que a prevalência entre amostras de usuários de CTA. Com relação à estimativa de soroincidência, o valor observado a partir de amostras de soro de gestantes (0,2/100 amostras de soro-ano) foi 16,5 vezes menor do que o observado a partir de amostras de usuários de CTA (3,3/100 amostras de soro-ano). Estes dados estão de acordo com outros dados anteriormente descritos na literatura

e confirmam que estas duas populações têm características epidemiológicas distintas, no que se refere ao risco de exposição ao HIV.

Quanto às características sócio-demográficas, não foi possível estabelecer correlações entre tipo de infecção e sexo, uma vez que a seleção de amostras de gestantes causou desigualdades na probabilidade de inclusão de amostras de indivíduos do sexo masculino e feminino. Por outro lado, a frequência de infecções recentes e crônicas nos diferentes grupos etários avaliados sugere distribuição homogênea ($p=0,7449$). Cabe ressaltar aqui a proporção expressiva de casos em que a informação a respeito da idade não estava disponível (83/191; 43,5%), embora a proporção de amostras recentes e crônicas neste grupo tenha sido semelhante à observada entre os casos com idade conhecida.

5.1.2. Amostras de soro de gestantes

A soroprevalência de anticorpos anti-HIV permaneceu estável nos cortes de períodos estudados. Este fato poderia ser explicado por uma ou mais das seguintes possibilidades:

- a)** O risco de infecção pelo HIV na população assistida nos serviços de pré-natal atendidos pelo IAL não foi alterado nos períodos avaliados;
- b)** Os critérios para a procura e a admissão das pacientes nestes serviços foram mantidos nos períodos avaliados;
- c)** Os critérios para a oferta do teste anti-HIV às pacientes foram mantidos nos períodos avaliados;
- d)** Os critérios utilizados pelos serviços de pré-natal para encaminhamento de amostras ao IAL, para diagnóstico de infecção pelo HIV, foram mantidos nos períodos avaliados.

A proporção de amostras HIV+ no período de 1999 a 2002 (0,33%; 0,2 - 0,6%), é semelhante à prevalência estimada por meio de estudos Sentinela que foram realizados no mesmo período em amostra representativa da população de gestantes do Brasil (0,47%; 0,36 - 0,58%) (Szwarcwald e Carvalho, 2001) e corrobora resultados descritos por Olbrich Neto e Meira

(2004), que encontraram 0,3% de soropositividade para o HIV entre gestantes da região de Botucatu-SP, avaliadas entre 1998 e 1999.

Considerando estes dados e o fato de que a identificação do *status* sorológico para o HIV nos serviços de pré-natal em nosso meio está baseada na oferta universal do teste a todas as grávidas, acreditamos que nossa casuística não sofreu interferência importante de fatores condicionantes do acesso ao diagnóstico que pudessem contribuir para tornar tendenciosas as estimativas realizadas neste estudo.

Estimativas da prevalência de infecção pelo HIV obtidas a partir de amostra da população-sentinela de gestantes têm sido extrapoladas para a população de mulheres de 15 a 49 anos no Brasil, pelo Ministério da Saúde (2001). Porém, em estudo realizado por Salles e colaboradores (2003) entre os doadores de sangue do maior banco de sangue de São Paulo durante o mês de Novembro de 2001, foi relatada uma prevalência de infecção pelo HIV de 0,04%. Estas são evidências de que a prevalência de infecção pelo HIV varia de acordo com os grupos estudados e reforça a necessidade de ajustes nas estimativas feitas a partir destas subpopulações, quando se deseja a extrapolação para a população geral.

Com relação à estimativa de incidência, assumimos, com base nas informações já citadas, que o risco de infecção para o HIV entre as gestantes avaliadas permaneceu estável durante o período de coleta das amostras. A taxa de soroincidência encontrada, 0,2/100 amostras de soro-ano (IC 95% = 0,041-0,608), é semelhante ao encontrado por Nesheim *et al* (2005) entre gestantes da cidade de Atlanta-EUA (0,24%; 1991 a 1998) e é inferior à descrita entre usuários de drogas injetáveis de São Paulo (0,71%; Turchi *et al.*, 2002) e do Rio de Janeiro (0,76%; Teixeira *et al.*, 2004).

Estudo recente, realizado entre mulheres de Uganda, indicou que a incidência de infecção pelo HIV é maior entre as mulheres grávidas do que entre as não-grávidas, possivelmente devido à resposta imunológica ou a fatores hormonais que alteram a mucosa genital (Gray *et al*, 2005). Neste caso, é necessário considerar que a gravidez pode ser uma variável de confusão, uma vez que o risco para esta condição e para a transmissão heterossexual do HIV (via mais freqüente na região estudada) é decorrente da mesma categoria de exposição (relação heterossexual não protegida).

Quanto à proporção de amostras incidentes em relação ao número total de amostras HIV+, os dados do nosso estudo sugerem que 17% (18/106) dos casos de infecção identificados em amostras de gestantes analisadas durante o pré-natal no IAL de 1991 a 2002, são referentes à infecção adquirida pouco antes ou mesmo durante os primeiros meses da gravidez (170 dias ou menos). A variação destas proporções segundo o ano de colheita das amostras não foi significativa ($p = 0,3060$).

Tendo em vista que a detecção de infecções recentes neste estudo foi baseada no perfil da reatividade dos anticorpos em um ensaio menos-sensível, é importante discutirmos a capacidade de resposta de anticorpos durante a gestação. A imunossupressão tem sido apontada como o fenômeno responsável pela manutenção da gestação, via indução de tolerância aos alo-antígenos paternos. Evidências clínicas e experimentais têm indicado que a resposta imune materna é direcionada para a produção de anticorpos e inibida para a imunidade mediada por células durante a gravidez (Lin *et al.*, 1993; Wegmann *et al.*, 1993). Estes mecanismos evitam que o feto seja imunologicamente rejeitado.

Moléculas bio-ativas tais como a insulina, os corticosteróides, as prostaglandinas, a testosterona e hormônios da pituitária têm sido identificados como mediadores da imunomodulação, com efeito supressor (Webb, 1976; Salmon, 2004). Os mecanismos envolvidos na supressão imunológica na gravidez podem estar relacionados à síntese de fatores que afetam células B e T, promovendo o aumento da produção de anticorpos assimétricos e o direcionamento do padrão de resposta de citocinas de células T auxiliaadoras do tipo 1 (Th1) para T auxiliaadoras do tipo 2 (Th2), com uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-2) (Lin *et al.*, 1993; Wegmann *et al.*, 1993; Nichols *et al.*, 1994; Margni e Zenclussen, 2001; Druckmann e Druckmann, 2005).

O aumento da produção de anticorpos assimétricos tem sido observado em infecções crônicas por organismos extracelulares, doenças tumorais, processos alérgicos e gravidez (Gutierrez *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2003). Anticorpos assimétricos são moléculas de IgG nas quais há a ligação de um oligossacarídeo rico em manose em um dos paratopos (sítios de ligação com o antígeno localizados na fração Fab (fragmento IgG F(ab')₂). Desta

forma, a molécula de IgG torna-se monovalente (Margni, 1972). Estes anticorpos apresentam incapacidade para fixação de complemento, formação de imunocomplexos insolúveis, mediação da citotoxicidade celular (ADCC), atividade fagocítica e eliminação de antígenos.

Os níveis séricos de imunoglobulinas circulantes durante a gestação têm sido alvos de grande controvérsia desde a década de 70. Alguns autores relataram ter encontrado diminuição dos níveis de classes de imunoglobulinas (Amino *et al.*, 1978), enquanto outros relataram diminuição dos títulos de anticorpos específicos contra sarampo e herpes (Baboonian e Griffiths, 1983). Em ambos os estudos, após correção para os níveis de proteínas totais, concluiu-se que tais fenômenos eram decorrentes da hemodiluição durante a gestação.

No Brasil, Bongertz e colaboradores (1998) observaram uma diminuição na avidéz de anticorpos específicos anti-HIV entre grávidas HIV+ da região do Rio Grande do Sul, quando comparadas às grávidas HIV+ do Rio de Janeiro. Tais diferenças poderiam ser explicadas pela escolha dos peptídeos utilizados no ensaio, tendo em vista a diversidade genética do vírus encontrada naquela região (Bongertz, 2001; Brindeiro *et al.*, 2003).

Em estudo realizado entre gestantes da cidade de São Paulo, Pinto (1991) encontrou níveis séricos de IgG mais altos em mulheres HIV+ do que no grupo controle HIV- (U=62,5; U crítico=86). Não foram observadas diferenças significativas entre os títulos de anticorpos contra os vírus do sarampo (U=127,5; U crítico=86) e da poliomielite (U=113; U crítico=86) em mães HIV+ e mães HIV-.

Com relação ao HIV, estudos têm sugerido que a infecção desencadeia mecanismos envolvendo fatores imunomoduladores que influenciam na polarização da resposta Th1-Th2, direcionando-a preferencialmente para a produção de anticorpos. Este fenômeno constitui uma etapa crítica para a imunopatogênese na infecção pelo HIV (Clerici e Shearer, 1993; DuChateau *et al.*, 1999).

Assim, tanto as gestantes soronegativas quanto as gestantes soropositivas para o HIV estariam predispostas ao fenômeno de imunomodulação responsável pelo direcionamento da resposta imunológica preferencialmente para a produção de anticorpos. Em ambos os casos, os

mecanismos envolvidos estariam relacionados com a mudança no perfil de citocinas responsáveis pelos padrões de resposta de linfócitos Th1/Th2, induzida pela própria gestação ou pela infecção pelo HIV.

Considerando que nos ensaios imunoenzimáticos indiretos a densidade óptica das amostras é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes, o IR pode ser utilizado para comparar amostras entre si, quanto aos níveis detectáveis de imunoglobulinas específicas. Em nosso estudo, observamos que as amostras de gestantes apresentaram IR de anticorpos anti-HIV semelhante aos demais grupos estudados, quando os soros foram analisados por meio de ensaios sensíveis de 1ª geração ($p=0,474$). Com relação aos ensaios sensíveis de 2ª/3ª gerações, verificamos que a reatividade das amostras de gestantes foi significativamente menor (IR=9,35) do que a reatividade das amostras de soroconvertores (IR=12,75) e de usuários de CTA (IR=17,70) ($p<0,05$) (Tabela 2).

Tendo em vista que o protocolo STARHS é baseado no emprego de um ensaio de 1ª geração, assumimos que o desempenho deste método nas amostras de gestantes foi semelhante ao desempenho nas amostras dos demais grupos estudados, não sofrendo influência de uma possível diminuição dos níveis de IgG (total e específica) em decorrência da própria gestação.

5.1.3. Amostras de soro de usuários de CTA

Quanto às amostras coletadas de usuários de CTA, interferências devidas à seleção não devem ser desprezadas, tendo em vista o perfil de atendimento destes serviços. Em um estudo realizado entre mulheres usuárias de um CTA da cidade de São Paulo, Luppi *et al.* (2001) concluíram que a maioria delas estava sendo diagnosticada tardiamente, considerando-se que 70% delas tinham <500 células T CD4+/mm³ no sangue periférico e 20% delas tinham <200 células T CD4+/mm³. Estes dados sugerem que a estimativa de incidência da infecção pelo HIV nesta população pode estar superestimada,

não somente pelo acesso induzido de pessoas com maior vulnerabilidade, mas também pela proporção relevante de indivíduos com imunossupressão severa.

Os CTAs foram implantados com o objetivo de expandir o diagnóstico de HIV/Aids e das demais DST e promover ações de prevenção das mesmas, atendendo às demandas de procura pelo serviço, que podem ser espontâneas ou estimuladas por meio de campanhas. Pessoas da população geral com dúvidas em relação ao seu *status* sorológico para o HIV ou que se expuseram a uma situação de risco para a infecção são encorajadas por meio de campanhas governamentais e ações de Organizações Não-Governamentais (ONG) a procurar os CTA para a realização do teste de diagnóstico (Programa Nacional de DST e Aids/Prevenção, 2005 [on-line]).

Em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, Schechter *et al* (2000) relataram ter encontrado uma prevalência de 4,9% de anticorpos anti-HIV entre usuários de um CTA. Neste estudo, a incidência de infecção pelo HIV, determinada por meio do método STARHS-3A11, foi de 1,9/100 pacientes-ano (0,9 - 3,9%) entre pessoas do sexo feminino e 2,8/100 pacientes-ano (IC 95% = 1,4 - 5,3%) entre pessoas do sexo masculino.

Em um outro estudo, realizado na cidade de Santos - SP, Alves *et al* (2003) observaram 7,1% de prevalência de HIV entre usuários do CTA local, sendo que a taxa foi significativamente maior entre indivíduos do sexo masculino (9,1%) do que entre indivíduos do sexo feminino (5,1%) ($p < 0,05$). A estimativa de incidência de HIV nesta população foi de 2,0/100 amostras de soro-ano (IC 95% = 1,1 - 3,5%), determinada por meio dos métodos STARHS-3A11 e STARHS-OT.

Em nosso estudo, onde foram avaliadas amostras provenientes do Laboratório Local de Itapeverica da Serra - SP, foi observada uma soroprevalência de anticorpos anti-HIV de 5,4% e uma estimativa de incidência de 3,3/100 amostras de soro-ano (IC 95% = 1,43 - 6,35%). Embora nossa casuística tenha sido pequena (42 amostras), os resultados observados indicam que as taxas de soroprevalência e de soroincidência de infecção pelo HIV observadas são semelhantes às taxas descritas por Schechter *et al* (2000) e Alves *et al* (2003), que também estudaram populações de CTA localizados na região Sudeste do Brasil.

Esses dados juntos indicam que a epidemia de HIV/Aids entre usuários de CTA dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo pode ser considerada como "concentrada", onde a prevalência de HIV é >5%, e que está relacionada a grupos populacionais de maior vulnerabilidade (ONUSIDA/OMS, 2000).

O município de Itapeverica da Serra está localizado na parte Sudoeste da Região Metropolitana da Grande São Paulo e fica às margens da Rodovia Regis Bittencourt (BR-116), importante eixo rodoviário que interliga os Estados do Paraná e de São Paulo. Um Programa de prevenção de DST/HIV/AIDS conduzido em 2004 entre caminhoneiros e profissionais do sexo que circulavam nesta rodovia no trecho entre Juquitiba e Taboão da Serra permitiu visualizar, pelo alcance das iniciativas, que há um fluxo intenso de indivíduos vulneráveis ao HIV, provenientes de diferentes localidades. Prevaleceu o fluxo de pessoas das regiões Sul e Sudeste do Brasil, mas também foi observado fluxo vindo de outros países do Merco Sul - Argentina, Chile e Uruguai e de demais estados das regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte do Brasil (Martins, 2004). O monitoramento da epidemia de HIV/Aids nesta localidade pode trazer relevantes contribuições para programas de vigilância epidemiológica e biológica em HIV/Aids, com ênfase para a avaliação da diversidade viral que ocorre nestas regiões.

5.2. Perfil de bandas do teste de Western blot

Sabe-se que o HIV ativa os linfócitos B de forma policlonal, levando à hipergamaglobulinemia (Pahwa, 1984). Clones de linfócitos B específicos contra os antígenos do HIV podem ser encontrados no sangue periférico de indivíduos infectados e podem secretar anticorpos *in vitro*, de forma espontânea ou induzida (Amadori, 1988; Caterino-de-Araujo, 1993).

Estudos realizados em amostras de soro seqüenciais de pacientes infectados pelo HIV demonstraram que a produção de anticorpos específicos é regulada de forma diferenciada, dependendo do grupo de antígeno (McDougal *et al.*, 1987; Broliden *et al.*, 1989; Allain *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1998) e da progressão da doença (McDougal *et al.*, 1987; Allain *et al.*,

1991; Sheppard et al, 1991; Chargelegue *et al*, 1993; Thomas *et al*, 1996; Juompan *et al*, 1998). A maturação da resposta humoral, avaliada por meio dos índices de avidéz, de afinidade e dos títulos de anticorpos anti-HIV, é antígeno-dependente e ocorre gradualmente durante um período de aproximadamente 6 meses após a soroconversão, estabilizando-se após cerca de 1 ano após o aparecimento dos primeiros anticorpos detectáveis (Binley *et al*, 1997; Cole et al, 1998; Fiebig et al, 2003).

Além disso, estudo dos anticorpos anti-HIV secretados *in vitro* demonstrou que a especificidade encontrada em amostras de plasma é diferente da especificidade dos clones reativos de células B circulantes no sangue periférico de crianças e adultos infectados (Caterino-de-Araujo, 1993), independentemente da progressão da doença, sugerindo a existência de mecanismos complexos envolvidos na dinâmica da interação agente-hospedeiro.

No presente trabalho, o teste de WB foi realizado com a finalidade de verificar se há associação entre os perfis de reatividade dos anticorpos específicos dirigidos contra os antígenos do HIV-1 e o tipo de infecção, definido de acordo com o período decorrido pós-soroconversão. Em nossa casuística, observamos, por meio do teste de WB, padrões variados de bandas indicativas da presença de anticorpos específicos contra os antígenos estruturais do HIV-1, diferenciáveis por meio do estabelecimento de escores de reatividade: positivo, indeterminado/fraco e negativo.

O perfil de reatividade das bandas presentes na fita do teste de *Western blot* foi estabelecido visualmente, de forma subjetiva, pela comparação com o padrão observado em bandas específicas presentes na fita de teste de amostras-controle incluídas em cada ensaio. A avaliação da correlação entre estes perfis e os resultados do protocolo STARHS, sugere que há associação entre certos padrões de bandas e a probabilidade de determinação de infecção recente ou crônica na amostra de soro correspondente.

Com estas avaliações, foi possível estabelecer associação entre alguns padrões de bandas no teste de *Western blot* e os resultados do protocolo STARHS. Observamos uma probabilidade 20 vezes maior de determinação de infecção recente entre amostras que produziram reatividade fraca ou ausente contra a gp41. Por outro lado, a chance de determinação de

infecção crônica foi 200 vezes maior entre as amostras que produziram reatividades intensas (perfil “positivo-forte”) contra todas as frações codificadas pelo gene *Env* (gp160, gp120 e gp41) e 10 vezes maior entre aquelas que produziram reatividade intensa contra as todas as frações codificadas pelo gene *Gag* (p55, p24 e p17) (Tabela 12).

Estes resultados estão de acordo com os dados publicados na literatura, nos quais tem sido demonstrado que na dinâmica de maturação da resposta de anticorpos específicos contra os antígenos estruturais do HIV, os títulos de anti-gp41 e anti-p31 demoram mais tempo para atingir os níveis máximos. Além disto, os títulos de anticorpos anti-*Env* permanecem praticamente inalterados durante a progressão da doença, ao passo que os títulos de anticorpos anti-*Gag* e anti-*Pol* variam de acordo com diferentes fatores (níveis de células TCD4+, viremia, estágio da infecção, tratamento antiretroviral, etc.).

O fato de não termos observado associação entre padrão de reatividade positivo-fraco ou ausente contra as frações gp41 e p31, simultaneamente, e infecção recente, poderia ser explicado pela regulação independente da resposta imunológica para cada grupo de antígeno (McDougal *et al.*, 1987; Broliden *et al.*, 1989; Allain *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1998). Além disto, tanto a imunogenicidade dos vírus circulantes em nosso meio quanto a variabilidade da resposta imunológica da nossa população podem ter contribuído para os resultados observados.

Além do modelo probabilístico determinado para esta avaliação, a inspeção visual de algumas fitas de teste de WB de amostras incidentes e crônicas sugeriu que existem padrões que podem inferir sobre o resultado do protocolo STARHS-OT (Figura 13).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. Soroincidência de infecção pelo HIV

- 6.1.1.** A soroincidência da infecção pelo HIV calculada a partir de amostras de soro de gestantes atendidas em serviços públicos de atenção ao pré-natal da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2002 foi de 0,2/100 amostras de soro-ano (IC 95% = 0,041 - 0,608). Não foram observadas tendências de modificação na incidência ao longo do período analisado (1999 a 2002);
- 6.1.2.** A soroincidência da infecção pelo HIV calculada a partir de amostras de soro de usuários de CTA, coletadas na cidade de Itapeverica da Serra entre 2000 e 2001, foi de 3,3/100 amostras de soro-ano (IC 95% = 1,426 - 6,345);
- 6.1.3.** A análise contínua de novas amostragens poderia contribuir para o monitoramento da evolução da epidemia em nosso Estado.

6.2. Padrão de bandas do WB *versus* resultados do STARHS

- 6.2.1.** A baixa reatividade (positivo-fraco/ausente) do soro contra a gp41, avaliada por meio do teste de *Western blot*, está associada à infecção pelo HIV, recentemente adquirida (<170 dias);
- 6.2.2.** A reatividade intensa (positivo-forte) do soro contra as bandas gp160+gp120+gp41 ou p55+p24+p17 está associada à infecção crônica pelo HIV (adquirida há 170 dias ou mais).
- 6.2.3.** Padrões de bandas presentes no teste de *Western blot* sugerem que os mesmos poderiam ser empregados para presumir sobre a temporalidade da infecção pelo HIV (recente/crônica) em novos estudos, onde estes registros, mas não as amostras de soro/plasma, estão disponíveis para análise.
- 6.2.4.** O padrão das bandas no teste de *Western blot* poderia ser utilizado como ferramenta auxiliar para aumentar a especificidade do protocolo STARHS.

6.3. O papel dos laboratórios de Saúde Pública no monitoramento da infecção pelo HIV

6.3.1. Bancos de amostras e registros armazenados em Laboratórios de Saúde Pública são importantes fontes para obtenção de dados para o monitoramento da epidemia, possibilitando a realização de estudos de soroincidência da infecção pelo HIV por meio do emprego da metodologia denominada STARHS. O fortalecimento dessas instituições pode contribuir para a qualidade destes estudos e favorecer o cumprimento do seu papel no âmbito da Saúde Pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaeus A, Lidman K, Sonnerberg A, Albert J. **Subtype-specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA.** AIDS 1997; 11: 859-865.

Allain JP, Laurian Y, Einstein MH, Braun BP, Delaney SR, Stephens JE *et al.* **Monitoring of specific antibodies to Human Immunodeficiency Virus structural proteins: Clinical significance.** Blood 1991; 77(5):1118-1123.

Alves K, Shafer KP, Caseiro M, Rutherford G, Falcao ME, Sucupira MC, Busch MP *et al.* **Risk factors for incident HIV infection among anonymous HIV testing site clients in Santos, Brazil: 1996-1999.** J Acquir Immuno Defic Syndr 2003; 32(5):551-559.

Amato Neto V, Uip DE, Boulos M, Duarte MI, Mendes CM, Taketomi E, *et al.* **Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of the 1st autochthonous case in Brazil and immunological study.** Rev Paul Med 1983; 101(4):165-168.

Amino N, Tanizawa O, Miyai K, Tanaka F, Hayashi C, Kawashima M, Ichihara K. **Changes in serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM, and IgE during pregnancy.** Obstet Gynaecol 1978; 52: 415-420.

Apetrei C, Descamps D, Collin G, Loussert-Ajaka I, Damond F, Duca M, Simon F, Brun-Vezinet F. **Human immunodeficiency virus type 1 subtype F reverse transcriptase sequence and drug susceptibility.** J Virol 1998; 72: 3534-3538.

Apetrei C, Loussert-Ajaka I, Descamps D, Damond F, Saragosti S, Brun-Vezinet F, Simon F. **Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions.** AIDS 1996; 10:F57-F60.

- Baboonian C and Griffiths P. **Is pregnancy immunosuppressive? Humoral immunity against viruses.** Br J Obstet Gynaecol 1983; 90(12): 1168-1175.
- 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):868-871.
- Barreto CC, Nishyia A, Araújo 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):338-341.
- Barreto CC, Nishyia AS, Busch MP, Sabino EC. **HIV subtype and drug resistance among recent and long-standing infected blood donors from São Paulo, Brazil.** Poster nº 842 apresentado na 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection 2004; San Francisco - EUA. Disponível em URL: <http://www.retroconference.org/2004/cd/Abstract/842.htm> [Acesso em 21/10/05].
- Batter V, Matela B, Nsuami M, Manzila T, Kamenga M, Behets F, *et al.* **High HIV-1 incidence in young women masked by stable overall seroprevalence among childbearing women in Kinshasa, Zaire: estimating incidence from serial seroprevalence data.** AIDS. 1994; 8(6):811-817.
- Becquart P, Hocini H, Garin B, Sèpou A, Kazatchkine MD, Bèlec L. **Compartmentalization of the IgG immune response to HIV-1 in breast milk.** AIDS 1999; 13(11): 1323-1331.
- Biniek R, Bartholome M, Schulz M, Lehman HJ, Geseman H, Scheiermann N, *et al.* **Intrathecal production of HIV antibodies in suspected AIDS encephalopathy.** J Neurol 1988; 235(3):131-135.
- Binley JM, Klasse PJ, Cao Y, Jones I, Markowitz M, Ho DD, Moore JP. **Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env**

proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J Virol 1997; 71(4):2799-2809.

Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandes JC, *et al.* **HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites.** J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 23: 184-193.

Bongertz V, Costa CI, Guimarães ML, Soares-da-Costa MFG, Grinsztejn B, The HEC/Fiocruz AIDS Clinical Research Group, *et al.* **HIV specific humoral immune response in Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(3): 391-398.

Bongertz V. **Vertical human immunodeficiency vírus type 1 - HIV-1 - transmission - A review.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1): 1-14.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS 1995; Ano VIII nº 04, Semana Epidemiológica 36 a 48.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria nº 488, de 17/06/1998. **Institui o Fluxograma de Testes Sorológicos para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em todo o território nacional.** DOU 1998; nº 114-E, seção: 3-4.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis - SIDA/AIDS. **SIDA/AIDS - Manual de condutas clínicas.** 1988.

Brasil. **Decreto Nº 79.094, de 05 de Janeiro de 1977.** Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. D.O.U., 06/01/1977.

Brasil. **Lei nº 6.360, de 23 de Setembro de 1976.** Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos

farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. D.O.U. 24/09/1976.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **Comentários**. Boletim Epidemiológico AIDS 2002; Ano XVI nº 1 (Abril a Dezembro).

Brasil. Ministério da Saúde. **Dados e Pesquisas** 2000. [on-line] Disponível em: <http://www.aids.gov.br/final/dados/Resultados%201997%20-%202000.doc> - Acessado em 09/09/2004.

Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria 1.930, de 18 de Outubro de 2001**. Institui a obrigatoriedade da notificação dos casos de gestantes HIV+ e crianças expostas. D.O.U., 19/10/2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional DST e Aids. Boletim Epidemiológico AIDS 2001; Ano XIV nº 1 - 1ª à 13ª semanas epidemiológicas.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **Tabelas**. Boletim Epidemiológico AIDS 2004; Ano XVIII nº 1 (1ª a 24ª semanas epidemiológicas).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis – SIDA/AIDS. **Recomendações para Prevenção e Controle da Infecção pelo Vírus HIV (SIDA-AIDS)**. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 27p. Abril, 1987.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria Nº. 2.043, de 12 de Dezembro de 1994**. Institui uma política para garantir a qualidade de produtos "correlatos", de que tratam a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976 e o Decreto no 79.094, de 05 de janeiro de 1977, em cumprimento aos incisos VI e VII do artigo 6º da Lei Orgânica da Saúde e dá outras providências. D.O.U. 13/12/1994.

Brasil. Presidência da República. **Lei nº. 9313**. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e doentes de AIDS. Brasília, DF, 13 de novembro de 1996. D.O.U.

Brigido LFM, Franco HM, Custódio RM, Oliveira CAF, Ferreira JLP, Eira M, *et al.* **Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in São Paulo, Brazil**. AIDS Res Hum Retroviruses 2005; 21(7): 673-682.

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):1063-1069.

Broliden PA, Morfeldt-Mansson L, Rosen J, Jondal M, Wahren B. **Fine specificity of IgG subclass response to group antigens in HIV-1-infected patients**. Clin Exp Immunol 1989; 76:216-221.

Brookmeyer R & Quinn TC. **Estimation of current Human Immunodeficiency Virus incidence rates from a cross-sectional survey using early diagnostics tests**. Am J Epidemiol 1995; 141(2):166-172.

Brookmeyer R, Quinn T, Shepherd M, Mehendale S, Rodrigues J, Bollinger R. **The AIDS epidemic in India: A new method for estimating current Human Immunodeficiency Virus (HIV) incidence rates**. Am J Epidemiol 1995; 142(7):709-713.

Busch MP & Satten GA. **Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure**. Am J Med 1997; 102(5B):117-124.

Calypte Biomedical Corporation. **Calypte HIV-1 BED Incidence EIA**. Package insert 2005. [Disponível on-line em URL: http://www.calypte.com/PRODUCTS/INSERTS/BED_MSDS-LN-20500-02.pdf].

- Camargo ME, da Silva SM, Leser PG, Granato CH. **Avidity of specific IgG antibodies as markers of recent primary infection caused by *Toxoplasma gondii*.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1991; 33(3):213-218.
- Campos-Filho N and Franco EL. **Epidemiologic programs for computers and calculators. A microcomputer program for multiple logistic regression by unconditional and conditional maximum likelihood methods.** Am J Epidemiol 1989; 129(2):439-444.
- Candal D, Bulterys M, Abrams EJ, Steketee RW, Parekh BS. **Efficacy of a less-sensitive enzyme immunoassay (3A11-LS) for early diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection in infants.** Clin Diag Lab Immunol 2001; 8(6):1282-1285.
- Carbonara S, Angarano G, Quarto M, Germinario C, Chirona M, Fiore JR, *et al.* **A simple method to detect HIV-1 protein specificity of IgG intrathecal synthesis in HIV-1 infection.** New Microbiol 1993; 16(2):121-127.
- Casseb J, Katzenstein D, Winters M, Brigido LFM, Duarte AJS, Hendry MR. **Serotyping HIV-1 with V3 peptides: detection of high avidity antibodies presenting clade-specific reactivity.** Braz J Med Biol Res 2002; 35(3): 369-375.
- Caterino-de-Araujo A, Casseb J, Hendry MR. **Use of V3 loop peptide-specific antibody evaluation for subtyping HIV-1: results of a vertical transmission study from Sao Paulo, Brazil.** J Trop Pediatr 1999; 45(5):265-270.
- Caterino-de-Araujo A. **Produção induzida de anticorpos *in vitro*: Novo método para o diagnóstico de infecção perinatal pelo vírus da imunodeficiência humana.** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1993.
- Centers for Disease Control and Prevention. **Epidemiologic notes and reports possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California.** MMWR 1982a; 31(48):652-654.

Centers for Disease Control and Prevention. **HIV incidence among young men who have sex with men - Seven U.S. Cities, 1994-2000.** MMWR 2001; 50(21):440-444.

Centers for Disease Control and Prevention. National Center for HIV, STD, and TB Prevention. Division of HIV/AIDS Prevention. **Guide to calculating HIV-1 incidence using STARHS results from Organon Teknika Corporation (OTK) Vironostika Less Sensitive HIV-1 EIA.** Documento Interno 2001; Abril.

Centers for Disease Control and Prevention. National Center for HIV, STD, and TB Prevention. Division of HIV/AIDS Prevention. HIV Incidence and Case Surveillance Branch. **HIV Incidence Surveillance: Estimating National and Local HIV Incidence Using a Population-based Serologic Method to Detect Recent HIV-1 Infection.** Internal Document 2005; Março.

Centers for Disease Control and Prevention. **Trends in primary and secondary syphilis and HIV infections in men who have sex with men - San Francisco and Los Angeles, California, 1998-2002.** MMWR 2004; 53(26):575-578.

Centers for Disease Control and Prevention. **Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants - New York, New Jersey, California.** MMWR 1982c; 31(49):665-667.

Centers for Disease Control and Prevention. **Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A.** MMWR 1982b; 31(48):644-646, 652

Centers for Disease Control. **Follow-up on Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis* Pneumonia.** MMWR 1981b; 30:409-410.

Centers for Disease Control. ***Pneumocystis* pneumonia - Los Angeles.** MMWR 1981a; 30:1-3:250-252.

Chargelegue D, O'Toole CM, Colvin BT. **A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 gag protein in HIV-1+ patients with haemophilia: titre and avidity.** Clin Exp Immunol 1993; 93:331-336.

- Chargelegue D, Stanley CM, O'Toole CM, Colvin BT, Steward, MW. **The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression.** Clin Exp Immunol 1995; 99:175-181.
- Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guetard D, Chamaret S, Cohen J, Remy G, Montagnier L, Clavel F. **Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group.** Virology 1994; 205: 247-253.
- Cheingsong-Popov R, Weiss RA, Dalglish A, Tedder RS, Shanson DC, Jeffries DJ, *et al.* **Prevalence of antibody to human T-lymphotropic virus type III in AIDS and AIDS-risk patients in Britain.** Lancet 1984; 2(8401): 477-480.
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey M, Santos-Ferreira MO, *et al.* **Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.** Science 1986; 233:343-346.
- Cleghorn FR, Jack N, Murphy JR, Edwards J, Mahabir B, Paul R, *et al.* **Direct and indirect estimates of HIV-1 incidence in a high-prevalence population.** Am J Epidemiol 1998; 147(9):834-839.
- Clerici M and Shearer GM. **A Th1→Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.** Immunology Today 1993; 14(3): 107-111.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, *et al.* **What to call the AIDS virus?** Nature 1986; 321:10.
- Cole KS, Murphey-Corb M, Narayan O, Joag SV, Shaw GM, Montelaro RC. **Common themes of antibody maturation to Simian Immunodeficiency Virus, Simian-Human Immunodeficiency Virus, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 infections.** J Virol 1998; 72(10):7852-7859.
- Connell JA, Parry JV, Mortimer PP, Duncan RJ, McLean KA, Johnson AM, *et al.* **Preliminary report: accurate assays to anti-HIV in urine.** Lancet 1990; 335(8702):1366-1369.
- Connell JA, Parry JV. **Detection of anti-HIV in saliva and urine at the time of seroconversion.** Clin Diagn Virol 1994; 1(5-6):299-311.

- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, *et al.* **Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment.** *N Engl J Med* 1994; 331(18):1173-11870.
- Constantine NT, Sill AM, Jack N, Kreisel K, Edwards J, Cafarella T, *et al.* **Improved classification of recent HIV-1 infection by employing a two-stage sensitive/less-sensitive test strategy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32(1):94-103.
- Cornelissen M, Jurriaans S, Prins JM, Bakker M, van der Kuyl AC. **Absence of seroreversion in 80 HAART-treated HIV-1 seropositive patients with at least five-years undetectable plasma HIV-1 viral load.** *AIDS Research and Therapy* 2006, 3:3 doi: 10.1186/1742-6405-3-3. Disponível em: <http://www.aidsrestherapy.com/content/pdf/1742-6405-3-3.pdf> (acessado em 23/02/06).
- Couto-Fernandes JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade A, Brites C, *et al.* **HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics.** *J Acquir immune Defic Syndr* 1999; 22:288-293.
- Crofts N, Maskill W, Gust ID. **Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays: a method of data analysis.** *J Virol Methods* 1988; 22(1): 51-59.
- De Leys R, Vanderborcht B, Vanden-Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman, E, Nijs P, Willems B. **Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin.** *J Virol* 1990; 64(3): 1207-1216.
- De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Casiero 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.
- Diaz RS, Kallas EG, Castelo A, Rawal BD, Busch MP. **Use of a new, less-sensitive enzyme immunoassay, testing strategy to identify recently infected persons**

in a Brazilian prison: estimation of incidence and epidemiological tracing. AIDS 1999; 13(11):1417.

Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, McDougal JS, Parekh BS. **Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion.** J Clin Microbiol 2004; 42(6):2623-2628.

Druckmann R and Druckmann MA. **Progesterone and the immunology of pregnancy.** J Steroid Biochem Mol Biol 2005; 97(5): 389-396.

DuChateau BK, Lee GW, Westerman MP, Beaman KD. **Increased expression of regeneration and tolerance factor in individuals with human immunodeficiency virus infection.** Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6(2):193-198.

Dukers NHTM, Spaargaren J, Geskus RB, Beijnen J, Coutinho RA, Fennema HAS. **HIV incidence on increase among homosexual men attending an Amsterdam sexually transmitted disease clinic: using a novel approach for detecting recent infections.** AIDS 2002; 16(10): F19-F24.

Durack DT. **Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men.** N Engl J Med 1981; 305:1465-1467.

Eisen HN & Siskind GW. **Variation in affinities of antibodies during the immune response.** Biochemistry 1964; 3:996-1008.

Elovaara I, Albert PS, Ranki A., Krohn K, Seppälä I. **HIV-1 specificity of cerebrospinal fluid and serum IgG, IgM, and igG1-4 antibodies in relation to clinical disease.** J Neurol Sci 1993; 117(1-2):111-119.

Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, *et al.* **Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection.** AIDS 2003; 17:1871-1879.

- Fletcher M, Miguez-Burbano MJ, Shor-Posner G, Lopez V, Lai H, Baum MK. **Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus infection using an immunoglobulin E-based assay.** Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(1):55-57.
- Freed EO. **HIV-1 replication.** Somat Cell Mol Genet 2001; 26(1-6):13-33.
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, *et al.* **Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.** Science 1984; 24:500-502.
- Galvão-Castro B, Couto-Fernandes JC, Mello MA, Linhares-De-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bongertz V, *et al.* **A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91:335-338.
- Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, Ho DD, Oh M, Salminen M, Robertson D, Shaw GM, Hahn B, Peeters M. **Evidence for two distinct subtypes within the HIV-1 subtype A radiation.** AIDS Res Hum Retrovir 2001; 17: 675-688.
- Gaudy C, Moreau A, Brunet S, Descamps JM, Deleplanque P, Brand D, Barin F. **Subtype B human immunodeficiency virus (HIV) type 1 mutant that escapes detection in a fourth-generation immunoassay for HIV infection.** J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2847-2849.
- Gonçalves Junior FL, de Jesus Pedro R, Branchini MLM, Ramos MC, da Silva LJ, De Angelo Andrade LAL, Amstalden EMI. **Infecção pelo *Pneumocystis carinii* em indivíduo adulto homossexual com imunodeficiência: a propósito de um caso.** infection in a homosexual adult subject with immunodeficiency: apropos of a case. Rev Paul Med 1983; 101(4):160-164.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HD, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, *et al.* ***Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men.** N Engl J Med 1981; 305:1425-1431.

- Gouws E, Williams BG, Sheppard HW, Enge B, Karim SA. **High incidence of HIV-1 in South Africa using a standardized algorithm for recent HIV seroconversion.** *J Acquir Immuno Defic Syndr* 2002; 29(5):531-535.
- Graf M, Shao Y, Zhao Q, Seidl T, Kostler J, Wolf H, Wagner R. **Cloning and characterization of a virtually full-length HIV type 1 genome from a subtype B'-Thai strain representing the most prevalent B-clade isolate in China.** *AIDS Res Hum Retrovir* 1998; 14: 285-288.
- Gray RH, Li X, Kigozi G, Serwadda D, Brahmbhatt H, Wabwire-Mangen F, Nalugoda F, *et al.* **Increased risk of incident HIV during pregnancy in Rakai, Uganda: a prospective study.** *Lancet* 2005; 366(9492):1141-1142.
- Gupta SB, Gill ON, Graham C, Grant AD, Rogers PA, Murphy G. **What a test for recent infection might reveal about HIV incidence in England and Wales.** *AIDS* 2000; 14:2597-2601.
- Gutierrez G, Gentile T, Miranda S, Margni RA. **Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy.** *Chem Immunol Allergy* 2005; 89:158-168.
- Hamers FF, and Downs AM. **The changing face of the HIV epidemic in western Europe: what are the implications for public health policies?** *Lancet* 2004; 364:83-94.
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, *et al.* **DNA determination mediates innate immunity to retroviral infection.** *Cell* 2003; 113: 803–809.
- Hedman K, Lappalainen M, Seppälä I, Mäkelä O. **Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG.** *J Infect Dis* 1989; 159(4):736-740.
- Hehlmann R. **Human retroviruses.** In: Belshe RB, editor. *Textbook of human virology.* 2nd ed. Philadelphia. PA: Mosby Year Book; 1991. p.274-306

Heyward WL, Osmanov S, Saba J, Esparza J, Belsey E, Stoneburner R, *et al.* **Preparation for phase III HIV vaccine efficacy trials: methods for the determination of HIV incidence.** AIDS. 1994; 8(9):1285-1291.

Hu DJ, Vanichseni S, Mock PA, Young NL, Dobbs T, Byers RH, *et al.* **HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: use of the IgG capture BED enzyme immunoassay.** AIDS Res Hum Retroviruses 2003; 19(9): 727-730.

Hughes AL, Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major

ICTVdB (International Committee on Taxonomy of Viruses) - **The Universal Virus Database, version 3.** [Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>].

Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. **Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed.** J Clin Microbiol 1984; 20:525-529.

Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, *et al.* **New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes.** JAMA 1998; 280(1):42-48.

Johnson WD, Hedges LV, Diaz RM. **Interventions to modify sexual risk behaviors for preventing HIV infection in men who have sex with men.** Cochrane Database Syst Rev. 2003; (1):CD001230.

Juompan L, Lambin P, Zouali M. **Selective deficit in antibodies specific for the superantigen binding site of gp120 in HIV infection.** FASEB J 1998; 12:1473-1480.

Kalish ML, Baldwin A, Raktham S, Wasi C, Luo CC, Schochetman G, Mastro TD, Young N, Vanichseni S, Rubsamen-Waigmann H, von Briesen H, Mullins JI, Delwart E, Herrig B, Esparza J, Heyward WL, Osmanov S. **The evolving molecular epidemiology of HIV-1 envelope subtypes in injecting drug users**

- in Bangkok, Thailand: implications for HIV vaccine trials.** AIDS 1995; 9: 851-857.
- Kassutto S, Johnston MN, Rosenberg ES. **Incomplete HIV type 1 evolution and seroreversion in acutely infected individuals treated with early antiretroviral therapy.** Clin Infect Dis 2005; 40(6):868-873.
- Kaul R, Kimani J, Nagelkerke NJ, Fonck K, Keli F, MacDonald KS, *et al.* **Reduced HIV risk-taking and low HIV incidence after enrollment and risk-reduction counseling in a sexually transmitted disease prevention trial in Nairobi, Kenya.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2002; 90(1):69-72.
- Kitchen LW, Barin F, Sullivan JL, McLane MF, Brettler DB, Levine PH, Essex M. **Aetiology of AIDS-antibodies to human T-cell leukaemia virus (type III) in haemophiliacs.** Nature 1984; 312(5992):367-369.
- Kothe D, Byers RH, Caudill SP, Satten GA, Janssen RS, Hannon WH, Mei JV. **Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroincidence.** J Acquir Immune Defic Syndr. 2003; 33(5):625-34.
- Laga M, Alary M, Nzila N, Manoka AT, Tuliza M, Behets F, *et al.* **Condom promotion, sexually transmitted diseases treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex workers.** Lancet. 1994; 344(8917):246-248.
- Laurence J, Brun-Vezinet F, Schutzer SE, Rouzioux C, Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Montagnier L. **Lymphadenopathy-associated viral antibody in AIDS. Immune correlations and definition of a carrier state.** N Engl J Med 1984; 311:1269-1276.
- Le Rouzic E and Benichou S. **The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle.** Retrovirology 2005; 2:11 doi:10.1186/1742-4690-2-11 [Disponível em <http://www.retrovirology.com/content/2/1/11>].

- Lehtonen OP, & Meurman OH. **An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus.** J Virol Methods 1982; 5:1-10.
- 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):840-842.
- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. **Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface.** J Immunol 1993; 151(9): 4562-4573.
- Los Alamos National Laboratory. **HIV sequence Database.** [Disponível em: <http://hiv-web.lanl.gov>].
- Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, Ingrand D, Saragosti S, Courouce AM, Brun-Vezinet F, Simon F. **HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients.** Lancet 1994; 343: 1393-1394.
- Luppi CG, Eluf-Neto J, Sabino E, Buccheri V, Barreto C, Ungaro AB. **Late diagnosis of HIV infection in women seeking counseling and testing services in São Paulo, Brazil.** AIDS Patient Care STDS 2001; 15(7):391-397.
- Machado DM, Delwart EL, Diaz RS, Oliveira CF, Alves K, Rawal BD, *et al.* **Use of the sensitive/less-sensitive (detuned) EIA strategy for targeting genetic analysis of HIV-1 to recently infected blood donors.** AIDS 2002; 16(1):113-119.
- Margni R and Binaghi R. **Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies.** Immunology 1972; 22(4):557-563.
- Margni RA and Zenclussen AC. **During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies.** Am J Reprod Immunol 2001; 46(3): 181-187.
- Marques HHS, Latorre MRDO, DellaNegra M, Pluciennik AMA, Salomão MLM e Grupo de Pesquisadores do Enhancing Care Initiative-ECI-Brazil. **Falhas na**

identificação da infecção pelo HIV durante a gravidez em São Paulo, SP, 1998. Rev Saúde Pública 2002; 36(4):385-392.

Martins MAC. **Projeto Milcaminhoneiros - Resumo.** Movimento Itapeciricano de Luta contra a Aids - MILCA 2004; disponível em: <http://www.saudebrasilnet.com.br/premios/aids/premio1/trabalhos/041.pdf> (acessado em 24/02/06).

Maskill WJ, Crofts N, Waldman E, Healey DS, Howard TS, Silvester C, Gust ID. **An evaluation of competitive and second generation ELISA SCREENING tests for antibody to HIV.** J Virol Methods 1988; 22(1): 61-73.

Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stowe RA, Holzman RS, *et al.* **An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia.** N Engl J Med 1981; 305:1431-1438.

Mathiesen T, Sonneborg A, Trojnar J, Wahren B. **Fine analysis of intrathecally synthesized anti-HIV IgG1-4 by peptide mapping.** J Neurol Sci 1990; 100(1-2):31-36.

McDougal JS, Kennedy MS, Nicholson JKA, Spira TJ, Jaffe HW, Kaplan JE, *et al.* **Antibody response to Human Immunodeficiency Virus in homosexual men. Relation of antibody specificity, titer, and isotype to clinical status, severity of immunodeficiency, and disease progression.** J Clin Invest 1987; 80:316-324

McDougal JS, Pilcher CD, Parekh BS, Gershon-Damet G, Branson BM, Marsh K, Wiktor SZ. **Surveillance for HIV-1 incidence using tests for recent infection in resource-constrained countries.** AIDS 2005; 19 (suppl 2):S25-S30.

McFarland W, Busch MP, Kellogg TA, Rawal BD, Satten GA, Katz MH, *et al.* **Detection of early HIV infection and estimation of incidence using a Sensitive/Less-Sensitive enzyme immunoassay testing strategy at anonymous counseling and testing sites in San Francisco.** J Acquir Immune Defic Syndr 1999; 22(5): 484-489.

- McFarland W, Kellogg TA, Dilley J, Katz MH. **Estimation of human immunodeficiency virus (HIV) seroincidence among repeat anonymous testers in San Francisco.** Am J Epidemiol 1997; 146(8):662-664.
- Mestecky J, Jackson S, Moldoveanu Z, Nesbit LR, Kulhavy R, Prince SJ, *et al.* **Paucity of antigen-specific IgA responses in sera and external secretions of HIV-type 1-infected individuals.** AIDS Res Hum Retroviruses 2004; 20(9):972-988.
- 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.
- Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves IJR, 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: 488-494.
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimarães MDC, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JL, Hendry RM, Mayer A. **V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F.** AIDS 1994; Res Hum Retroviruses 10:569-575.
- Morgan-Capner P, Hodgson J, Hambling MH, Dulake C, Coleman TJ, Boswell PA, *et al.* **Detection of rubella-specific IgM in subclinical reinfection in pregnancy.** Lancet 1985; 1(8423):244-246.
- Murphy G, Charlett A, Jordan LF, Osner N, Gill ON, Parry JV. **HIV incidence appears constant in men who have sex with men despite widespread use of effective antiretroviral therapy.** AIDS 2004; 18:265-272.
- Murphy G, Charlett A, Osner N, Noel Gill O, Parry JV. **Reconciling HIV incidence results from two assays employed in the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion (STARHS).** J Virol Methods 2003; 113(2):79-86.

- Nash D, Bennani Y, Ramaswamy C, Torian L. **Estimates of HIV incidence among persons testing for HIV using the sensitive/less sensitive enzyme immunoassay, New York City, 2001.** J Acquir Immune Defic Syndr 2005; 39(1): 102-111.
- Nesheim S, Parekh B, Sullivan K, Bulterys M, Dobbs T, Lindsay M, *et al.* **Temporal trends in HIV type 1 incidence among inner-city childbearing women in Atlanta: Use of the IgG-Capture BED-Enzyme immunoassay.** AIDS Res Hum Retroviruses 2005; 21(6):537-544.
- Nichols TC, Kang JA, Angkachatchai V, Beer AE, Beaman KD. **Expression of a membrane form of the pregnancy-associated protein TJ6 on lymphocytes.** Cell Immunol 1994; 155: 219-229.
- NYC Health. The New York City Department of Health and Mental Hygiene. **HIV incidence in New York City, 2001.** HIV Surveillance and Epidemiology Program 2001; 1(S1).
- Oliveira CAF, Castejón MJ, Yamashiro R, Matsunaga R, Rodrigues R, Ueda M, Brígido LFM. **Serotyping approach as a feasible tool for assessing HIV-1 diversity in São Paulo, Brazil.** Aids Vaccine 2006 international Conference, submitted.
- ONUSIDA/OMS. **Guías sobre la vigilancia del VIH de segunda generación.** WHO/CDS/CSR/EDC 2000.
- Pahwa SG, Quilop MTJ, Lange M, Pahwa RN, Grieco MH. **Defective B-lymphocyte function in homosexual men in relation to the acquired immunodeficiency syndrome.** Ann Intern Med 1984; 101:757-763.
- Pandey MK, Saxena V, Agrawal S. **Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy.** BMC pregnancy and Childbirth 2003; 3:2. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/3/2>.

- Parekh B, Philips S, Granade TC, Baggs J, Hu DJ, Respass R. **Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantification.** Hum Retroviruses 1999; 15(2): 133-142.
- Parekh BS, Hu DJ, Vanichseni S, Satten GA, Candal D, Young NL, *et al.* **Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the 3A11-LS assay for detecting recent HIV seroconversion among individuals with HIV-1 subtype B or E infection in Thailand.** AIDS Res Hum Retroviruses 2001a; 17(5):453-458.
- Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau CP, Byers R, Green T, Hu DJ, *et al.* **Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: A simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence.** AIDS Res Hum Retroviruses 2002; 18(4):295-307.
- Parekh BS, McDougal JS. **New approaches for detecting recent HIV-1 infection.** AIDS Rev 2001; 3:183-193.
- Parekh BS, Pau CP, Kennedy MS, Dobbs TL, McDougal JS. **Assessment of antibody assays for identifying and distinguishing recent from long-term HIV type 1 infection.** AIDS Res Hum Retroviruses 2001b; 17(2):137-146.
- Parekh, BS. **Apresentação sobre o ensaio de captura de IgG BED-CEIA para detecção de infecções recentes de HIV-1.** In: Treinamento na execução do ensaio BED-CEIA. Programa Nacional de DST/Aids-SVS-MS. Florianópolis - SC, 2006; 21 a 24 de fevereiro.
- Parry JV, Perry KR, Mortimer PP. **Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum.** Lancet 1987; 2(8550):72-75.
- Pau CP, Lee-Thomas S, Auwanit W, George JR, Ou CY, Parekh BS, *et al.* **Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand.** AIDS 1993; 7:337-340.
- Petri V, Michalany N, Varella D, Arico VM, Masetti JH, Vielici M, Leser PG. **Kaposi's sarcoma in young male homosexuals. Report of 2 cases.** AMB Rev Assoc Med Bras 1984; 30 (7-8):161-164.

Pinto MIM. **Imunidade transplacentária em recém-nascidos de mães infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.** [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1991.

Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaro R, Suleiman J, Ferreira O, and the Brazilian Collaborative AIDS Research Group. **Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil.** AIDS 1993; 7: 1191-1197.

Programa Nacional de DST e Aids. Prevenção. CTA - **Centros de testagem e aconselhamento.** Disponível *on-line* em URL: <http://www.aids.gov.br/final/prevencao/servicos.htm> (acessado em 21/10/2005).

Quinn TC, Brookmeyer R, Kline R, Shepherd M, Paranjape R, Mehendale S *et al.* **Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA to diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence.** AIDS 2000; 14:2751-2757.

Raux M, Finkielsztejn L, Salmon-Céron D, Bouchez H, Excler JL, Dulioust E, *et al.* **IgG subclass distribution in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects.** AIDS Res Hum Retroviruses 2000; 16(6):583-594.

Rawal BD, Degula A, Lebedeva L, Janssen RS, Hecht FM, Sheppard HW, Busch MP. **Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection.** J Acquir Immune Defic Syndr 2003; 33(3):349-355.

Robertson DL, Anderson JA, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hanhn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. **HIV-1 nomenclature proposal.** Science 2000; 288: 55-56.

Rodkey LS & Freeman MJ. **Variations in the properties of rabbit antibodies during prolonged immunization by various routes with serum albumin in Freund's complete adjuvant.** Immunology 1970; 19:219-224.

- Rossini MAA, Diaz R, Caseiro M, Turcato G, Acceturi CA, Sabino EC. **HIV-1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in São Paulo State, Brazil.** Braz J Med Biol Res 2001; 34(1): 45-47.
- Rousseau S & Hedman K. **Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG.** Lancet 1988; 1(8594):1108-1109.
- Rücker E, Grivel JC, Münch J, Kirchhoff F, Margolis L. **Vpr and Vpu are important for efficient Human Immunodeficiency Virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo.** J Virol 2004; 78(22):12689-12693.
- Rutherford GW, Schwarcz SK, McFarland W. **Surveillance for incident HIV infection: New technology and new opportunities.** JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 25:S115-S119.
- Sa Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM. **Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in Sao Paulo, Brazil.** AIDS Res Hum Retroviruses 2005; 21(2):145-151.
- 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: 6340-6346.
- Sahlu T, de Wit TR, Tsegaye A, Mekonnen Y, Beyene A, Hailu B, *et al.* **Low incidence of syphilis among factory workers in Ethiopia: effect of an intervention based on education and counseling.** Sex Transm Infect 2002; 78(2):123-126.
- Saidel T, Sokal D, Rice J, Buzingo T, Hassig S. **Validation of a method to estimate age-specific Human Immunodeficiency Virus (HIV) incidence rates in developing countries using population-based seroprevalence data.** Am J Epidemiol 1996; 144(3):214-223.

- Salles NA, Sabino EC, Barreto CC, Barreto AME, Otani MM, Chamone DF. **Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.** Rev Panam Saud Publica 2003; 13(2-3):111-116.
- Salmon JE. **A noninflammatory pathway for pregnancy loss: innate immune activation?** J Clin Invest 2004; 114(1): 15-17.
- San Francisco Department of Public Health. **HIV/AIDS Statistics and Epidemiology Section.** HIV/AIDS Epidemiology Annual Report 2003. [On-line] Disponível em: <http://www.sfdph.org/php/aidssurvunit.htm>. Acessado em 25/08/2005.
- Sandstrom EG, Schooley RT, Ho DD, Byington R, Sarngadharan MG, MacLane ME, *et al.* **Detection of human anti-HTLV-III antibodies by indirect immunofluorescence using fixed cells.** Transfusion 1985; 25(4):308-312.
- São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Programa Estadual DST/Aids. Boletim Epidemiológico 2000; CRT - DST/AIDS - CVE - Ano II; Número 1.
- Saphonn V, Parekh BS, Dobbs T, Mean CV, Bun LH, Ly SP, *et al.* **Trends of HIV-1 seroincidence among HIV-1 sentinel surveillance groups in Cambodia, 1999-2002.** J Acquir Immune Defic Syndr 2005; 39(5): 587-592.
- Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. **Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS.** Science 1984; 224(4648)506-508.
- Sawyer SL, Emerman M, Malik HS. **Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G.** PLoS Biol 2004; 2(9): e275.
- Schechter M, Lago RF, Melo MF, Sheppard HW, Guimarães NC, Moreira RI, *et al.* **Identification of a high-risk heterosexual population for HIV prevention trials in Rio de Janeiro, Brazil.** JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 24: 175-177.
- Schwarcz S, Kellog T, McFarland W, Louie B, Kohn R, Busch M Katz M, *et al.* **Differences in the temporal trends of HIV seroincidence and seroprevalence**

- among sexually transmitted disease clinic patients, 1989-1998: application of the Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion.** Am J Epidemiol 2001; 153(10): 925-934.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. **Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.** Nature 2002; 418: 646-650.
- Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. **The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease.** J Acquir Immune Defic Syndr 1991; 4(7): 704-712.
- Sherefa K, Sällberg M, Johansson B, Salminen M, Sönnernborg A. **Antibodies specific for the third variable domain (V3) of gp120: Results may be affected by divergent V3 sequences.** J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2419-2421.
- Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vezinet F. **Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and O.** Nat Med 1998; 4: 1032-1037.
- 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 2003a; 34(5): 520-526.
- Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido LF, *et al.* **A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil.** AIDS 2003b; 17:11-21.
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. **A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for Pneumocystis from humans.** Emerg Infect Dis 2002; 8(9): 891-896.
- Suligoi B, Galli C, Massi M, Di Sora F, Sciandra M, Pezzitti, *et al.* **Precision and accuracy of a procedure for detecting recent Human Immunodeficiency Virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method.** J Clin Microbiol 2002; 40(11):4015-4020.

- Suligoï B, Massi M, Galli C, Sciandra M, Di Sora F, Pezzotti P, *et al.* **Identifying recent HIV infections using the avidity index and an automated enzyme immunoassay.** J Acquir Immune Defic Syndr 2003; 32(4):424-428.
- Szwarcwald CL, Carvalho MF. **Estimativa do número de indivíduos de 15 a 49 anos infectados pelo HIV, Brasil, 2000.** In: Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional DST e Aids. Boletim Epidemiológico AIDS 2001; Ano XIV nº 1 - 1ª à 13ª semanas epidemiológicas: 35-40.
- Taylor MM, Hawkins K, Gonzalez A, Buchacz K, Aynalem G, Smith LV, *et al.* **Use of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion (STARHS) to identify recently acquired HIV infections in men with early syphilis in Los Angeles County.** J Acquir Immune Defic Syndr 2005; 38(5):505-508.
- Teixeira SLM, Bastos FI, Telles PR, Hacker MA, Brigido LF, Oliveira CAF, Bongertz V, Morgado MG. **HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity.** J Clin Virol 2004; 31:221-226.
- Thomas HI & Morgan-Capner P. **Specific IgG subclass antibody in rubella virus infections.** Epidemiol Inf 1988; 100:443-454.
- Thomas HIJ & Morgan-Capner P. **Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection.** Epidemiol Inf 1988; 101:591-598.
- Thomas HIJ, Wilson S, O'Toole CM, Lister CM, Saeed AM, Watkins RPF, Morgan-Capner P. **Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1.** Clin Exp Immunol 1996; 103:185-191.
- Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, Apetrei C, Ekwilanga M, Delaporte E, Peeters M. **High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa.** Virology 1999; 259: 99-109.
- Turchi MD, Diaz RS, Martinelli CMT, Sabino EC, Silva WP, Ferreira-Filho O, *et al.* **Genetic Diversity and HIV-1 incidence estimation among cocaine users in São Paulo, Brazil.** JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2002; 30 (5): 527-532.

- Ueno T, Sakai H. **The function of accessory genes of HIV-1**. Nippon Rinsho 2002; 60(4):674-680.
- UNAIDS/WHO. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)/World Health Organization (WHO). **Global Summary of the HIV/AIDS epidemic 2005**. UNAIDS/04.45E 2004; ISBN 92-9173-390-3.
- Walker N, Garcia-Calleja JM, Heaton L, Asamoah-Odei E, Pomeroy G, Lazzari S, *et al*. **Epidemiological analysis of the quality of HIV sero-surveillance in the world: how well do we track the epidemic?** AIDS. 2001; 15(12):1545-1554.
- Wawer MJ, Serwadda D, Gray RH, Sewankambo NK, Li C, Nalugoda F, Lutalo T, Konde-Lule JK. **Trends in HIV-1 prevalence may not reflect trends in incidence in mature epidemics: data from the Rakai population-based cohort, Uganda**. AIDS 1997; 11(8):1023-1030.
- Webb DR Jr. **Immuno suppression & Immuno potentiation**. In: Basic & clinical immunology. Fundenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Wells JV (Editores). Lange Medical Publications. Los Altos, California, 1976.
- Weber JN, Weiss RA, Roberts C, Weller I, Tedder RS, Clapham PR, *et al*. **Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralizing sera and association of anti-gag antibody with prognosis**. Lancet 1987; 1(8525):119-122.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. **Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?** Immunol Today 1993; 14(7): 353-356.
- Weinstock H, Dale M, Gwin M, Satten GA, Kothe D, Mei J, *et al*. **HIV seroincidence among patients at clinics for sexually transmitted diseases in nine cities in the United States**. JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2002; 29(5): 478-483.
- WHO. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)/World Health Organization (WHO). **Operational characteristics of commercially available**

assays to determine antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. WHO/BTS/99.1; UNAIDS/99.5 1999; Report 11, Geneva, Switzerland.

Williams B, Gouws E, Wilkinson D, Karim SA. **Estimating HIV incidence rates from age prevalence data for epidemic situations.** Stat Med. 2001; 20(13):2003-2016.

Wilson KM, Johnson EIM, Croom HA, Richards KM, Doughty L, Cunningham PH, *et al.* **Incidence immunoassay for distinguishing recent from established HIV-1 infection in therapy-naive populations.** AIDS 2004; 18(17):2253-2259.

World Health Organization. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)/World Health Organization (WHO). **Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance: selection, evaluation, and implementation.** UNAIDS/01.22E 2001; ISBN 9173-92-063-7.

Young CL, Hu DJ, Byers R, Vanichseni S, Young NL, Nelson R, *et al.* **Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the bioMérieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in Thailand.** AIDS Res Hum Retroviruses 2003; 19(6):481-486.

APÊNDICES

Apêndice 1: Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais.

(continua)

N.º WB ⁽¹⁾	Amostra	População	N.º Amostra	Sexo	Idade	IR 1ª Geração ⁽⁵⁾	IR 2ª Geração ⁽⁶⁾	IFI ⁽⁷⁾	DOPi ⁽⁸⁾	DOPc ⁽⁹⁾	STARHS ⁽¹⁰⁾	WB	gp160	gp120	p66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17
1	GIAL ⁽²⁾	Gestante	10706	Fem ⁽³⁾	*	NR ⁽¹¹⁾	6,9	+ ⁽¹²⁾	0,996	1,392	Crônica	Positivo	+	+	+	+/ ⁽¹³⁾	+	+	+	+	+
2	GIAL	Gestante	9836	Fem	26	NR	8,7	+	0,425	0,760	Recente	Positivo	+	+	+/-	-	+/-	+	+/-	+	+
3	GIAL	Gestante	9150	Fem	21	NR	8,4	+	0,274	0,437	Recente	Positivo	+	+	+/-	- ⁽¹⁴⁾	+/-	+/-	+/-	+	+
4	GIAL	Gestante	7866	Fem	21	6,4	8,8	+	3,764	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	GIAL	Gestante	13220	Fem	27	7,1	NR	+	4,663	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	GIAL	Gestante	11984	Fem	18	NR	7,3	+	0,053	0,087	Recente	Positivo	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+
7	GIAL	Gestante	11374	Fem	25	*	9,1	+	4,284	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
8	GIAL	Gestante	11363	Fem	25	NR	9,1	+	1,036	2,116	Crônica	Positivo	+	+/-	+/-	+	-	+	+/-	+	+
9	GIAL	Gestante	11009	Fem	30	*	7,3	+	4,099	NR	Crônica	Positivo	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+
10	GIAL	Gestante	24328	Fem	29	*	6,0	+	1,677	2,535	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
11	GIAL	Gestante	23510	Fem	*	8,6	9,0	+	3,066	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	GIAL	Gestante	23208	Fem	28	10,3	NR	+	1,875	2,584	Crônica	Positivo	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-
13	GIAL	Gestante	21541	Fem	34	9,8	8,5	+	0,381	0,860	Recente	Positivo	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+
14	GIAL	Gestante	14252	Fem	31	7,6	15,1	+	1,049	2,113	Crônica	Positivo	+	+/-	+	-	+	+	+	+/-	+/-
15	GIAL	Gestante	27467	Fem	20	NR	9,2	+	1,257	1,591	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	GIAL	Gestante	27421	Fem	*	NR	11,0	+	3,824	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-
17	GIAL	Gestante	27403	Fem	21	NR	12,2	+	1,446	1,394	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+/-
18	GIAL	Gestante	26635	Fem	21	*	8,9	+	4,667	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	GIAL	Gestante	25185	Fem	*	7,1	NR	+	6,130	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	GIAL	Gestante	28403	Fem	22	*	9,8	+	4,328	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	GIAL	Gestante	28274	Fem	20	NR	8,7	+	0,878	0,742	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
22	GIAL	Gestante	28182	Fem	24	*	10,7	+	7,811	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	GIAL	Gestante	28037	Fem	26	*	8,9	+	3,331	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
24	GIAL	Gestante	28004	Fem	22	*	9,1	+	6,469	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
25	GIAL	Gestante	29940	Fem	*	NR	9,9	+	2,536	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	GIAL	Gestante	29844	Fem	27	NR	5,2	+	0,066	-0,027	Recente	Positivo	+	+/-	+	-	+/-	-	+/-	+	+
27	GIAL	Gestante	29603	Fem	*	NR	10,7	+	5,264	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+
28	GIAL	Gestante	28499	Fem	16	NR	9,0	+	1,100	1,252	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+
29	GIAL	Gestante	28493	Fem	20	NR	9,0	+	0,590	0,531	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+
30	GIAL	Gestante	31481	Fem	29	4,2	2,4	+	2,663	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	GIAL	Gestante	31125	Fem	27	*	8,3	+	5,583	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Apêndice 1: Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais. (continua)																					
N.º WB	Amostra	População	N.º Amostra	Sexo	Idade	IR 1ª Geração	IR 2ª Geração	IFI	DOPI	DOPc	STARHS	WB	gp160	gp120	p66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17
32	GIAL	Gestante	30986	Fem	21	NR	9,3	+	4,428	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	GIAL	Gestante	30581	Fem	24	NR	8,3	+	6,559	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	GIAL	Gestante	30426	Fem	29	NR	9,2	+	0,126	-0,044	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
35	GIAL	Gestante	34681	Fem	29	4,1	8,5	+	2,579	NR	Crônica	Positivo	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-
36	GIAL	Gestante	34078	Fem	30	2,2	9,4	+	2,375	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
37	GIAL	Gestante	33367	Fem	26	4,6	8,0	+	6,452	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
38	GIAL	Gestante	31526	Fem	38	5,1	3,3	+	3,998	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+
39	GIAL	Gestante	31514	Fem	18	5,1	2,7	+	2,727	NR	Crônica	Positivo	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-
40	GIAL	Gestante	37069	Fem	30	7,5	8,2	+	5,147	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+
41	GIAL	Gestante	35464	Fem	24	*	8,4	+	5,459	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
42	GIAL	Gestante	35158	Fem	19	9,7	NR	+	6,939	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	GIAL	Gestante	35039	Fem	22	NR	8,8	+	0,428	0,323	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	-
44	GIAL	Gestante	35035	Fem	20	NR	11,2	+	6,747	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	GIAL	Gestante	36453	Fem	35	9,1	8,5	NR	6,210	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
46	GIAL	Gestante	36288	Fem	26	*	7,6	NR	6,355	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47	GIAL	Gestante	35765	Fem	21	*	7,2	NR	4,116	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	GIAL	Gestante	35599	Fem	36	*	10,8	NR	4,445	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	GIAL	Gestante	37149	Fem	*	7,6	8,3	+	2,811	NR	Crônica	Positivo	+	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+	+/-
50	GIAL	Gestante	37692	Fem	33	6,2	7,1	+	4,100	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-
51	GIAL	Gestante	37477	Fem	18	6,2	8,0	+	6,747	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+/-	+	+/-	+	+/-
52	GIAL	Gestante	37467	Fem	22	8,8	8,0	+	2,110	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
53	GIAL	Gestante	37263	Fem	33	8,6	9,1	+	0,247	0,193	Recente	Positivo	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+	-
54	GIAL	Gestante	37163	Fem	30	9,4	8,3	+	1,143	1,546	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
55	GIAL	Gestante	39350	Fem	27	6,7	17,1	+	4,324	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	GIAL	Gestante	38751	Fem	*	NR	9,7	+	5,381	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	GIAL	Gestante	38530	Fem	18	18,0	4,3	+	6,435	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+/-	+	+/-	+	-
58	GIAL	Gestante	37906	Fem	*	7,8	8,6	+	0,667	0,774	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59	GIAL	Gestante	37900	Fem	*	2,5	8,6	+	0,647	0,937	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	GIAL	Gestante	34142	Fem	39	2,5	9,7	NR	7,036	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
61	GIAL	Gestante	40965	Fem	25	6,1	8,6	+	6,848	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
62	GIAL	Gestante	40333	Fem	30	7,2	8,2	+	3,126	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63	GIAL	Gestante	40108	Fem	20	7,3	13,3	+	5,908	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64	GIAL	Gestante	39538	Fem	29	6,4	13,0	+	5,845	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-
65	GIAL	Gestante	42277	Fem	37	8,2	9,6	+	5,579	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+/-

Apêndice 1: Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais. (continua)																					
N.º WB	Amostra	População	N.º Amostra	Sexo	Idade	IR 1ª Geração	IR 2ª Geração	IFI	DOPI	DOPc	STARHS	WB	gp160	gp120	p66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17
66	GIAL	Gestante	41892	Fem	*	6,1	12,4	+	0,918	1,158	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	GIAL	Gestante	41771	Fem	19	8,4	14,4	+	5,284	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
68	GIAL	Gestante	41770	Fem	32	9,3	12,9	+	6,633	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
69	GIAL	Gestante	41414	Fem	23	6,0	13,3	+	6,881	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	GIAL	Gestante	44732	Fem	19	10,9	14,8	+	2,636	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
71	GIAL	Gestante	44516	Fem	30	8,5	16,9	+	3,559	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+
72	GIAL	Gestante	44327	Fem	22	11,9	17,7	+	7,200	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
73	GIAL	Gestante	44296	Fem	21	3,2	18,2	+	2,284	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	-
74	GIAL	Gestante	42869	Fem	28	7,3	19,1	+	5,764	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
75	GIAL	Gestante	46512	Fem	*	6,7	16,0	+	6,801	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	GIAL	Gestante	46445	Fem	24	*	*	+	0,918	0,549	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
77	GIAL	Gestante	46369	Fem	19	12,6	14,7	+	4,351	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
78	GIAL	Gestante	45385	Fem	*	12,1	6,8	+	7,385	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	-	+/-
79	GIAL	Gestante	44820	Fem	21	12,1	18,5	+	6,324	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
80	GIAL	Gestante	48410	Fem	32	7,8	6,9	NR	7,076	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-
81	GIAL	Gestante	48008	Fem	*	7,0	16,0	+	4,046	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
82	GIAL	Gestante	47627	Fem	24	4,2	15,6	+/-	1,794	1,442	Crônica	Positivo	+	+	-	-	-	+	+/-	+/-	+
83	GIAL	Gestante	47120	Fem	22	8,3	16,8	NR	4,858	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
84	GIAL	Gestante	46642	Fem	27	12,4	17,0	+	5,610	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85	GIAL	Gestante	54617	Fem	39	8,2	11,7	+	2,992	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	GIAL	Gestante	51579	Fem	27	15,1	23,8	+	5,300	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
87	GIAL	Gestante	51171	Fem	30	15,1	18,2	+	4,935	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	GIAL	Gestante	51103	Fem	32	14,5	25,3	+	0,392	0,386	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89	GIAL	Gestante	50818	Fem	25	9,4	18,3	+	5,019	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
90	GIAL	Gestante	59913	Fem	*	15,5	17,9	+	0,536	0,597	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
91	GIAL	Gestante	59897	Fem	39	15,5	14,2	+	6,516	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
92	GIAL	Gestante	58770	Fem	28	3,0	16,3	+	0,056	0,110	Recente	Positivo	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+
93	GIAL	Gestante	57600	Fem	21	11,9	12,8	+	5,224	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	GIAL	Gestante	57196	Fem	34	12,0	14,9	+	5,774	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
95	GIAL	Gestante	61640	Fem	30	9,0	7,6	+	3,962	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96	GIAL	Gestante	61518	Fem	29	9,9	14,4	+	6,955	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	GIAL	Gestante	61233	Fem	24	13,0	16,4	+	3,650	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
98	GIAL	Gestante	60418	Fem	*	11,5	17,2	+	5,858	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99	GIAL	Gestante	60285	Fem	*	10,2	15,9	+	2,096	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
100	GIAL	Gestante	64498	Fem	*	9,2	14,8	+	0,046	0,071	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+

Apêndice 1: Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais. (continua)																					
N.º WB	Amostra	População	N.º Amostra	Sexo	Idade	IR 1ª Geração	IR 2ª Geração	IFI	DOPI	DOPc	STARHS	WB	gp160	gp120	p66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17
101	GIAL	Gestante	63879	Fem	24	6,7	15,1	NR	1,398	1,003	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	GIAL	Gestante	63341	Fem	19	12,3	16,3	+	5,328	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
103	GIAL	Gestante	62964	Fem	35	12,1	16,5	+	5,422	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104	GIAL	Gestante	62647	Fem	28	17,1	17,1	+	7,173	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
105	GIAL	Gestante	64612	Fem	*	11,4	16,3	+	2,962	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
106	GIAL	Gestante	64503	Fem	*	18,8	10,1	+	0,546	0,534	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107	LIS ⁽¹⁵⁾	CTA ⁽¹⁶⁾	1709	*	*	*	*	+/-	-	-0,097	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+/-	-	+	+
108	LIS	CTA	13063-	*	21	14,4	17,7	+	2,823	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
109	LIS	CTA	13074-	*	22	16,3	17,7	+	1,996	1,389	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
110	LIS	CTA	36003122	*	24	12,9	17,7	+	3,700	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111	LIS	CTA	3145	*	*	10,3	9,0	+	0,028	0,015	Recente	Positivo	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	-
112	LIS	CTA	13079-	*	44	13,6	17,7	+	2,794	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
113	LIS	CTA	13080-	*	34	12,8	17,7	+	3,592	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
114	LIS	CTA	36003207	*	41	6,8	8,1	+	3,177	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
115	LIS	CTA	36003348	Fem	22	6,6	14,2	+	1,921	1,707	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116	LIS	CTA	36003383	Fem	25	5,3	17,9	+	3,187	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
117	LIS	CTA	13193-	*	*	12,7	8,5	+	0,032	0,019	Recente	Positivo	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-
118	LIS	CTA	36003446	Fem	33	5,3	18,7	+	3,081	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
119	LIS	CTA	65002117	*	*	*	*	+	1,320	1,452	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	LIS	CTA	S1001607	*	*	*	*	+	6,852	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
121	LIS	CTA	36001458	*	*	*	*	+	0,907	0,594	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
122	LIS	CTA	36001539	*	*	*	*	+	2,930	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
123	LIS	CTA	36002451	*	*	*	*	+	7,895	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
124	LIS	CTA	36002459	*	*	*	*	+	6,600	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
125	LIS	CTA	36002463	*	*	*	*	+	1,064	0,594	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
126	LIS	CTA	36002543	*	*	*	*	+	7,080	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
127	LIS	CTA	36002608	*	*	*	*	+	3,899	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
128	LIS	CTA	36001905	*	*	*	*	+	4,556	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
129	LIS	CTA	1908	*	*	*	*	+	0,458	0,682	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+/-
130	LIS	CTA	2091	*	*	*	*	+	2,017	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
132	LIS	CTA	36002297	*	*	*	*	+	3,434	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
133	LIS	CTA	36002272	*	*	*	*	+	3,301	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+
134	LIS	CTA	36002341	*	*	*	*	+	3,285	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+
135	LIS	CTA	36002299	*	*	*	*	+	3,675	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
136	LIS	CTA	36002242	*	*	4,5	17,0	+	2,619	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
137	LIS	CTA	36002269	*	*	*	*	+	0,836	1,874	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+/-
138	LIS	CTA	36002392	*	*	*	*	+	4,871	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
139	LIS	CTA	36002660	*	*	*	*	+	2,166	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	-	+/-	+	+/-

Apêndice 1: Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais. (continua)																					
N.º WB	Amostra	População	N.º Amostra	Sexo	Idade	IR 1ª Geração	IR 2ª Geração	IFI	DOPI	DOPc	STARHS	WB	gp160	gp120	p66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17
140	LIS	CTA	36001886	Masc	46	6,5	18,2	+	6,410	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+
141	LIS	CTA	36001888	Fem	49	5,1	18,2	+	6,245	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
142	LIS	CTA	36002045	*	*	4,4	17,7	+	0,502	0,403	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+/-	+/-	+	+
143	LIS	CTA	36002117	*	*	7,2	20,2	+	1,959	1,753	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
144	LIS	CTA	36002238	*	*	6,4	17,1	+	0,032	0,048	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+/-	-	+	+
145	LIS	CTA	36002530	Masc	26	4,8	17,0	+	3,939	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
146	LIS	CTA	36002492	*	*	1,3	0,9	+	0,008	0,008	Recente	Positivo	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-
147	LIS	CTA	13062-	*	22	12,6	17,7	+	0,936	0,833	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
148	LIS	CTA	13064-	*	32	15,3	17,7	+	0,802	0,713	Recente	Positivo	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
149	LIS	CTA	36003230	*	24	5,9	17,9	+	0,270	0,255	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
150	RIAL ⁽¹⁷⁾	IR ⁽¹⁸⁾	178/93	*	*	*	*	NR	5,347	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
151	RIAL	IR	299/95	*	*	*	*	NR	3,540	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
152	RIAL	IR	543/96	*	*	*	*	NR	-	0,003	Recente	Positivo	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-
153	RIAL	IR	548/96	*	*	*	*	NR	2,777	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	-
154	RIAL	IR	746/97	*	*	*	*	NR	0,082	0,084	Recente	Positivo	+	+	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
155	RIAL	IR	771/97	*	*	*	*	NR	0,037	0,040	Recente	Positivo	+	+	-	-	-	-	+/-	+	+
156	RIAL	IR	828/97	*	*	*	*	NR	1,850	1,975	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
157	RIAL	IR	830/97	*	*	*	*	NR	4,505	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
158	RIAL	IR	24/99	*	*	*	*	NR	2,164	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
159	RIAL	IR	28/99	*	*	*	*	NR	1,850	2,394	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-
160	RIAL	IR	42/99	*	*	*	*	NR	0,710	0,738	Recente	Positivo	+	+	+	-	+	+/-	+/-	+	+/-
161	RIAL	IR	72/99	*	*	*	*	NR	4,723	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
162	RIAL	IR	73/99	*	*	*	*	NR	5,556	NR	Crônica	Positivo	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
163	RIAL	IR	74/99	*	*	*	*	NR	4,627	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
164	RIAL	IR	78/99	*	*	*	*	NR	1,912	1,127	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
165	RIAL	IR	81/99	*	*	*	*	NR	0,209	0,259	Recente	Positivo	+	+	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
166	RIAL	IR	90/99	*	*	*	*	NR	4,850	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+
167	RIAL	IR	92/99	*	*	*	*	NR	0,957	0,922	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
168	RIAL	IR	95/99	*	*	*	*	NR	0,062	0,094	Recente	Positivo	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+
169	RIAL	IR	15/00	*	*	*	*	NR	4,269	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
170	RIAL	IR	17/00	*	*	*	*	NR	4,209	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
171	RIAL	IR	20/00	*	*	*	*	NR	4,984	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
172	RIAL	IR	21/00	*	*	*	*	NR	2,785	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
173	RIAL	IR	24/00	*	*	*	*	NR	1,863	2,146	Crônica	Positivo	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+/-	+/-
174	RIAL	IR	35/00	*	*	*	*	NR	2,224	NR	Crônica	Positivo	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-
175	RIAL	IR	47/00	*	*	*	*	NR	4,897	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
176	RIAL	IR	57/00	*	*	*	*	NR	0,048	0,119	Recente	Positivo	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+

Apêndice 1: Conjunto dos dados das amostras de soro avaliadas neste estudo e respectivos resultados de análises laboratoriais. (conclusão)																						
N.º WB	Amostra	População	N.º Amostra	Sexo	Idade	IR 1ª Geração	IR 2ª Geração	IFI	DOPI	DOPc	STARHS	WB	gp160	gp120	p66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17	
177	RIAL	IR	64/00	*	*	*	*	NR	0,745	1,854	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	
178	RIAL	IR	72/00	*	*	*	*	NR	4,220	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
179	RIAL	IR	73/00	*	*	*	*	NR	4,897	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
180	RIAL	IR	74/00	*	*	*	*	NR	4,966	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
181	RIAL	IR	75/00	*	*	*	*	NR	4,318	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
182	RIAL	IR	111/00	*	*	*	*	NR	0,015	0,068	Recente	Positivo	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
183	RIAL	IR	115/00	*	*	*	*	NR	2,246	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
184	RIAL	IR	116/00	*	*	*	*	NR	0,039	0,110	Recente	Positivo	+	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-
185	RIAL	IR	119/00	*	*	*	*	NR	2,273	NR	Crônica	Positivo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+/-
NR	RIAL	IR	745/97	*	*	*	*	NR	0,077	0,069	Recente	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
186	SCIAL ⁽¹⁹⁾	SC ⁽²⁰⁾	92	Masc	27	3,0	12,6	NR	-0,142	-0,033	Recente	Positivo	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+	
187	SCIAL	SC	138	Masc	31	6,6	13,5	NR	-0,008	0,088	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+
188	SCIAL	SC	195	Masc	29	3,8	9,2	NR	0,029	0,008	Recente	Positivo	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
189	SCIAL	SC	328	Masc	37	12,0	7,4	NR	-0,014	-0,018	Recente	Positivo	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+	+
190	SCIAL	SC	340	Masc	29	4,5	12,9	NR	-0,117	-0,068	Recente	Positivo	+	+	+	-	-	+/-	+/-	+	+	+
191	SCIAL	SC	413	Masc	23	6,8	15,6	NR	0,241	0,290	Recente	Positivo	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-

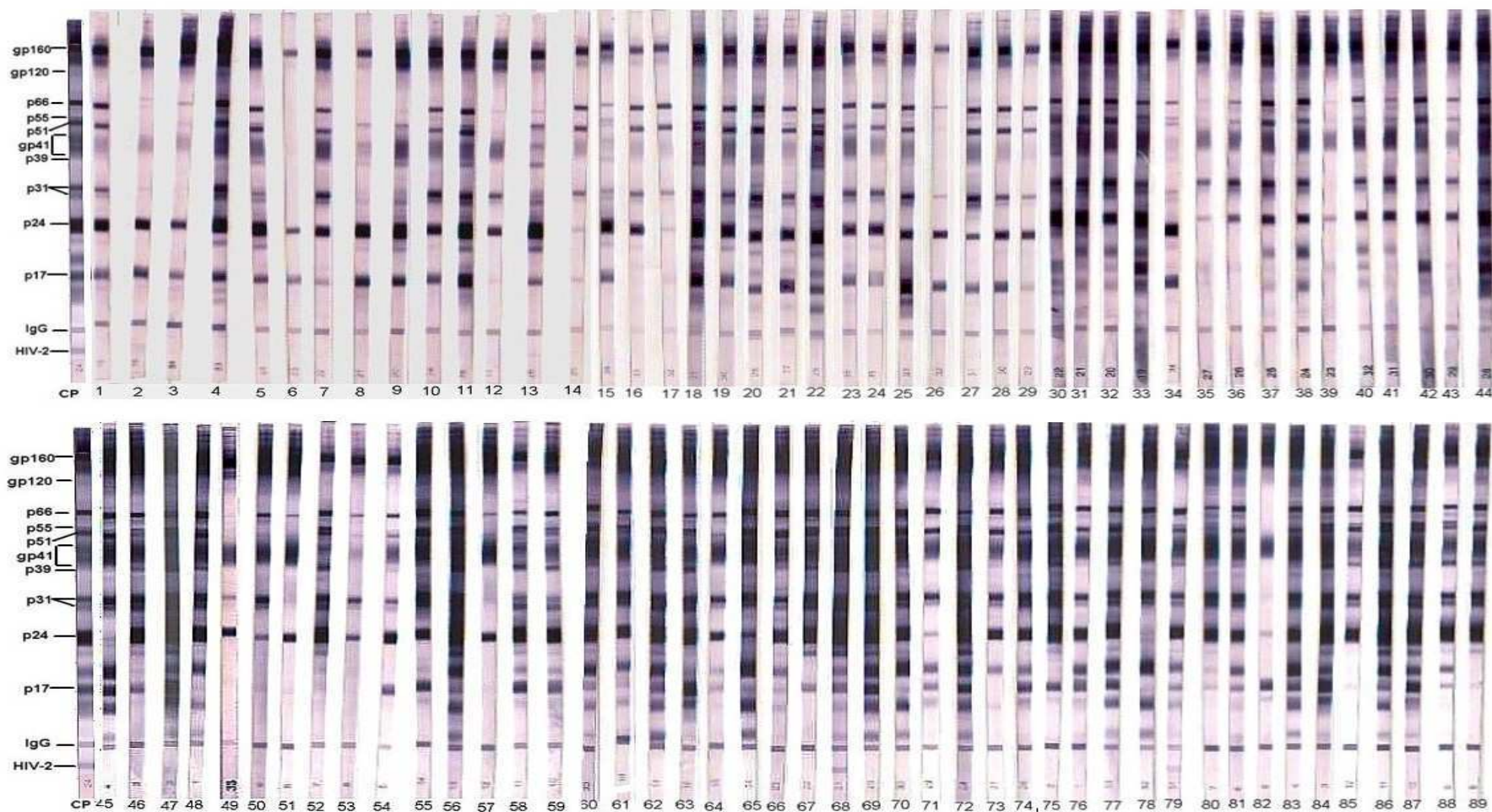
(1) Teste de Western blot para HIV; (2) Amostras de soro de gestantes analisadas para anticorpos anti-HIV no Instituto Adolfo Lutz-Central; (3) Feminino; (4) Masculino; (5) Índice de reatividade (Densidade óptica/"cut off") de testes de ELISA para HIV, de 1ª geração; (6) Índice de reatividade (Densidade óptica/"cut off") de testes de ELISA para HIV, de 2ª geração; (7) Teste de imunofluorescência indireta para HIV; (8) Densidade óptica padronizada do ensaio menos sensível para HIV, inicial; (9) Densidade óptica padronizada do ensaio menos sensível para HIV, confirmatório; (10) *Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*; (11) Teste não realizado; (12) Positivo; (13) Positivo-fraco; (14) Negativo; (15) Amostras de soro analisadas para anticorpos anti-HIV no Laboratório Local de Itapeerica da Serra; (16) Usuários de Centro de Testagem e Aconselhamento; (17) Amostras de soro de pacientes com suspeita de infecção recente pelo HIV, analisadas no Instituto Adolfo Lutz-Central; (18) Infecção recente pelo HIV; (19) Amostras de soro de soroconvertores para o HIV, analisadas no Instituto Adolfo Lutz-Central; (20) Soroconvertores para o HIV.

Notas:

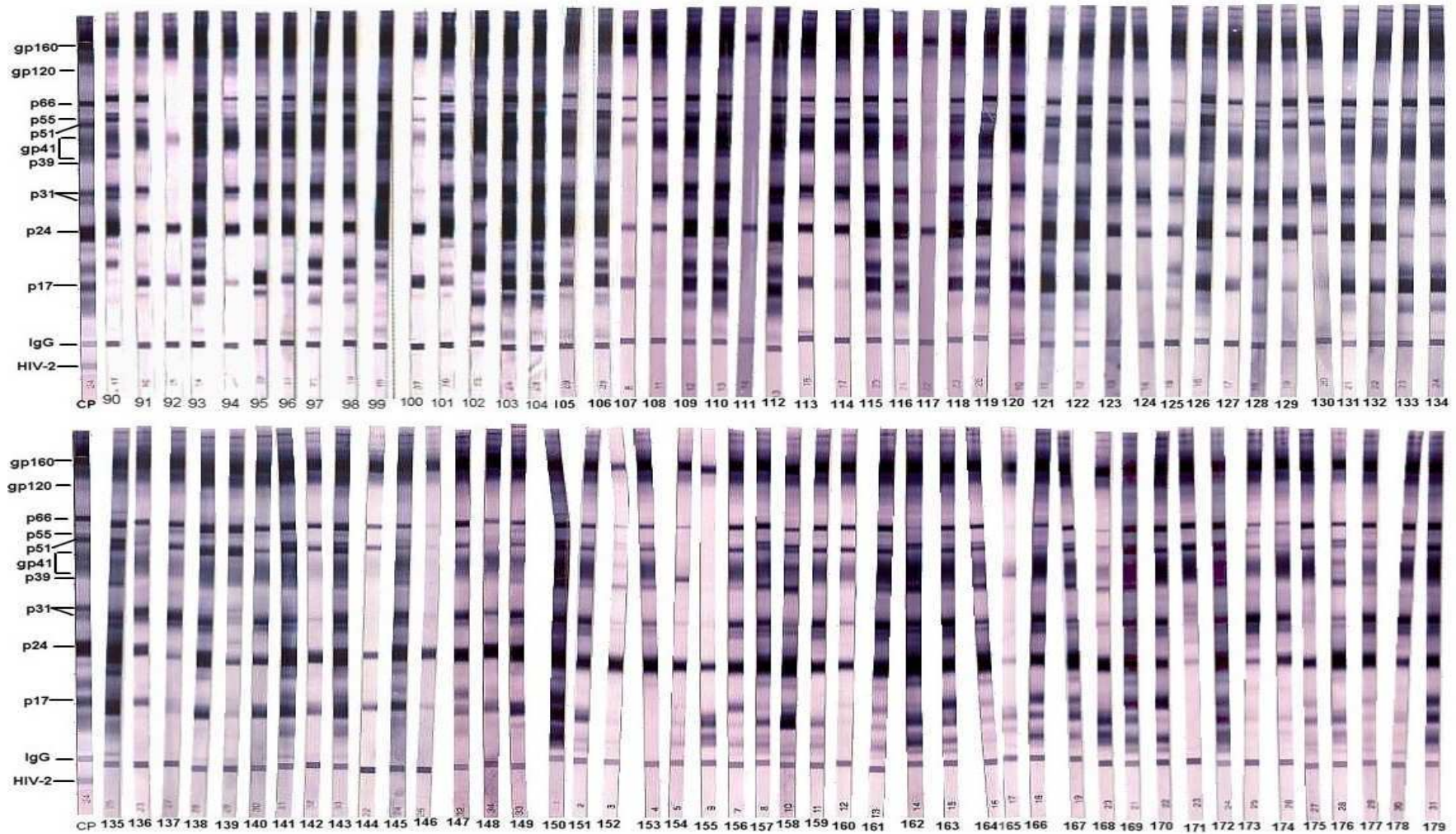
* Dado não disponível

Valores do IR de 1ª e de 2ª geração foram arredondados

Apêndice 2: Imagens digitalizadas das fitas de reação do teste de Western Blot para HIV, realizado nas amostras de soro deste estudo - amostras nº 1 a 89 (redução de aproximadamente 50%).

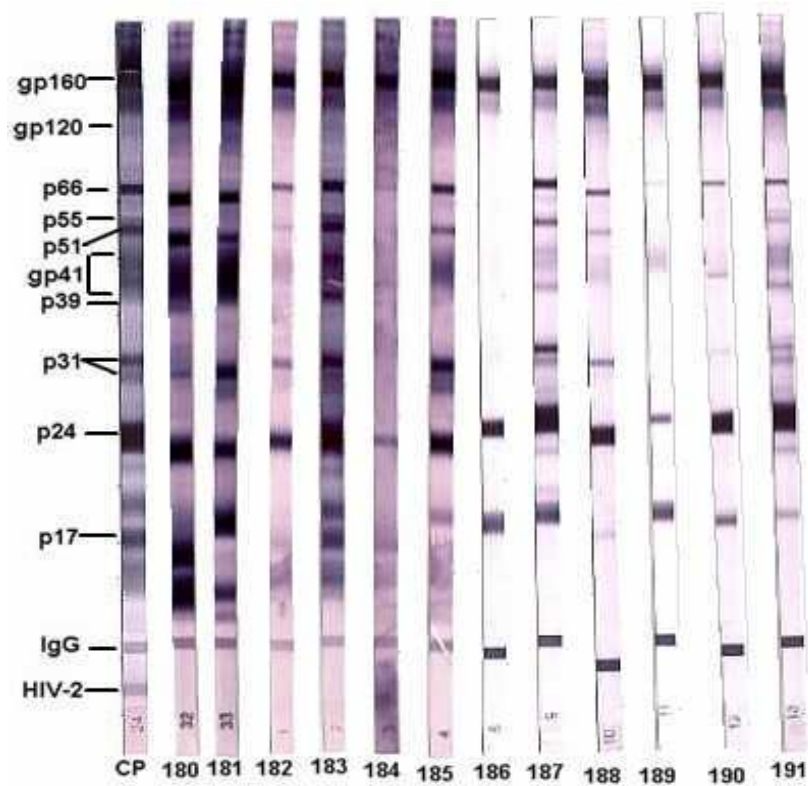


Apêndice 3: Imagens digitalizadas das fitas de reação do teste de Western Blot para HIV, realizado nas amostras de soro deste estudo - amostras nº 90 a 179 (redução de aproximadamente 50%).



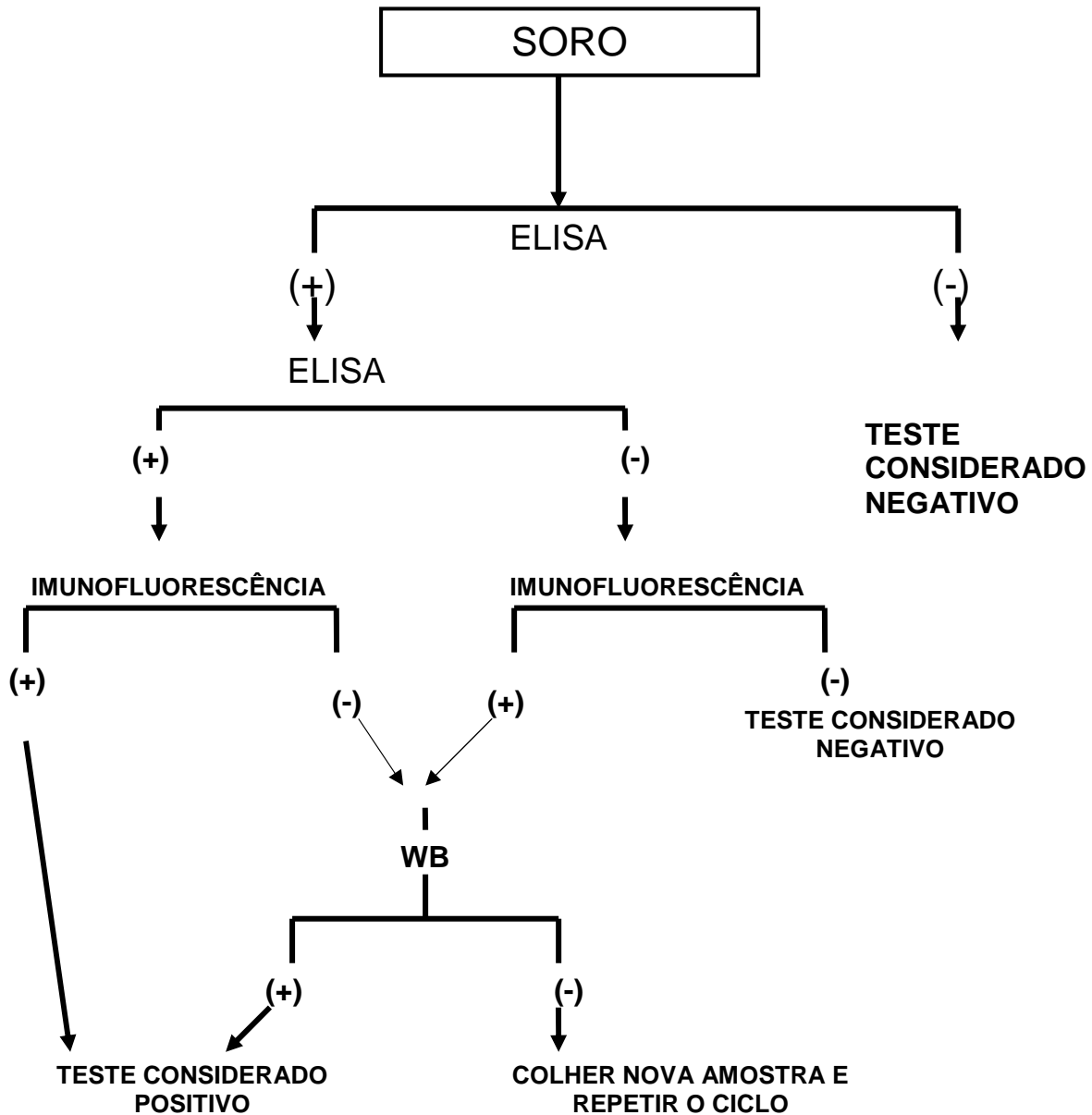
Obs.: As fitas de nº 119 e 131 são referentes a mesma amostra, analisada em ensaios distintos.

Apêndice 4: Imagens digitalizadas das fitas de reação do teste de Western Blot para HIV, realizado nas amostras de soro deste estudo - amostras nº 180 a 191 (redução de aproximadamente 50%).

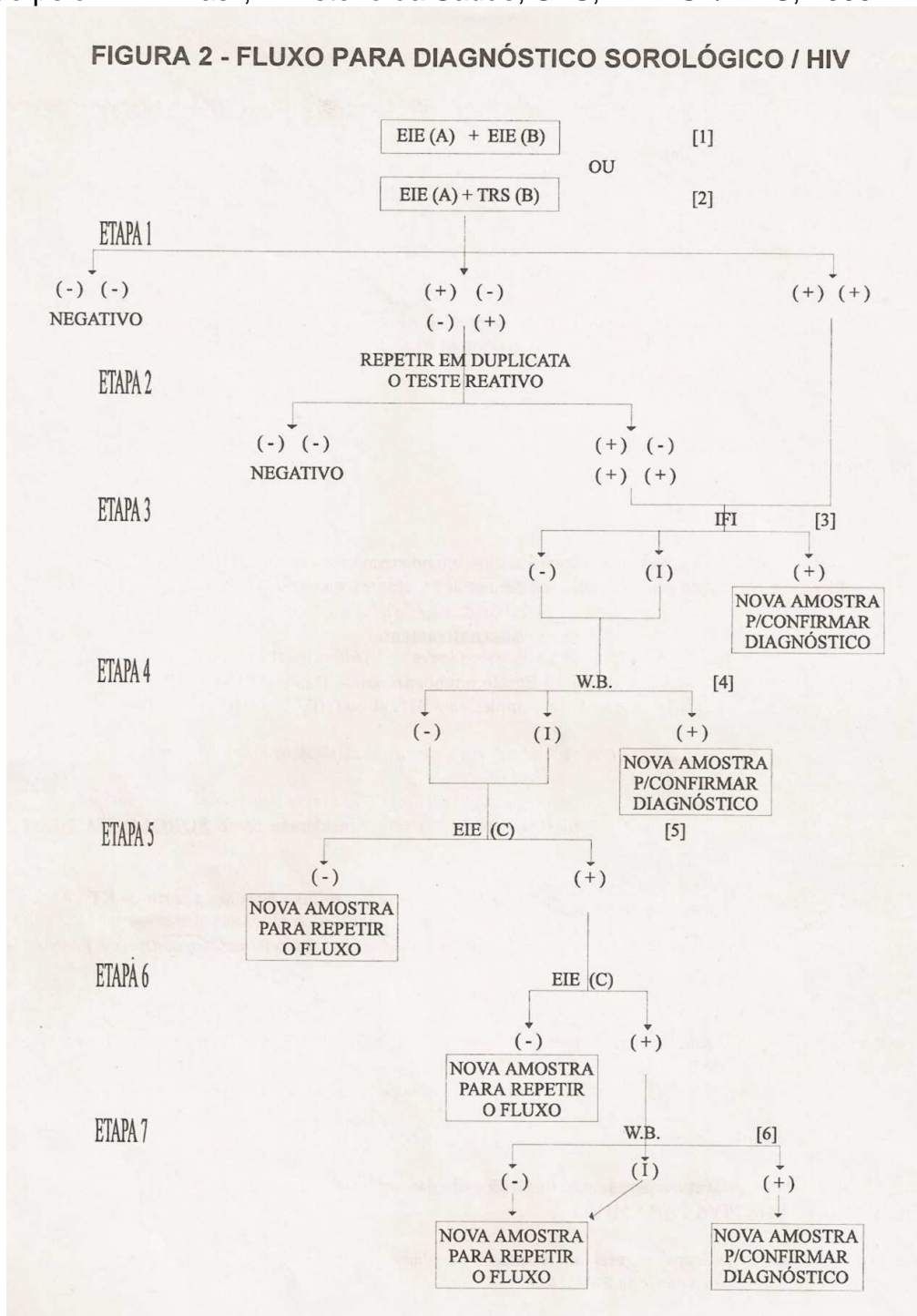


ANEXOS

Anexo 1: Fluxograma de testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV - Brasil, Ministério da Saúde, SNPES, Divisão Nacional de DST - SIDA/AIDS, 1988.

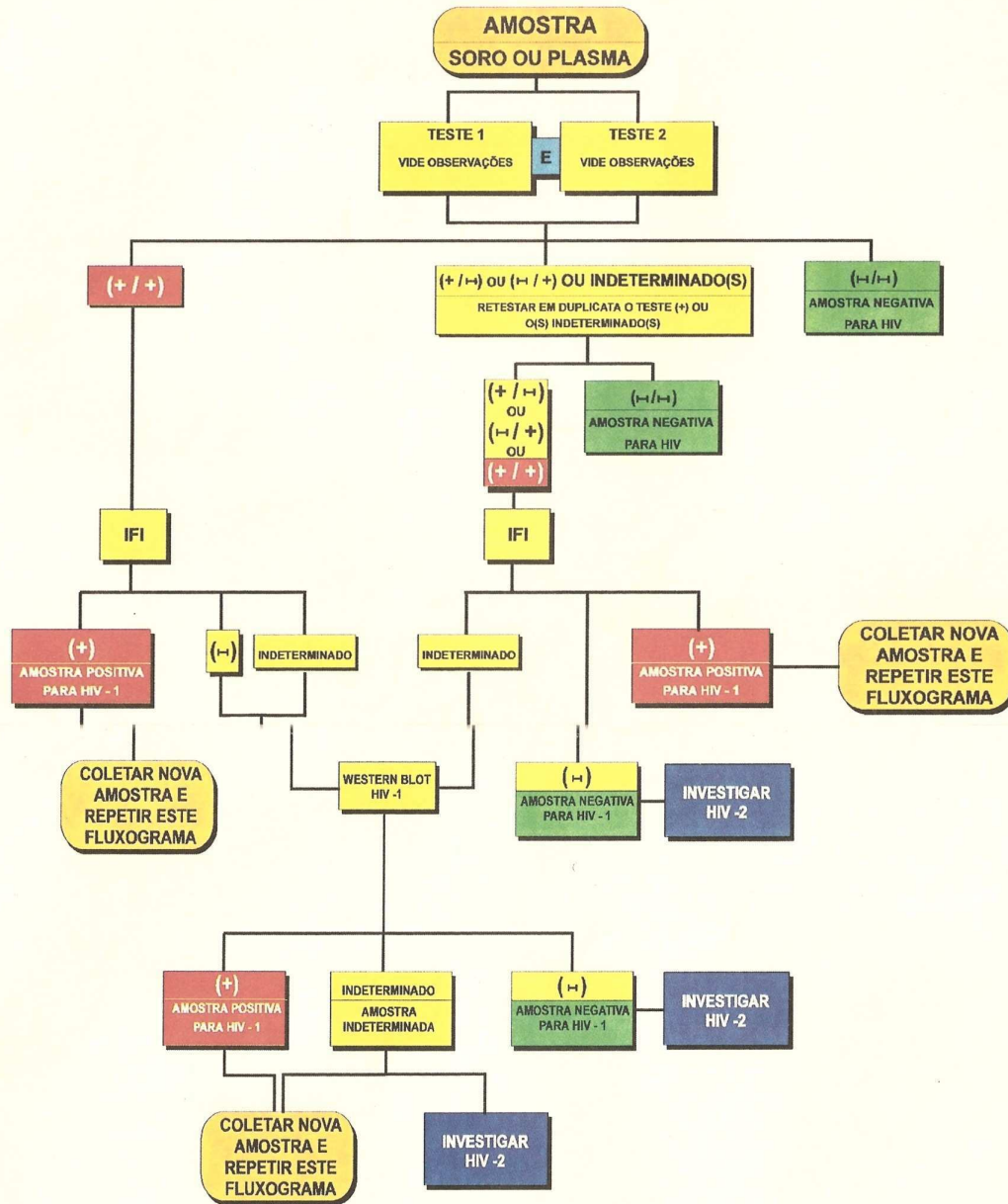


Anexo 2: Fluxograma de testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV - Brasil, Ministério da Saúde, SAS, PN-DST/AIDS, 1995.



Anexo 3: Fluxograma de testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV - Brasil, Ministério da Saúde, SAS, PN-DST/AIDS - Portaria MS/SAS nº 488/98.

FLUXOGRAMA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO HIV



LEGENDA	
ELISA	= ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
(+)	= TESTE REAGENTE
(-)	= TESTE NÃO REAGENTE
IFI	= IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

OBSERVAÇÕES
1) Iniciar obrigatoriamente com testes 1 e 2. Os testes deverão ser diferentes: com antígenos e/ou princípios metodológicos distintos (testes de ELISA, RÁPIDOS, SIMPLES ou outros).
2) Amostras positivas nos testes confirmatórios: recomenda-se a coleta de nova amostra, que também deve ser testada de acordo com este fluxograma.
3) Critérios para interpretação do Western blot: negativo: ausência de bandas. positivo: presença de duas bandas entre as: gp 120/160, gp 41, p24. indeterminado: qualquer outro padrão.
4) Investigação de HIV-2: enviar(a)s amostra(s) para os laboratórios de referência da rede do Programa Nacional de DST/AIDS.

Anexo 1: Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa e Científico

Vide cópia do documento na próxima página.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 08 de junho de 2004.

Ilmo(a) Sr(a).


CARMEM APARECIDA DE FREITAS OLIVEIRA

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa

**ESTIMATIVA DO TEMPO DE INFECÇÃO EM AMOSTRAS REATIVAS PARA
DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DO HIV - 1.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS , Brasília, 1996.

Atenciosamente



Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



APROVAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

IAL/CCD/CEPIAL/CTC
PROJETO CCD BM Nº 11/04

Coordenadora: Carmem Aparecida Freitas Oliveira

Projeto:

Senhora Coordenadora:

Comunicamos que o projeto supra citado foi cadastrado no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação na CCD/BM e CEPIAL.

Recebido no CTC/IAL em 16/03/2005

Myrna Sabino

Presidente do CTC/IAL

Via 1: Coordenador

Via 2: CCD/BM

Via 3: CTC

Anexo 1: Trabalho publicado

Vide documento em PDF inserido na próxima página.

Rate and Incidence Estimates of Recent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections among Pregnant Women in São Paulo, Brazil, from 1991 to 2002

Carmem A. de Freitas Oliveira,^{1*} Mirthes Ueda,¹ Rosemeire Yamashiro,¹ Rosângela Rodrigues,¹ Haynes W. Sheppard,² and Luís Fernando de Macedo Brígido^{1,3}

Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde,¹ and National Program on STD and AIDS, Ministry of Health,³ São Paulo, Brazil, and Viral and Rickettsial Disease Laboratory, California Department of Health Services, Berkeley, California²

Received 22 March 2004/Returned for modification 18 August 2004/Accepted 7 November 2004

The serological testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) was employed to estimate HIV incidence among pregnant women from São Paulo, Brazil. A cross-sectional study (1999 to 2002) showed an incidence of infection of 0.2 per 100 pregnant women per year (95% confidence interval, 0.041 to 0.608). Western blot profiles suggested an association between results of the STARHS analysis and gp41/gp31 bands.

Epidemiological data have shown that human immunodeficiency virus (HIV) and AIDS transmission patterns have been changing in Brazil in the last few years. The increase in the reported number of AIDS cases associated with heterosexual transmission was accompanied by an increase in the proportion of AIDS among females. In São Paulo, as well as in the rest of Brazil, the male/female ratio among AIDS cases reported for individuals older than 12 years has fallen from 6:1 in the middle 1980s to less than 2:1 in 2002 and 2003 (21, 22). Monitoring the spread of HIV among healthy, sexually active women is an important element in tracking epidemic trends among heterosexual people and in supporting strategies for the prevention of mother-to-child HIV transmission. According to the Brazilian Ministry of Health cross-sectional sentinel serosurveys, conducted since 1997, HIV seroprevalence among delivering mothers has ranged from 0.00 to 2.41% (95% confidence intervals [CI] range from 0.00 to 4.74%), depending on year of evaluation, geographic region, and age groups (23). An assessment of incident infections (recently acquired infections) might provide useful information to better understand the epidemic dynamics among this low-prevalence segment of the population, potentially in real time for prevention strategies. The serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion (STARHS) (14), also referred to as the “detuned” enzyme immunoassay (EIA), employs a sensitive-less sensitive EIA testing strategy and has been used to estimate HIV incidence from HIV-reactive serum samples (3–5, 9–17, 24–26, 30–33). Other laboratory tools, also based on antibody assays, have been evaluated for the detection of recent HIV infections by assessing specific reactivity against virus antigens (8, 18–20, 28).

In the present study, we applied the STARHS in a cross-sectional analysis to estimate seroincidence among specimens

from pregnant women (PW) from São Paulo, Brazil, and investigate the correlation of standard Western blot (WB) assay band patterns with the results of the STARHS.

We tested, unlinked and anonymously, 106 anti-HIV-positive serum samples from PW seeking antenatal care in public clinics in São Paulo from 1991 to 2002. Serum samples were obtained from the serum bank of the Serology Section of the Adolfo Lutz Institute (IAL), São Paulo, and comprise all 93 HIV-seroreactive specimens from PW received for confirmatory purposes from 1991 to 2002 and 13 of 14 (92.9%) HIV-seroreactive specimens from 4,247 PW who attended for testing purposes from 1999 to 2002. Recent HIV seroconversion (within the previous 170 days) was evaluated by employing the Organon Teknika/bioMérieux Vironostika HIV type 1 (HIV-1) less sensitive EIA (33). Estimates of HIV incidence were calculated for the 1999-to-2002 period by means of mathematical modeling proposed by Janssen et al. (14). An HIV-1 Western blot assay (Genelabs Diagnostics, Singapore) was performed according to the manufacturer’s instructions. Each serum strip was interpreted and its banding patterns were scored in a blind fashion to avoid bias. Bivariate analysis was employed to assess the association (χ^2 test) between STARHS results and the independent variables: age groups (by 5-year strata) and WB banding profiles. A stepwise forward-based procedure was employed in a multiple logistic regression model analysis. Based on adjusted odds ratios (OR), a final logistic regression model was evaluated. This study is a part of the project IAL/CCD-BM 28/01, approved by the IAL Committee for Ethics in Research, in accordance with Brazilian policies for research involving human subjects.

By applying the STARHS strategy, we found 18 of 106 specimens (17.0%) with putative recent infection reactivity. This overall proportion of HIV infections is similar to rates reported by other authors also evaluating low-risk populations (14, 19), although we observed that 30.8% of specimens (4 of 13) showed a reactivity pattern consistent with recent infection for the most recent years studied (1999 to 2002) (Table 1). The estimated annual HIV seroincidence, calculated for the 1999-

* Corresponding author. Mailing address: Seção de Sorologia, Instituto Adolfo Lutz-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 351, 10º andar, 01246-902 São Paulo, Brazil. Phone: (55) 11 3068 2885. Fax: (55) 11 3085 3505. E-mail: freitas@ial.sp.gov.br.

TABLE 1. Recent HIV-1 infections according to age group and year and HIV incidence data from 1999 to 2002^a

Variable	Category	No. (%)				Incidence/100 PW/yr (95% CI)
		Tested	HIV positive	Available for STARHS	Recent seroconversions	
Age (yr) ^b	Unknown	NA	20 (ID)	20 (100.0)	05 (25.0)	ID
	15–19	NA	10 (ID)	10 (100.0)	01 (10.0)	ID
	20–24	NA	28 (ID)	28 (100.0)	05 (17.9)	ID
	25–30	NA	24 (ID)	24 (100.0)	04 (16.7)	ID
	30–35	NA	16 (ID)	16 (100.0)	03 (18.8)	ID
	> 35	NA	08 (ID)	08 (100.0)	0 (0.0)	ID
Period of specimen collection	1991–1993 ^c	NA	31 (ID)	31 (100.0)	8 (25.8)	ID
	1994–1996	NA	45 (ID)	45 (100.0)	4 (8.9)	ID
	1997–1998	NA	13 (ID)	13 (100.0)	4 (20.0)	ID
	1999–2002 ^{d,e}	4,251	18 (ID)	17 (94.4)	2 (20.0)	ID
Annual HIV seroincidence	1999 or 2000	2,888	7 (0.24)	6 (85.7)	2 (33.3)	0.17 (0.01–0.64)
	2001 or 2002 ^e	1,359	7 (0.52)	7 (100.0)	2 (28.6)	0.32 (0.02–1.37)
	1999–2002 ^e	4,247	14 (0.33)	13 (92.9)	4 (30.8)	0.22 (0.04–0.61)

^a Data are from sera from HIV-positive pregnant woman analyzed at the Central Laboratory of the Adolfo Lutz Institute (1991 to 2002). CI, confidence interval; NA, not available; ID, insufficient data for calculations.

^b Bivariate analysis. $P = 0.708$ (χ^2 test).

^c February to December 1991.

^d Including 4,247 samples received for testing and 4 samples received for confirmation purposes only.

^e January to April 2002.

to-2002 period, was 0.22 per 100 PW per year (95% CI, 0.04 to 0.61 per 100 PW per year) (Table 1). Unfortunately, information on the number of HIV screening tests performed on samples received from 1991 to 1998 was limited, which hindered the evaluation of the incidence trends.

No significant association between STARHS results and age groups could be found ($P = 0.708$). Except for the PW aged 35 to 39 years, for which only established infections were identified, similar proportions of recent HIV infections were observed. With regard to antibody reactivity profiles, a negative or indeterminate pattern for one of the gp41, p31, p51, p66, and gp120 regions was a predictor of recent HIV-1 seroconversion (OR = 108.75, $P < 0.001$; OR = 7.36, $P < 0.001$; OR = 4.03, $P = 0.015$; OR = 4.46, $P = 0.023$; and OR = 5.38, $P = 0.105$, respectively). After multiple logistic regression model analysis, only gp41 remained an independent factor associated with recent HIV-1 seroconversion (adjusted OR = 91.19, $P < 0.001$). On the other hand, comparisons among different combinations of bands present in the tested strip showed that a strong reactivity for all *env*- or *pol*-encoded proteins and strong reactivities for combined gene-encoded proteins, especially gp41 and p31 antigens, might be correlated with an established HIV infection outcome (Table 2). These results are in accordance with data obtained by other authors who investigated the differential maturation of human humoral immune responses against HIV antigens and evaluated the responses as markers to predict disease progression (6, 7, 27, 29). Our results suggest that a specific antibody response examined by means of standard WB procedures may serve as a predictor of recent HIV infection and may be useful in conjunction with STARHS results. Both methodologies, STARHS and WB, can reveal patterns in antibody kinetics maturation that may be potentially helpful not only in timing infection but also in other fields of AIDS research. Validation of these tools and eventually clues for knowledge on HIV pathogenesis may be provided from follow-up studies of antibody response maturation. The

WB approach would have the advantage of making it possible to evaluate data retrospectively, even when biological specimens are no longer available, as long as hard data have been recorded. Longitudinal studies based on serial samples should be carried out to corroborate these findings.

Serum samples analyzed in the present study were collected from female individuals whose test was performed due to suspected or confirmed pregnancy between 1991 and 2002. It corresponds to a period when HIV infection may have been expanding among females in Brazil, as suggested by the continuous decrease in the male/female ratio for AIDS cases. The estimation of the outcome in this study is based on a relatively small number of samples, from which a few misclassified samples might have a major impact on incidence estimates. The limitations of single samples from routine diagnostic proce-

TABLE 2. Assessment of the strength of different combinations of WB bands with matched strongly positive patterns in predicting an established infection among PW in São Paulo from 1991 to 2002

Combination of WB bands	Crude OR (crude 95% CI)	P value
Only <i>env</i> encoded antigens gp160 + gp120 + gp41	24.86 (6.25–140.52)	<0.001 ^a
Only <i>pol</i> encoded antigens p66 + p51 + p31	4.97 (2.33–10.41)	<0.001 ^b
Only <i>gag</i> encoded antigens p55 + p24 + p17	1.03 (0.49–2.08)	0.930 ^b
Mixed profile		
gp41 + p31	18.79 (6.50–56.23)	<0.001 ^b
gp41 + p66	15.00 (5.14–45.20)	<0.001 ^a
gp41 + p51	11.22 (4.31–29.09)	<0.001 ^b
gp41 + p31 + p51	9.76 (4.53–20.92)	<0.001 ^b
gp41 + p31 + p51 + p66	8.12 (4.18–15.65)	<0.001 ^b
gp160 + gp120 + gp41 + p24	8.60 (3.06–25.15)	<0.001 ^a
gp160 + gp120 + gp41 + p31 + p24	7.58 (3.45–16.75)	<0.001 ^b

^a Fisher exact P value.

^b Yates corrected P value.

dures must be considered. However, the relative stability among the periods may suggest that these estimates can be used as a baseline for HIV incidence in PW in São Paulo State for the period analyzed. False detuned assay results have been reported for samples from patients with advanced disease and low CD4 values or for those with controlled viremia due to highly active antiretroviral therapy (26). Although all samples analyzed in this anonymous study have been collected for diagnostic purposes, we cannot rule out these possibilities. Moreover, STARHS performance may differ for viruses in the non-B clade. Although we have not evaluated this issue in the present study, clade B viruses have been responsible for most HIV-1 infections in this area (1, 2).

Our data show that the STARHS is a feasible, inexpensive, and time-saving tool to identify recent HIV infections in banked sera from a well-defined low-risk population. Public health laboratories, and clinical laboratories as well, can play an essential role in the implementation of surveillance strategies based upon antibody assays, especially in retrospective studies. In spite of limitations with regard to an anonymous cross-sectional study design, our results may provide information on infections on a per-incident basis. In conclusion, such evaluations might be useful to understand in more detail the trends in epidemics in different segments of the population, such as among sexually active women, contributing to the prevention strategies that focus on heterosexual and mother-to-child HIV transmission.

This study was partially supported by the Instituto Adolfo Lutz-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, Brazil.

We are grateful to André Rodrigues de Campos and Alonso Fernandes for technical assistance and to all colleagues who made this work possible.

REFERENCES

- Bongertz, V., D. C. Bou-Habib, L. F. Brigido, M. Caseiro, P. J. Chequer, J. C. Couto-Fernandez, P. C. Ferreira, B. Galvao-Castro, D. Greco, M. L. Guimaraes, M. I. Linhares de Carvalho, M. G. Morgado, C. A. Oliveira, S. Osmanov, C. A. Ramos, M. Rossini, E. Sabino, A. Tanuri, M. Ueda, et al. 2000. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 23:184-193.
- Brindeiro, R. M., R. S. Diaz, E. C. Sabino, M. G. Morgado, I. L. Pires, L. Brigido, M. C. Dantas, D. Barreira, P. R. Teixeira, A. Tanuri, and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17:1063-1069.
- Brown, A., and K. Sadler. 2003. HIV and other STIs in the United Kingdom: further increases. *Eurosurveill. Wkly. Arch.* 7. [Online.] <http://www.eurosurveillance.org/ew/2003/031127.asp>. (Accessed 22 September 2004.)
- Centers for Disease Control and Prevention. 2001. HIV incidence among young men who have sex with men—seven U.S. cities, 1994-2000. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 50:440-444.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Trends in primary and secondary syphilis and HIV infections in men who have sex with men—San Francisco and Los Angeles, California, 1998-2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 53:575-578.
- Chargelegue, D., C. M. O'Toole, and B. T. Colvin. 1993. A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 gag protein in HIV-1⁺ patients with haemophilia: titre and avidity. *Clin. Exp. Immunol.* 93:331-336.
- Chargelegue, D., C. M. Stanley, C. M. O'Toole, B. T. Colvin, and M. W. Steward. 1995. The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. *Clin. Exp. Immunol.* 99:175-181.
- Constantine, N. T., A. M. Sill, N. Jack, K. Kreisel, J. Edwards, T. Cafarella, H. Smith, C. Bartholomew, F. Cleghorn, and W. A. Blattner. 2003. Improved classification of recent HIV-1 infection by employing a two-stage sensitive/less sensitive test strategy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 32:94-103.
- Department of Health and Mental Hygiene, New York, N.Y. 2003. HIV incidence in New York City, 2001. Estimates using the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion (STARHS) on specimens testing HIV+ at public laboratories. *HIV Surveill. Epidemiol. Program Q. Rep.* 1:S1. [Online.] <http://www.nyc.gov/html/doh/pdf/dires/sa2003.pdf>.
- Gouws, E., B. G. Williams, H. W. Sheppard, B. Enge, and S. A. Karim. 2002. High incidence of HIV-1 in South Africa using a standardized algorithm for recent HIV seroconversion. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29:531-535.
- Gupta, S. B., O. N. Gill, C. Graham, A. D. Grant, P. A. Rogers, and G. Murphy. 2000. What a test for recent infection might reveal about HIV incidence in England and Wales. *AIDS* 14:2597-2601.
- Hamers, F., and A. M. Downs. 2004. The changing face of the HIV epidemic in western Europe: what are the implications for public health policies? *Lancet* 364:83-94.
- Hu, D. J., S. Vanichseni, P. A. Mock, N. L. Young, T. Dobbs, R. H. Byers, Jr., K. Choopanya, F. V. Griesven, D. Kitayaporn, J. S. McDougal, J. W. Tappero, T. D. Mastro, and B. S. Parekh. 2003. HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: use of the IgG capture BED enzyme immunoassay. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 19:727-730.
- Janssen, R. S., G. A. Satten, S. L. Stramer, B. D. Rawal, T. R. O'Brien, B. J. Weiblen, F. M. Hecht, N. Jack, F. R. Cleghorn, J. O. Kahn, M. A. Chesney, and M. P. Busch. 1998. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 280:42-48.
- Machado, D. M., E. L. Delwart, R. S. Diaz, C. F. de Oliveira, K. Alves, B. D. Rawal, M. Sullivan, M. Gwinn, K. A. Clark, and M. P. Busch. 2002. Use of the sensitive/less-sensitive (detuned) EIA strategy for targeting genetic analysis of HIV-1 to recently infected blood donors. *AIDS* 16:113-119.
- McFarland, W., M. P. Busch, T. A. Kellogg, B. D. Rawal, G. A. Satten, M. H. Katz, D. James, and R. S. Janssen. 1999. Detection of early HIV infection and estimation of incidence using a sensitive/less-sensitive enzyme immunoassay testing strategy at anonymous counseling and testing sites in San Francisco. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 22:484-493.
- Parekh, B. S., D. J. Hu, S. Vanichseni, G. A. Satten, D. Candal, N. L. Young, D. Kitayaporn, L. O. Srisuwanvilai, S. Rakhtam, R. Janssen, K. Choopanya, and T. D. Mastro. 2001. Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the 3A11-LS assay for detecting recent HIV seroconversion among individuals with HIV-1 subtype B or E infection in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17:453-458.
- Parekh, B. S., M. S. Kennedy, T. Dobbs, C. P. Pau, R. Byers, T. Green, D. J. Hu, S. Vanichseni, N. L. Young, K. Choopanya, T. D. Mastro, and J. S. McDougal. 2002. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 18:295-307.
- Parekh, B. S., and J. S. McDougal. 2001. New approaches for detecting recent HIV-1 infection. *AIDS Rev.* 3:183-193.
- Parekh, B. S., C. P. Pau, M. S. Kennedy, T. L. Dobbs, and J. S. McDougal. 2001. Assessment of antibody assays for identifying and distinguishing recent from long-term HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17:137-146.
- Programa Estadual de DST e Aids, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brazil. 2003. Boletim Epidemiológico, C.R.T. DST/AIDS, CVE. XXII:1. [Online.] http://www.crt.saude.sp.gov.br/down/AIDS_2003_raca_cor_mort.pdf.
- Programa Nacional de DST e Aids, Ministério da Saúde, São Paulo, Brazil. 2003. Boletim Epidemiológico AIDS XVII:1. [Online.] http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/boletim_dezembro_2003/tabela1.asp.
- Programa Nacional de DST e Aids, Dados e Pesquisas, Ministério da Saúde, São Paulo, Brazil. 2000. Soroprevalência para o HIV segundo corte e grupo. Estudo Sentinela Brasil, 1997-2000. [Online.] <http://www.aids.gov.br/final/dados/Resultados%201997%20-%202000.doc>. (Accessed 22 September 2004.)
- Rawal, B. D., A. Degula, L. Lebedeva, R. S. Janssen, F. M. Hecht, H. W. Sheppard, and M. P. Busch. 2003. Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33:349-355.
- Rutherford, G. W., S. K. Schwarcz, and W. McFarland. 2000. Surveillance for incident HIV infection: new technology and new opportunities. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 25:S115-S119.
- Schwarcz, S., T. Kellogg, W. McFarland, B. Louie, R. Kohn, M. Busch, M. Katz, G. Bolan, J. Klausner, and H. Weinstock. 2001. Differences in the temporal trends of HIV seroconversion and seroprevalence among sexually transmitted disease clinic patients, 1989-1998: application of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Am. J. Epidemiol.* 153:925-934.
- Sheppard, H. W., M. S. Ascher, B. McRae, R. E. Anderson, W. Lang, and J. P. Allain. 1991. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 4:704-712.
- Suligoi, B., C. Galli, M. Massi, F. Di Sora, M. Sciandra, P. Pezzotti, O. Recchia, F. Montella, A. Sinicco, and G. Rezza. 2002. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method. *J. Clin. Microbiol.* 40:4015-4020.
- Thomas, H. I. J., S. Wilson, C. M. O'Toole, C. M. Lister, A. M. Saeed, R. P. F. Watkins, and P. Morgan-Capner. 1996. Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1. *Clin. Exp. Immunol.* 103:185-191.
- Weinstock, H., M. Dale, M. Gwin, G. A. Satten, D. Kothe, J. Mei, J. Royalty,

- L. Linley, C. Fridlund, B. Parekh, B. D. Rawal, M. P. Busch, and R. S. Janssen.** 2002. HIV seroincidence among patients at clinics for sexually transmitted diseases in nine cities in the United States. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **29**:478–483.
31. **World Health Organization.** 2004. New strategies for HIV/AIDS surveillance in resource-constrained countries. Addis Ababa, Ethiopia. 26–29 January 2004. [Online.] http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/surveillance_addis/en/. (Accessed 22 September 2004.)
32. **World Health Organization and Joint United Nations Programme on HIV/AIDS.** 2001. Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance: selection, evaluation, and implementation. W.H.O./CDS/CSR/EDC/2001.16, UNAIDS/01.22E. ISBN 9173-92-063-7. [Online.] <http://www.emro.who.int/asd/backgrounddocuments/uae03/surv/HIVTestingGuidelines.pdf>.
33. **Young, C. L., D. J. Hu, R. Byers, S. Vanichseni, N. L. Young, R. Nelson, P. A. Mock, K. Choopanya, R. Janssen, T. D. Mastro, and J. V. Mei.** 2003. Evaluation of a sensitive/less sensitive algorithm using the bioMérieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **19**:481–486.