

**Rosana Mara Molina**

---

---

**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1 EM CRIANÇAS  
NASCIDAS DE MÃES HIV POSITIVAS, ATRAVÉS DA  
“NESTED PCR” (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre em Ciências na área de  
Farmacologia**

**Orientadora: prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Cecília Botelho Costa**

**Campinas**

**1998**

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:			
V.	Ex.		
TOMBO BC/	37640		
PROC.	229199		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	06/05/88		
N.º CPD			

CM-00123077-6

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

M733d Molina, Rosana Mara  
Diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em crianças nascidas de mães HIV positivas, através da "nested pcr" (reação em cadeia da polimerase) / Rosana Mara Molina. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa  
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infecções por HIV. 2. Reação em cadeia de polimerase. I. Sandra Cecília Botelho Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

### Orientador:

Prof. Dr. Sandra Cecília Botelho Costa

### Membros:

1. Prof. Dr. Sandra Cecília Botelho Costa *Sandra Cecília Botelho Costa*
2. Prof. Dr. Marisa Márcia Mussi – Pinhata *Marisa Márcia Mussi Pinhata*
3. Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Junior *Fernando Lopes Gonçalves Junior*

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

Data: 17/12/1998

*Ao meu pai Orlando e à minha mãe Wanda, pelo  
amor, carinho, incentivo ao estudo e extrema  
dedicação aos filhos*

*A meu irmão Cesar pelo exemplo de perseverança  
À minha avó Antónia, pelo carinho.*

*Ao meu pai Orlando e à minha mãe Wanda, pelo  
amor, carinho, incentivo ao estudo e extrema  
dedicação aos filhos*

*A meu irmão Cesar pelo exemplo de perseverança  
À minha avó Antónia, pelo carinho.*

*Ao meu esposo Emerson, pelo amor, carinho, paciência  
e por estar sempre ao meu lado dando-me  
alegria e coragem*

*Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela  
orientação, confiança, compreensão, bom  
humor, amizade e por ter tornado possível  
a conquista de mais uma etapa  
da minha vida.*

*À Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos*

*Vilela, pela co-orientação,*

*coragem, conselhos e amizade.*

## ***AGRADECIMENTOS***

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela grande sabedoria e sugestões.

Ao Prof. Dr. Marcos T. da Silva do departamento de Pediatria, pela colaboração e intensa dedicação.

À Profa. Dra. Adléia A. C. Toro, também do departamento de Pediatria, pela colaboração no fornecimento das amostras de sangue das crianças e pela amizade.

À Dra. Neiva do Hemocentro-UNICAMP, pelo exemplo de dedicação à pesquisa, pelas aulas e grande amizade.

À Maria Helena Marçal pela preocupação e apoio constante e Emerson Marçal pelo incentivo e reconhecimento.

À Maristela, pela simpatia, oportunidade e amizade.

À Dulcinéia Albuquerque, pela grande amizade e pelos atos e palavras de apoio e incentivo.

À Paula Durante, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

À Sandra Bonon, pela atenção mesmo antes de nossa convivência diária e pela amizade.

Às amigas Gláucia Marcon, pelo incentivo e companheirismo, Silvia Menone, pela alegria, Ériwan, pelo ótimo humor e versatilidade, Teresa Fioravanti, pelas oportunidades, Eliana Nogueira, pelo agradável convívio na parte inicial do projeto.

Ao amigo Carlos Roberto, pelas explicações e grande amizade.

Às amigas Ucha, Cris, Devanira, Luciana Pugliese, Yajaira, Dalva, Liliane e ao amigo Jeferson, pela convivência agradável.

À Silvana Bordin, pelas dicas valiosas.

À amiga Angela, pela sensibilidade e simpatia

À amiga Elianete, pelas palavras de incentivo.

Às auxiliares de enfermagem Elza e Beth, pela coleta das amostras, pelo carinho e amizade. Ao Edir, também do ambulatório de coleta, pela dedicação.

Aos funcionários Ronald e Luzia do laboratório de sorologia-Hemocentro, pelos ensinamentos e atenção.

À Aparecida, assistente social, pelo encaminhamento das crianças para as coletas de sangue e pela amizade.

À Maria Rita pela correção ortográfica deste trabalho e ao Emilton pela dedicação.

À funcionária Angélica, por fazer um trabalho essencial para o andamento da pesquisa.

À Sandra e Rosana, pelos recursos que deixam nossos trabalhos muito mais apresentáveis e pela amizade.

Aos secretários do departamento de Farmacologia, Wanderley e Gislaine, pela atenção, com que sempre somos recebidos, pela simpatia e dedicação.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Clínica Médica, Ademir, Anastácia, Renata Darci, e Eliane, pela atenção e competência.

A todo departamento de Farmacologia, em especial à Profa. Dra. Mary Luci de S. Queiróz, pela dedicação e compreensão e Prof. Dr. Marcos Dias Fontana, pela competência e bom humor.

À Profa. Dra. Aparecida Barone Teixeira – PUC-Campinas, pela compreensão.

Ao amigo Dieguinho, sua mãe Marinalva e a amiga Lúcia, que durante o andamento do projeto, deram-me lições de estímulo e alegria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Enfim, à todas as crianças com suspeita de infecção pelo HIV-1 e seus familiares, pois sem esses, não seria possível a realização deste trabalho.

A Deus por tudo.

## *SUMÁRIO*

ABREVIACOES.....	i
RESUMO.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico.....	1
1.1.1. A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) .....	1
1.2. AIDS no Brasil.....	1
1.3. Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da Unicamp.....	2
1.4. O vírus da imunodeficiência humana .....	3
1.4.1. Taxonomia viral.....	3
1.4.2. Estrutura viral.....	3
1.4.3. O Genoma do vírus HIV-1.....	6
1.4.4. Ciclo biológico do HIV-1.....	11
1.4.5. Padrões de infecção causados pelo HIV.....	12
1.5. Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção pelo HIV.....	15
1.5.1. Testes para detecção de anticorpos específicos contra o vírus..	15
1.5.1.a. ELISA.....	16
1.5.1.b. Western Blot.....	16
1.5.1.c. Radioimunoprecipitação (RIPA).....	17
1.5.1.d. Imunofluorescência indireta.....	18
1.5.2. Teste de detecção de antígeno viral.....	18
1.5.3. Técnica de cultura viral.....	19

1.5.4. Testes Moleculares.....	19
1.5.4.a. Hibridação de ácidos nucléicos.....	19
1.5.4.a. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
1.6. Diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em crianças nascidas de mães infectadas.....	21
2. OBJETIVOS.....	27
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	28
Critérios de diagnóstico.....	31
3.1. Extração do DNA.....	32
3.1.1. Preparação das amostras.....	32
3.1.2. Lise das hemáceas.....	33
3.1.3. Lise de leucócitos.....	33
3.1.4. Precipitação do DNA.....	34
3.2. Reação de amplificação gênica através da PCR.....	34
3.2.1. “Nested-PCR”.....	35
3.2.2. Detecção do fragmento amplificado pela “Nested PCR”.....	36
3.3. Amplificação gênica pela PCR, para o gene humano da β-Globina.....	37
3.3.1. “Nested-PCR” para o gene da β-globina humano.....	38
3.4. Normas utilizadas para evitar contaminação nas amostras.....	39
3.5. Hibridação.....	40
3.5.1. Protocolo de Hibridação.....	41
3.5.1.a. Marcação da sonda com isótopo radioativo.....	41

3.5.1.b. Preparação da coluna de Sephadex.....	42
3.5.1.c. Preparo do tampão de hibridação.....	42
3.5.1.d. Lavagens.....	43
3.6. Seqüenciamento do DNA alvo amplificado pela “Nested PCR”.....	43
3.6.1. Purificação do produto obtido pela “Nested-PCR”.....	44
3.6.2. Reação de terminação.....	44
3.6.3. Reação do seqüenciamento.....	44
3.6.4. Eletroforese.....	45
3.6.5. Raio- X.....	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Dificuldades durante a padronização e aplicação da Nested-PCR....	48
4.2. Resultados da “Nested-PCR” para o gene humano da $\beta$ -globina....	60
4.3. Análise comparativa dos resultados obtidos pelo método sorológico ELISA e pela “Nested-PCR”.....	62
4.4. Análise do aleitamento materno em relação à transmissão vertical do HIV-1.....	64
4.5. Análise do uso de AZT por parte da gestante, em relação à transmissão vertical do HIV-1.....	66
4.6. Análise conjunta da influência de fatores associados à transmissão perinatal do HIV-1.....	68
4.7. Resultados da Hibridação.....	69
4.8. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados, correspondentes às quatro regiões do HIV-1 selecionadas para o estudo.....	71

5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	86
7. SUMMARY.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
9. APÊNDICE.....	104

*Índice de figuras e tabelas*

<b>Figura 1.</b> Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)..	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Organização genômica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1.....	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema da reação em cadeia da polimerase tipo “Nested” (“Nested-PCR”), para diagnóstico da infecção pelo HIV-1.....	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>gag</i> do HIV-1 (“primers” JA4-JA7), com produto final de 131 pb.	<b>56</b>
<b>Figura 5.</b> Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>env</i> do HIV-1 (“primers” JA9-JA12), com produto final de 341 pb.....	<b>57</b>
<b>Figura 6.</b> Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>env</i> HIV-1 (“primers” JA13-JA16), com produto final de 172 pb.....	<b>58</b>
<b>Figura 7.</b> Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>pol</i> do HIV-1 (“primers” JA17-JA20), com produto final de 129 pb.....	<b>59</b>
<b>Figura 8.</b> Amplificação das regiões gênicas do HIV-1 por “Nested-PCR”, utilizando-se com controle interno, a amplificação de fragmento do gene humano da $\beta$ -globina.....	<b>61</b>
<b>Figura 9.</b> Resultados da Hibridação.....	<b>70</b>
<b>Figura 10.</b> Sequenciamento da região do gene <i>gag</i> do HIV-1, com utilização do “Primer” JA6.....	<b>72</b>

<b>Figura 11.</b> Seqüenciamento da região do gene <i>env</i> do HIV-1, com utilização do “Primer” JA10.....	<b>72</b>
<b>Figura 12.</b> Seqüenciamento da região do gene <i>env</i> do HIV-1, com utilização do “Primer” JA15.....	<b>73</b>
<b>Figura 13.</b> Seqüenciamento da região do gene <i>pol</i> do HIV-1, com utilização do “Primer” JA19.....	<b>73</b>
<b>Tabela 1.</b> Dados pessoais e clínicos das crianças estudadas.....	<b>30</b>
<b>Tabela 2.</b> Seqüência dos nucleotídeos iniciadores ( “primers” ) utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR e “Nested-PCR”) e sua localização no genoma do HIV-1.....	<b>36</b>
<b>Tabela 3.</b> “Primers” que flanqueiam uma região constante do gene da $\beta$ -globina, utilizados como controle interno da reação para a primeira PCR.....	<b>38</b>
<b>Tabela 4.</b> “Primers” que flanqueiam região do gene humano da $\beta$ -globina, utilizados como controle interno de reação para a “Nested-PCR”.....	<b>38</b>
<b>Tabela 5.</b> Sonda que flanqueiam uma região constante do gene <i>gag</i> do HIV-1, utilizada na reação de hibridação.....	<b>40</b>
<b>Tabela 6.</b> Resultados da “Nested-PCR” para detecção do HIV-1 nas crianças estudadas, com suas respectivas idades (em meses) em cada coleta de sangue periférico (1 <sup>ª</sup> , 2 <sup>ª</sup> , 3 <sup>ª</sup> e 4 <sup>ª</sup> coletas).....	<b>50</b>

<b>Tabela 6.a.</b> Resultados das ampliações gênicas por meio da “Nested-PCR” dos genes <i>gag</i> , <i>env</i> (2 regiões) e <i>pol</i> do HIV-1, para a 1ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.....	<b>51</b>
<b>Tabela 6.b.</b> Resultados das ampliações gênicas através da “Nested-PCR” dos genes <i>gag</i> , <i>env</i> (2 regiões) e <i>pol</i> do HIV-1, para a 2ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.....	<b>52</b>
<b>Tabela 6.c.</b> Resultados das ampliações gênicas através da “Nested-PCR” dos genes <i>gag</i> , <i>env</i> (2 regiões) e <i>pol</i> do HIV-1, para a 3ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.....	<b>53</b>
<b>Tabela 6.d.</b> Resultados das ampliações gênicas através da “Nested-PCR” dos genes <i>gag</i> , <i>env</i> (2 regiões) e <i>pol</i> do HIV-1, para a 4ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.....	<b>54</b>
<b>Tabela 7.a.</b> Comparação de resultados do ELISA com a “Nested-PCR”, para detecção do HIV-1, na 1ª coleta de sangue periférico das crianças estudadas.....	<b>62</b>
<b>Tabela 7.b.</b> Comparação de resultados do ELISA com a “Nested-PCR”, para detecção do HIV-1, na 2ª coleta de sangue periférico das crianças estudadas.....	<b>63</b>
<b>Tabela 7.c.</b> Comparação de resultados do ELISA com a “Nested-PCR”, para detecção do HIV-1, na 3ª coleta de sangue periférico das crianças estudadas.....	<b>63</b>
<b>Tabela 8.a.</b> Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao aleitamento materno pela mãe infectada, para 1ª coleta de sangue periférico.....	<b>64</b>
<b>Tabela 8.b.</b> Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao aleitamento materno pela mãe infectada, para 2ª coleta de sangue periférico.....	<b>65</b>

<b>Tabela 8.c.</b> Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao aleitamento materno pela mãe infectada, para 3 <sup>a</sup> coleta de sangue periférico.....	<b>65</b>
<b>Tabela 9.a.</b> Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao uso ou não de AZT pela gestante infectada, para 1 <sup>a</sup> coleta de sangue periférico.....	<b>66</b>
<b>Tabela 9.b.</b> Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao uso ou não de AZT pela gestante infectada, para 2 <sup>a</sup> coleta de sangue periférico.....	<b>67</b>
<b>Tabela 9.c.</b> Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao uso ou não de AZT pela gestante infectada, para 3 <sup>a</sup> coleta de sangue periférico.....	<b>67</b>
<b>Tabela 10.a.</b> Resultados do índice de transmissão vertical, para as crianças cujas mães seguiram as medidas indicadas para se reduzir o risco de infecção vertical.....	<b>68</b>
<b>Tabela 10.b.</b> Resultados do índice de transmissão vertical, para as crianças cujas mães não seguiram as medidas indicadas para se reduzir o risco de infecção vertical.....	<b>68</b>
<b>Tabela 11.</b> Resultado da hibridação com a sonda SK38 e comparação com os obtidos pela “Nested-PCR” com o par de “primers” JA4-JA7, para os pacientes 1, 6, 13, 17, 20, 33.....	<b>69</b>

## *ABREVIACÕES*

<b>HIV-1</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>MRNA</b>	RNA mensageiro
<b>Gp</b>	Glicoproteína
<b>p24</b>	Proteína de peso molecular de 24 kilodaltons
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G
<b>DNTP</b>	Desoxinucleotídeos trifosfato
<b>MgCL<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>KCL</b>	Cloreto de potássio
<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>NaCL</b>	Cloreto de sódio
<b>TEB</b>	Tampão de tris (hidrometil) aminometano, EDTA e ácido bórico
<b>TNE</b>	Tampão salino de tris (hidroximetil) aminometano e EDTA
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>SSPE</b>	Tampão salino de fosfato de sódio e EDTA
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sódio
<b>Kda</b>	Kilodaltons
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>kb</b>	Kilobases
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ml</b>	Mililitros
<b>µl</b>	Microlitros
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água destilada deionizada e estéril
<b>U</b>	Unidade
<b>[<math>\gamma</math><sup>32</sup>P] ATP</b>	Adenosina trifosfato conjugado com fósforo 32
<b>[<math>\alpha</math><sup>33</sup>P] ddATP</b>	Dideoxi adenosina trifosfato conjugado com fósforo 33

**XXX**

***RESUMO***

## RESUMO

O diagnóstico da infecção pelo HIV é usualmente estabelecido por ensaios sorológicos, que identificam anticorpos específicos contra o HIV. Entretanto, o recém-nato pode receber os anticorpos maternos da classe IgG, durante a gestação, no momento do parto, ou após o nascimento e com isso apresentar resultados falsos-positivos até cerca de 18 meses de vida. Há vários outros métodos para o diagnóstico do HIV-1 em crianças, mas o que está sendo indicado atualmente é a reação em cadeia da polimerase (PCR), por ser um método rápido, de alta sensibilidade e especificidade, que podem ser potencializadas com a realização de uma segunda reação de amplificação ("Nested-PCR"). A PCR detecta fragmentos-alvo do genoma viral.

Com base na necessidade de um diagnóstico precoce do HIV-1, o presente trabalho teve como objetivo a padronização da técnica da "Nested-PCR", com utilização de "primers" que flanqueiam 4 regiões virais conservadas do HIV-1 (genes *gag*, *env* – 2 regiões e *pol*), para detecção do HIV-1, e aplicação do método em 41 crianças (com no mínimo 2 e no máximo 4 coletas de amostragem de sangue periférico) em seguimento no Hospital de Clínicas da UNICAMP, com suspeita de infecção. Os dados permitiram um estudo comparativo entre o diagnóstico feito pela "Nested-PCR" com os resultados obtidos pelo método sorológico imunoenzimático - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), apesar das crianças apresentarem idade inferior a 18 meses, não tendo portanto o ELISA como teste padrão-ouro.

Com base nos resultados da "Nested-PCR" foi calculada uma proporção de crianças infectadas pelo HIV que estão em seguimento no ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica e que foram incluídas neste trabalho. Foi analisado também, a influência do uso da zidovudina (AZT), do tipo de parto (cesarea ou normal) e do aleitamento materno, já que esses fatores são influentes para o aumento da transmissão perinatal do HIV-1.

Os resultados positivos obtidos pela "Nested-PCR" para a 1ª coleta de sangue periférico das crianças em estudo foi de 26,32%; para a 2ª coleta, manteve-se o mesmo valor, e para a 3ª coleta, 26,67%. Os resultados positivos pelo ELISA, para as 1ª, 2ª e 3ª coletas foram respectivamente 86,84%; 78,95% e 56,67%.

A proporção de crianças infectadas pelo HIV na população estudada foi de 29,3%. A análise da relação do uso profilático do AZT no período gestacional

apresentou um “p”, (obtido pelo teste de Fisher), de 0,05 para as 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> coletas e 0,014 para a 3<sup>a</sup> coleta; esses resultados sugerem que houve significância entre o uso do AZT (por parte materna) e a redução da transmissão vertical do HIV-1. Em relação ao aleitamento materno, os valores de “p” foram: 0,006 (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> coletas) e 0,016 (3<sup>a</sup> coleta) sugerindo também, associação com a redução da transmissão vertical do HIV-1, nesta população. A análise das crianças as quais as mães fizeram uso dos fatores associados à redução da infecção pelo HIV via perinatal (uso do AZT durante a gestação; parto do tipo cesarea e não aleitamento materno) mostrou um percentual de 20% de positividade à infecção pelo HIV-1 pela “Nested-PCR”; já nas crianças nascidas de mães que não fizeram uso de tais fatores, esse percentual elevou-se para 75%.

Os resultados obtidos pela “Nested-PCR” foram confirmados em algumas amostras, através da hibridação e do método de sequenciamento direto de seqüências gênicas do HIV-1.

Os resultados obtidos neste estudo sugeriram que a “Nested-PCR” foi um método rápido e precoce para o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 via perinatal.

A utilização dos fatores associados à redução da infecção pelo HIV via perinatal indicadas às gestantes infectadas sugeriram influência na redução da transmissão perinatal do vírus na população estudada.

XXX

## *INTRODUÇÃO*

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Histórico**

#### **1.1.1. A Síndrome da imunodeficiência Adquirida (AIDS)**

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi descrita pela primeira vez em 1981, nos Estados Unidos, entre os classificados como ‘grupos de risco’ que correspondem a homossexuais, bissexuais masculinos, hemofílicos, usuários de drogas endovenosas e politransfundidos (GALLO & MONTAGNIER, 1988; SCHLEUPNER, 1988; CLEWLEY, 1989; LIFSON *et al.*, 1990; RUBINI, 1995; GALEL, LIFSON, ENGLEMAN, 1995). Entretanto, é atualmente observada na população infantil com um aumento progressivo no número de casos (COWAN *et al.*, 1984; CURRAN *et al.*, 1988).

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GREENE, 1991), sendo que, até o momento, são conhecidos dois tipos de vírus, o HIV-1 e o HIV-2 (POLLET *et al.*, 1991); porém, a maior parte dos casos de infecção em todo o mundo tem como principal causador o HIV-1. A infecção pelo HIV-2 evolui com menor morbidade e mortalidade (MORGAN *et al.*, 1990).

### **1.2. AIDS no Brasil**

Os primeiros dois casos de AIDS do Brasil foram publicados em 1982 e eram referentes a pacientes da Região Sudeste (SABINO *et al.*, 1996).

A cidade de São Paulo foi, provavelmente, o epicentro do início da epidemia causada pelo HIV no Brasil. Até novembro de 1995, 29,4% do número total de casos reportados

no país pertencia à cidade de São Paulo (SABINO *et al.*, 1996). De acordo com dados oficiais atuais divulgados pela Secretaria do Estado de São Paulo (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO S.P., 1998), foram notificados até maio de 1998, 53514 casos de AIDS no sexo masculino e 14786 no sexo feminino, resultando em 68300 casos, sendo que entre esse total, 11903 casos (2,8%) foram classificados tendo a transmissão perinatal como via de contaminação. Dos casos notificados para indivíduos menores de 13 anos, as vias de contaminação sexual, sanguínea, perinatal e, em investigação corresponderam respectivamente, a 0,17%, 9,53%, 82,78% e 7,53% dos casos (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO S.P., 1998).

### **1.3. Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da Unicamp**

O ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas atendeu 303 crianças com suspeita de infecção pelo HIV-1 via perinatal de 1989 até junho de 1998. Destas, 114 estão atualmente em seguimento no ambulatório, havendo 58 confirmadamente infectadas pelo vírus e 56 ainda a esclarecer diagnóstico.

A via de contaminação pelo HIV-1 predominante entre as 303 crianças, foi a transmissão vertical, observada em 83,3% dos casos.

## **1.4. O vírus da imunodeficiência humana**

### **1.4.1. Taxonomia viral:**

O vírus da Imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) foi isolado em 1983 e inicialmente, foi chamado de vírus associado-linfadenopático (LAV) pelo grupo de Montaignier, já que foi primeiramente isolado de um paciente com síndrome linfadenopática. Foi mais completamente caracterizado em 1984, recebendo a denominação de vírus T – linfotrópico tipo III; e posteriormente, foi chamado de retrovírus associado-AIDS, ou ARV (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

O HIV (vírus da imunodeficiência humana) pertence à família Retroviridae (VARMUS, 1988). Trata-se de um lentivírus, uma subfamília dos retrovírus que causam infecção crônica e doença em animais, mas não neoplasia. Apresentam a enzima transcriptase reversa, que copia o ácido ribonucleico viral (RNA) em ácido desoxirribonucleico (DNA), o qual é inserido posteriormente no genoma da célula hospedeira (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

### **1.4.2. Estrutura viral:**

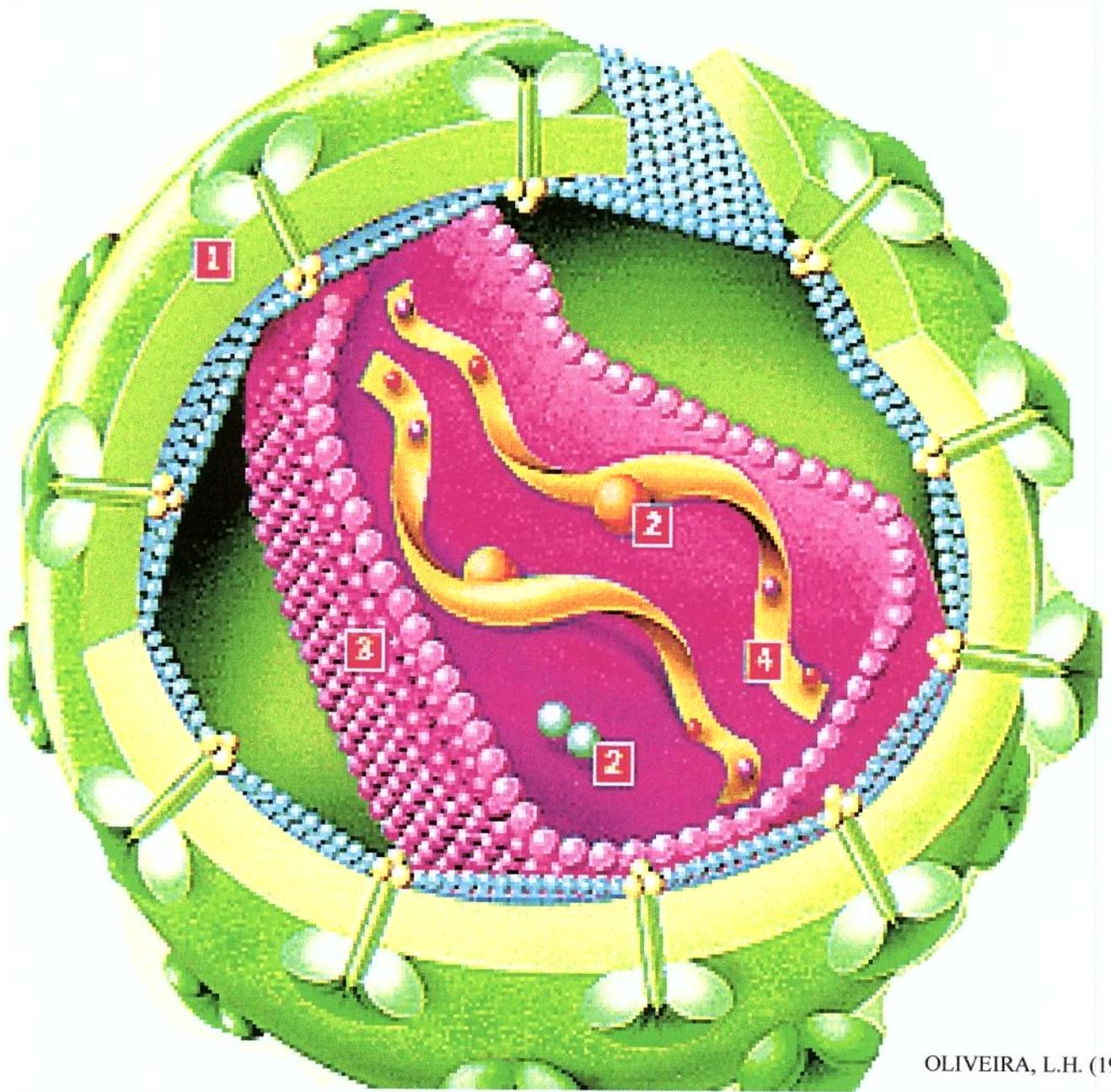
O HIV é um vírus de formato esférico, com aproximadamente 10nm de diâmetro, que consiste em uma membrana lipídica ou envelope, que circunda o nucleocapsídeo viral de formato cônico (LUCIW, 1996). A proteína da membrana externa (envelope) do HIV (gp120) está ligada ao vírus pela glicoproteína da transmembrana (gp41). A glicoproteína 120 liga-se à proteína CD4, que é o receptor da superfície da célula alvo para o vírus (ANTONI, STEIN, RABSON, 1994); (Figura 1).

As regiões das duas glicoproteínas, particularmente a gp 120, são capazes de apresentar ampla variação, originando as diferentes cepas de HIV, as quais aumentam em número com o avanço da infecção, tornando-se assim, o maior problema para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o vírus (PLANTIER *et al.*, 1998).

Dentro do envelope viral, o núcleo com forma de cone dos HIV-1/HIV-2 consiste da proteína p24, que possui formato cônico, e envolve o RNA diplóide genômico do vírus. A proteína da matriz p17, cobre o capsídeo viral e a p7 está associada ao RNA genômico viral. As proteínas p24 (kDa), p17 (kDa), p7 (kDa) são originadas de uma proteína de 55 kDa e formam as proteínas do nucleocapsídeo (ANTONI *et al.*, 1994); (Figura 1).

A integrase, a RNase (LUCIW, 1996) e a protease (99 aminoácidos) são partes da transcriptase reversa pois, trata-se de um complexo protéico, pertencente ao gene *pol* do HIV e são necessárias para a replicação viral, estando localizadas no interior do nucleocapsídeo (ANTONI *et al.*, 1994); (Figura 1).

Os genes *gag*, *pol* e *env* são comuns a todos os retrovírus (ROSEN & PAVLAKIS, 1990). Os genes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* e *vpr* regulam a replicação do HIV através da produção de suas proteínas características (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).



OLIVEIRA, L.H. (1996).

**Figura 1.** Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)

1. Envelope protéico viral, composto por bicamada lipídica, onde estão as glicoproteínas virais gp120 (mais externa) e gp41 (liga a gp120 ao vírus).
2. Enzimas pertencentes ao gene *pol* do HIV-1, essenciais à replicação viral (transcriptase reversa e protease).
3. Capsídeo viral, composto pela proteína p24. Envolvendo a p24, está a Matriz p17 (em azul).
4. Material gênico do HIV, composto por dupla fita de RNA.

### 1.4.3. O genoma do vírus HIV-1

O DNA genômico do HIV apresenta uma estrutura de aproximadamente 9.7 kb (ANTONI *et al.*, 1994).

O HIV é composto por genes regulatórios (*nef, tat, rev, vpr, vpu, vif, vpx*), estruturais (*gag, env*) que codificam enzimas (transcriptase reversa), sendo este o gene *pol* (GALVÃO-CASTRO, JR, BONGERTZ, 1994).

Genes regulatórios:

- Gene *tat*: Apresenta uma seqüência de 16 - Kilodaltons (kDa) (Figura 2); codifica uma proteína de 86 aminoácidos (ROSEN & PAVLAKIS, 1990), com função essencial para a replicação do HIV-1. Possui localização nuclear e é um potente trans-ativador da expressão das extremidades LTR do HIV (ANTONI *et al.*, 1994).

A proteína do gene *tat* acelera a produção de partículas virais (HANSELTINE, 1989).

- Gene *rev*: Trata-se do segundo trans-ativador da expressão viral. Possui uma seqüência de 19-kDa e codifica uma proteína de 116 aminoácidos (ROSEN & PAVLAKIS, 1990) (Figura 2); a proteína apresenta localização nuclear, como a do gene *tat*. Essa proteína, produzida pelo gene *rev*, está ligada ao ciclo de replicação e de produção de todas as partículas virais. O resultado final da expressão do gene *rev* é a produção de altos níveis de proteínas estruturais do HIV (ANTONI *et al.*, 1994).

- Gene *nef*: A proteína de localização citoplasmática, codificada pelo gene *nef*, possui entre 25-27 kDa, (Figura 2). Anticorpos contra a proteína do gene *nef* são encontrados em pacientes com AIDS, logo após o início da infecção (ANTONI *et al.*, 1994).

A função do gene *nef* tem sido controversa; pois às vezes atua indiretamente para reduzir a transcrição do terminal longo do HIV-1; em outros casos, atua aumentando a

expressão gênica do HIV-1; e, em algumas situações, demonstrou estimular a habilidade do vírus em infectar uma variedade de células (COFFIN, 1990).

- Gene *vif* ("viral infective factor"): A proteína codificada pelo gene *vif* possui 23-27kDa (Figura 2), e está relacionada à replicação do HIV (LUCIW, 1996).

O gene *vif* parece capacitar eficientemente o virion a infectar células livres e também permite a esses, infectar mais eficientemente através do contato célula / célula, *in vitro* (ANTONI *et al.*, 1994), ou seja é responsável pelo aumento da infectividade viral fora da célula. (HÖGLUND *et al.*, 1994).

- Gene *vpr*: A proteína codificada pelo gene *vpr* apresenta, aproximadamente, 15 kDa, (LUCIW, 1996) (Figura 2); e está presente nas partículas do virion, facilitando o transporte do DNA do HIV, dentro do núcleo da célula e regulando o ciclo celular.

- Gene *vpu*: O gene *vpu* codifica uma proteína de aproximadamente 16-kDa (LUCIW, 1996) (Figura 2). O produto do gene *vpu* parece ter como função, a maturação e liberação do virion (ANTONI *et al.*, 1994).

-Gene *vpx*: O gene *vpx* codifica uma proteína de aproximadamente 14-16kDa. Este gene é encontrado apenas no vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (HIV-2) (LUCIW, 1996).

#### Genes Estruturais:

-Gene *gag*: (grupo específico de antígeno), região do capsídeo.

As proteínas codificadas pelo gene *gag* formam a estrutura do capsídeo, dentro dos virions envelopados.

A proteína precursora codificada pelo gene *gag* apresenta 55 kDa (p55), sendo esta clivada em etapas que originam fragmentos de 17 kDa (p17), 24kDa (p24), 9kDa (p9) e 7kDa (p7). A p17 ou proteína matrix (MA) (Figura 1) é localizada na superfície interna da membrana do envelope, e parece ser o maior componente da cápsula protéica,

apresentando simetria icosaédrica (ANTONI *et al.*, 1994). A p17 apresenta 130 aminoácidos, e está relacionada ao ciclo de vida viral (LUCIW, 1996).

A proteína p24 ou capsídeo (CA) (Figura 1) é uma partícula nuclear, que apresenta de 24-27kDa e 240 aminoácidos. A p7/p9 pertencem ao nucleocapsídeo viral (NC), apresentam de 7-9kDa e são compostas por 70 aminoácidos (LUCIW, 1996).

- Gene *env*: O gene *env* codifica uma proteína precursora, a gp160, que é clivada, originando duas glicoproteínas, gp41 e gp120. Essa última é a proteína mais externa do HIV, sendo responsável pela interação viral com a molécula de CD4 do linfócito T auxiliador e macrófagos, principais células hospedeiras do HIV; sendo, portanto, responsável pela adsorção do HIV na célula hospedeira (ANTONI *et al.*, 1994).

A gp41 é uma proteína transmembrana, com função de ligar a gp120 ao vírus. Ambas, a gp120 e a gp41 são alvos para anticorpos neutralizadores, que impedem os vírus de penetrarem nas células e replicarem-se dentro delas, muitas vezes prevenindo a ligação à proteína CD4 (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

O gene do envelope é o mais variável, enquanto que os genes *gag* e *pol*, são mais conservados. A variação do *env* ocorre com mais frequência em algumas regiões. Com base nessa segregação de variação, a gp120 é dividida em regiões constantes ( c ) e variáveis ( v ), conhecidas como domínios. É no terceiro domínio variável ( V3 ), que existe a maior diversidade de sequência dos nucleotídeos, chamada de alça V3 (GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1994).

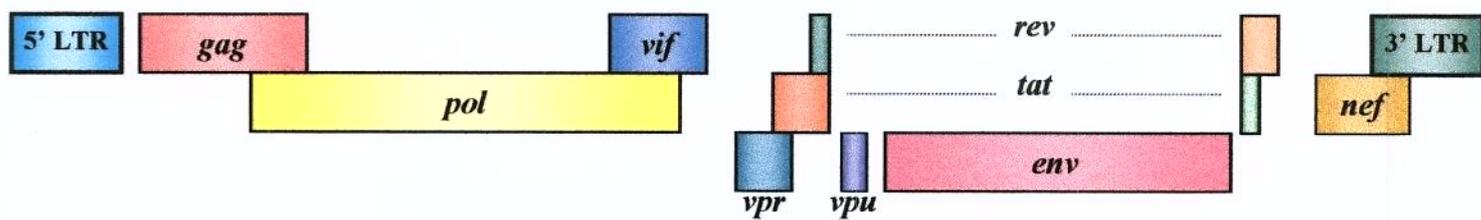
- Gene *pol*: Os produtos do gene *pol* são a integrase, a RNase e protease, partes da transcriptase reversa (ANTONI *et al.*, 1994).

A transcriptase reversa (51-66kDa) traduz o RNA viral em DNA, logo após a entrada do HIV na célula, para, posteriormente, esse DNA ser inserido nos cromossomos da célula hospedeira. Já a integrase (31kDa), integra o DNA viral ao

genoma da célula hospedeira; e a RNase degrada a fita de RNA viral, quando, num momento da replicação, há uma fita de DNA e uma de RNA; isso é realizado, a fim de deixar presente apenas a fita de DNA viral, que, posteriormente, terá sua fita complementar (ANTONI *et al.*, 1994).

A protease, apresenta peso molecular de aproximadamente 10 kDa, sendo constituída por 99 aminoácidos. A protease atua especificamente na clivagem dos polipeptídeos precursores das proteínas funcionalmente ativas, dos genes *gag* e *pol* do HIV-1 (LUCIW, 1996).

-Regiões LTR: “Long terminal repeats”. Trata-se das duas extremidades do código genético viral (extremidade inicial e terminal), que são idênticas, ou seja repetidas (GALLO, 1991). Funciona como um promotor/ ”enhancer”, para os genes do HIV; interage com as proteínas celulares que modulam a replicação viral. (CUNNINGHAM, 1996).



(LUCIW, 1996.)

**Figura 2.** Organização genômica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo1(HIV-1).

*gag* e *env*: genes estruturais do HIV-1

*pol*: gene codificador do complexo protéico da transcriptase reversa (integrase, protease e RNase):

*vif*, *vpr*, *rev*, *tat*, *vpu*, *nef*: genes regulatórios do HIV-1

LTR: extremidades inicial e final do genoma do HIV-1, que é constituído por seqüências longas repetidas.

#### 1.4.4. Ciclo biológico do HIV-1

O HIV infecta uma grande variedade de tipos de células. Assim como as células T, o HIV pode infectar uma ampla variedade de células que expressam a molécula protéica CD4, especialmente os monócitos e os macrófagos, incluindo as células microgliais especializadas do cérebro e as células Hofbauer da placenta, ou células dendríticas (incluindo as células dendríticas foliculares, encontradas nos nódulos linfáticos e nas células de Langerhans na pele), infecta também células T (auxiliares-indutoras) CD4 positivas. Os principais reservatórios do HIV nos pacientes assintomáticos, são os nódulos linfáticos, onde o vírus, em abundância, é encontrado aderido às células dendríticas foliculares. Os monócitos e linfócitos infectados provavelmente espalham o vírus pelo corpo e o HIV pode entrar no cérebro, via monócitos ou através de infecção nas células endoteliais (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

As células microgliais, os macrófagos no cérebro, os macrófagos progenitores na medula óssea e as células e macrófagos, no intestino, apresentam o receptor CD4 (CASTRO *et al.*, 1988) e são importantes reservatórios do vírus.

Os principais eventos do ciclo de replicação do vírus incluem entrada; síntese e integração do DNA viral; expressão deste DNA como RNA e proteínas virais e a congregação e saída do vírus (COFFIN, 1990).

A junção do HIV-1 à célula hospedeira é mediada por uma interação entre a glicoproteína gp120 do gene *env* do HIV-1 com a molécula protéica de 55 Kda, denominada CD4, que é encontrada na membrana plasmática dos linfócitos T auxiliares e macrófagos, e funciona como receptor à entrada do HIV-1 na célula. Essa entrada do vírus na célula hospedeira ocorre pela fusão da partícula viral com a membrana celular, através de processos que independem de pH (LUCIW, 1996). Após a

entrada do vírus na célula CD4 positiva, o HIV-1 pode estabelecer uma latência que seria explicada pela luta do sistema imunológico humano contra bilhões de vírus produzidos todos os dias ou então, uma persistente forma de infecção (GREENE, 1991). Posteriormente à ligação e penetração do vírus na célula, o capsídeo viral desintegra-se parcialmente e a etapa seguinte do ciclo envolve a ação da enzima transcriptase reversa, que converte o RNA viral dimérico, em DNA linear fita dupla. Para essa etapa de replicação são necessários: (a) 2 cópias do RNA genômico do HIV-1, para a partir dessas, ser formada a fita de DNA; (b) o “primer” tRNA do hospedeiro, para iniciar a transcrição; (c) atividade das proteínas transcriptase reversa para transcreever o RNA viral em DNA e a RNase que degrada o RNA do vírus pós -transcrição. Após a entrada no núcleo da célula, o DNA proviral é inserido ao genoma da célula hospede pela enzima viral integrase (LUCIW, 1996). Após a integração do código genético viral ao DNA da célula infectada, o provirus é transcrito em cópias de RNA, que são ou incorporadas em novas partículas do vírus como genoma, ou funciona como RNA mensageiro (mRNA); sendo traduzidos em proteínas virais regulatórias, estruturais e enzimáticas. A partir daí, a partícula viral brota através da membrana da célula hospedeira, para infectar outras células CD4 positivas. Ao irromperem da célula infectada, os vírus recém-formados estão envoltos por um envelope proteico que é similar ao da membrana celular humana (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

#### **1.4.5. Padrões de infecção causados pelo HIV**

Padrões de infecção são definidos desde o contato do hospedeiro com o vírus, até a fase final da doença causada pelo HIV-1.

### **Primeiro Padrão**

Nesse padrão de infecção ocorre a replicação viral intensa entre 3 a 6 semanas após exposição (PANTALEO, GRAZIOSI, FAUCI, 1993). São encontrados vírus infecciosos e proteínas virais no sangue e no fluido cerebrospinal; sendo que o nível de RNA do HIV-1 é elevada-se rapidamente após a contaminação para decair logo em seguida (SCHACKER *et al.*, 1998). Esse declive ocorre, também, em relação à quantidade de vírus circulante, quando aumenta a concentração de anticorpos contra o vírus, pois ocorre um estímulo das reações imunológicas celulares e humorais, necessárias ao combate à infecção viral (FRENCH *et al.*, 1996). Anticorpos contra as proteínas virais aumentam para níveis muito altos, em aproximadamente seis semanas e permanecem elevados durante toda a infecção (HANSELTINE, 1989). Há um período assintomático prolongado, denominado 'Latência Clínica' (PANTALEO *et al.*, 1993), que pode levar cerca de 10-11 anos (MELLORS *et al.*, 1996). Nessa fase somente níveis muito baixos de vírus circulante estão presentes, apesar de saber-se atualmente que o vírus não fica em latência e sim produz cerca de 10 bilhões de partículas virais diariamente, sendo parte dessas, eliminadas pelo sistema imunológico; porém, a concentração do vírus no soro gradativamente aumenta e o indivíduo infectado torna-se sintomático. Os altos níveis de anticorpos, observados durante o período assintomático longo e latente, provavelmente representam uma reestimulação contínua da resposta imunológica (HANSELTINE, 1989).

### **Segundo Padrão**

Nesse padrão de infecção, que é bastante raro, um estado inicial soropositivo é acompanhado pela perda de anticorpos antivirais, como determinado pelos métodos de ELISA e Western blot. A informação genética do HIV-1, na forma de DNA proviral

está presente nos linfócitos circulantes e pode ser detectada pela reação em cadeia da polimerase. Nesses casos, a perda de anticorpos antivirais, provavelmente reflete a suspensão, ou pelo menos uma restrição grave, na produção ou liberação do vírus (HANSELTINE, 1989).

### **Terceiro Padrão**

Nesse padrão, há uma infecção prolongada com baixa formação de anticorpos antivirais. Esse padrão implica que, ou a infecção sistêmica pelo HIV-1 pode ser estabelecida sem estimular o sistema imune ou a perda de anticorpos antivirais pode ocorrer após uma produção transitória tanto do vírus como dos anticorpos antivirais (HANSELTINE, 1989). Esta fase é caracterizada pelo início da doença aparente, (GOUDSMIT *et al.*, 1987), em que surgem as manifestações clínicas da AIDS (EMINI, 1995). Após o aparecimento dos sintomas, a doença desenvolve-se rapidamente, podendo, em curto prazo, levar o indivíduo à morte.

Desde 1989, estudos têm consistentemente mostrado que pacientes em estágios avançados da infecção pelo HIV-1 apresentam altas concentrações de vírus no sangue. (HO, 1996).

A imunopatogênese da AIDS não é completamente entendida. A infecção com o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) leva a múltiplos defeitos imunológicos, causando, predominantemente, imunossupressão no hospedeiro infectado, através da depleção dos linfócitos CD4 positivos. (DONATELLA *et al.*, 1998). A diminuição desses linfócitos CD4 positivos, para valores inferiores a 200 por mm<sup>3</sup> (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1992) caracteriza a fase terminal da doença.

## **1.5. Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção pelo HIV**

Os testes para detecção da infecção pelo HIV podem ser divididos basicamente em quatro grupos:

Testes de detecção de anticorpos;

Testes de detecção de antígenos virais;

Técnicas de cultura viral;

Testes moleculares.

### **1.5.1. Testes para detecção de anticorpos específicos contra o vírus**

O desenvolvimento de testes sensíveis e específicos para a detecção dos anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) tem progredido rapidamente, após o retrovírus ter sido identificado como sendo o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

As técnicas para diagnóstico do HIV, por métodos de detecção de anticorpos contra o vírus, foram introduzidas nos Estados Unidos em 1985, (JOSEPHSON *et al.*, 1989) quando foram licenciadas pela Food and Drug Administration - FDA, primeiramente para triagem de doadores de sangue. (LACKRITZ *et al.*, 1995).

Os testes que pesquisam anticorpos contra o HIV podem ser aplicados entre 4 a 6 semanas após a exposição ao vírus, tempo em que começam a ser encontrados anticorpos circulantes.

Rotineiramente, os testes mais utilizados para detecção de anticorpos contra antígenos virais do HIV-1 são o método sorológico imunoenzimático, ELISA e como teste confirmatório, o Western Blot; porém, vários outros testes, porém estão

disponíveis, entre eles, a radioimunoprecipitação; imunofluorescência indireta; que têm sido desenvolvidos para estudos de campo e triagens de grandes populações, já que são testes rápidos (KIFFER *et al.*, 1995).

#### **1.5.1.a. ELISA**

Trata-se de um teste imunoenzimático, sendo este método sorológico o mais amplamente utilizado para detecção de anticorpos contra o HIV-1 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1989).

Neste teste, os antígenos virais recombinantes ou sintéticos (testes de última geração) são colocados em contato com o soro do paciente, em cavidades existentes em placas de plástico (HUSSON, COMEAU, HOFF, 1990). Se o soro possuir anticorpos específicos contra o HIV, haverá formação do complexo antígeno/anticorpo. Tal fenômeno pode ser verificado com a adição de uma anti-imunoglobulina humana conjugada a uma enzima, como por exemplo, a peroxidase (KIFFER *et al.*, 1995). Num teste com resultado positivo ocorre uma reação corada ao se adicionar o substrato específico para a enzima. Esta técnica é muito utilizada como teste inicial para detecção de anticorpos contra o vírus, e apresenta sensibilidade e especificidade, atingindo aproximadamente 98% (HUSSON *et al.*, 1990), sendo que essas irão variar entre os vários kits, laboratórios e populações testadas. (FALLON *et al.*, 1989).

#### **1.5.1.b. Western Blot**

O Western Blot é o teste mais frequentemente usado para confirmar a presença de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2)

em amostras de soro (CHIANG *et al.*, 1989; KÄMMERER, BÜRGISSER, FREI, 1995; SAYRE *et al.*, 1996). Este ensaio envolve, inicialmente, a separação das proteínas virais por eletroforese em gel de poliacrilamida, que separa os antígenos virais, de acordo com seus respectivos tamanhos; com as proteínas menores migrando mais facilmente e aparecendo portanto, na parte inferior do gel (HUSSON *et al.*, 1990). Em seguida, dá-se a transferência eletroforética dos antígenos para uma membrana de nitrocelulose (KIFFER *et al.*, 1995). Atualmente, essa etapa já não é necessária, pois a maioria dos “kits” já apresentam o antígeno transferido na fita de nitrocelulose. Num terceiro momento, a membrana é bloqueada com proteínas que são adsorvidas por sítios não ocupados pelos antígenos. Posteriormente, a membrana é colocada em contato com o soro que se deseja pesquisar. As reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio da reação com anti-imunoglobulina humana, conjugada com um radioisótopo ou uma enzima. A revelação é feita por auto-radiografia ou por substrato cromogênico. Apresenta alta sensibilidade e especificidade (KIFFER *et al.*, 1995).

#### **1.5.1.c. Radioimunoprecipitação (RIPA)**

A detecção dos anticorpos, através deste método, decorre de reações com antígenos radioativos. Esses antígenos são obtidos de células infectadas, mantidas na presença de radioisótopos durante a síntese de proteínas virais, ou seja, a replicação das células ocorre em presença de aminoácidos marcados radioativamente; tais aminoácidos são incorporados na proteína viral durante a replicação. Precipitados, formados da reação desses antígenos com anticorpos específicos são sedimentados, dissociados com detergentes e depois analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Segue-se a

auto-radiografia. (KIFFER *et al.*, 1995) Em alguns locais é uma técnica bastante utilizada para confirmação de diagnóstico.

#### **1.5.1.d. Imunofluorescência indireta**

Em lâminas de microscópio, as células infectadas pelo HIV são incubadas com o soro a ser testado. Em etapa seguinte, tais células são tratadas com o soro que contenha anticorpos específicos para imunoglobulina humana (anti-Ig) conjugados a um fluorocromo. A presença dos anticorpos é revelada por meio de microscopia de fluorescência. Também utilizada amplamente em alguns serviços como teste inicial (KIFFER *et al.*, 1995).

#### **1.5.2. Teste de detecção de antígeno viral**

Ensaio imunoenzimático, para detecção do antígeno viral nuclear p24, é comumente utilizado para diagnóstico da infecção pelo HIV (HUSSON *et al.*, 1990).

A pesquisa de antígeno p24 quantifica a proteína viral presente no plasma ou no sobrenadante de cultura de tecido (KIFFER *et al.*, 1995). Embora esta proteína esteja presente no plasma de pacientes, em todos os estágios da infecção pelo HIV, sua maior prevalência ocorre antes da soroconversão, ou seja, na fase inicial da infecção (STRATHDEE *et al.*, 1995) e na fase final da doença.

Esse método no plasma, apresenta uma sensibilidade de 18% no diagnóstico do HIV, durante o período neonatal (ZÖLLNER *et al.*, 1996).

### **1.5.3. Técnica de cultura viral**

A técnica da cultura celular é usada para detecção do vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) em células do sangue periférico e plasma de indivíduos com anticorpos para o vírus (CASTRO *et al.*, 1988).

Trata-se de uma técnica bastante sensível para detecção da infecção pelo HIV, porém, não é utilizada rotineiramente para diagnóstico, já que envolve dificuldades técnicas, exige condições laboratoriais especiais de segurança, não disponíveis na maioria dos serviços (EDWARDS *et al.*, 1989; KELLOGG *et al.*, 1990) e por consumir muito tempo para resultados confiáveis, levando em média de 3 a 4 semanas para se evidenciar o crescimento do vírus (DORENBAUM *et al.*, 1997).

No período neonatal, a demonstração direta do HIV por método de cultura viral apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 28-48% (ZÖLLNER *et al.*, 1996).

### **1.5.4. Testes Moleculares**

#### **1.5.4.a. Hibridação de ácidos nucleicos**

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante tornou possível a detecção do HIV-1 em amostras biológicas, por meio de hibridação com sondas específicas. Os métodos de diagnóstico com base na hibridação de DNA apresentam vantagens significativas, destacando-se a precocidade no diagnóstico, a sensibilidade e especificidade (GIRI *et al.*, 1994). Embora represente um grande avanço na metodologia de diagnóstico do HIV-1, essa técnica apresenta inconvenientes, devido à complexidade envolvida na sua realização e à utilização de isótopos radioativos (GIRI *et al.*, 1994). Além disso, para a realização do teste é necessário uma quantidade elevada de partículas virais na amostra a ser testada.

#### 1.5.4.b. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), introduzida em 1985 (SAIKI, *et al.*, 1985), tem como princípio fundamental a amplificação de fragmentos específicos do DNA alvo, escolhido pelo investigador, amplificados através de repetidos ciclos de separação das hélices de DNA, com temperatura variando entre 90°C - 95°C; ligação complementar entre os iniciadores (“primers”) e o DNA, com temperatura de aproximadamente 37°C - 50°C e síntese de DNA pela *Taq* DNA polimerase à temperatura de 67°C – 72°C (CLEWLEY, 1989). A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para outro, o que resulta, em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada no ciclo precedente. Com isso, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos, aumento da ordem de  $10^6$  cópias, partindo-se de uma única célula (COSTA & COSTA, 1992).

Para aumentar ainda mais a especificidade do método, a “Nested-PCR” tem sido aplicada. A técnica consiste numa segunda PCR, com utilização de pares de “primers” internos aos da primeira reação de amplificação (ALBERT & FENYÖ, 1990). As principais vantagens da “Nested-PCR” em relação à hibridação de ácidos nucléicos, refere-se a um menor tempo para realização do teste, sendo a “Nested-PCR” menos complexa e não exigindo a utilização de material radioativo.

A PCR tem sido amplamente utilizada para detectar a infecção pelo HIV-1 (SLAVIK *et al.*, 1995; ZAZZI *et al.*, 1995) que, para fins de diagnóstico, amplificam-se regiões conservadas do vírus, já que o HIV-1 é um patógeno capaz de sofrer consideráveis variações genômicas (ZIEGLER, BLANCHE, LOH, 1996; BARIN *et al.*,

1997), em certas regiões de seu código genético, principalmente na região da alça V3 do gene viral *env* (HALAPI *et al.*, 1997). Essa variabilidade genética do HIV pode influenciar a confiabilidade no resultado da PCR, podendo originar resultados falso-negativos. A concentração dos reagentes, inibidores presentes na amostra a ser testada, erros na amplificação do material, baixa quantidade de cópias do HIV-1 circulantes na amostra (GIRI *et al.*, 1994) podem afetar o resultado da PCR, diminuindo assim sua eficiência como método diagnóstico. Resultados falso-positivos, podem também ocorrer, devido a algum tipo de contaminação, muitas vezes de uma amostra para outra, por aerossol durante a realização do procedimento, por instrumentos e reagentes contaminados.

Para análise das seqüências nucleotídicas do HIV-1 e determinação de seus respectivos subtipos, o método padrão-ouro é o seqüenciamento direto (BARIN *et al.*, 1997), que seqüencia o fragmento de DNA a ser estudado, para com isso ser possível a análise genotípica viral.

#### **1.6. Diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus**

A transmissão perinatal é responsável por praticamente todas as infecções novas pelo HIV em crianças, e responde por 82,78% dos casos de AIDS, notificados até maio de 1998 nos pacientes com idade inferior a 13 anos no Brasil (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, S.P., 1998). A transmissão perinatal pode ocorrer durante qualquer estágio da gestação, sendo porém menos freqüente no primeiro trimestre (OLIVEIRA *et al.*, 1995); durante o parto, através de contato com o sangue materno ou por secreções de mucosa, ou após o nascimento, por aleitamento materno

(NEWELL *et al.*, 1995; LANDESMAN *et al.*, 1996; MACDONALD *et al.*, 1998; WILFERT & MCKINNEY, 1998).

A busca por métodos precoces e específicos, para diagnóstico da infecção pelo HIV em neonatos, tem-se tornado pesquisa prioritária (INDACOCHEA & SCOTT, 1990), já que a infecção pelo HIV tem sido causa muito comum de morte em crianças infectadas pelo HIV-1 (LAURE *et al.*, 1988) de 1 a 4 anos de idade (DORENBAUM *et al.*, 1997) e também, para iniciar-se rapidamente terapia antiviral e tratamento profilático das infecções oportunistas (ROUZIUX, 1996).

Entre os testes mais utilizados no diagnóstico da infecção pelo HIV-1, via perinatal, estão:

O ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que é correntemente utilizado, para detecção de anticorpos específicos contra o HIV-1. Este teste identifica exclusivamente anticorpos contra o vírus; por isso, pode apresentar resultado falso positivo, pela presença das imunoglobulinas da classe G (IgG), que são passivamente ou ativamente transportadas através da mãe para o feto, via placenta (EDWARDS, *et al.*, 1989; MADURAI *et al.*, 1993; KLINE *et al.*, 1993). O transporte da imunoglobulina G, através da placenta, ocorre devido a seu peso molecular baixo, e pela placenta apresentar receptores de IgG. A imunoglobulina da classe G materna pode persistir circulante na criança até aproximadamente os dezoito meses de idade (MOODLEY *et al.*, 1995; KELLOGG & KWOK, 1990). Esse método não diferencia anticorpos produzidos pela mãe e transferidos à criança, dos anticorpos da classe IgG produzidos pelo feto.

O Western Blot é utilizado como teste confirmatório para o ELISA (CARVALHO *et al.*, 1996), e detecta anticorpos da classe IgG.

A pesquisa de anticorpos IgA e IgM anti-HIV é utilizada (STEKETEE *et al.*, 1997), já que estes não atravessam a placenta (HUSSON *et al.*, 1990), com isso, a presença de tais anticorpos no soro pode indicar infecção da criança. Entretanto, as dificuldades com tais anticorpos deve-se à possibilidade de negatividade até os três meses de vida da criança e positividade após os seis meses, fato que não possibilita o uso desta técnica para diagnóstico precoce da infecção viral. Isto ocorre pois o anticorpo IgA não é produzido em quantidade suficiente para ser detectado, durante os primeiros meses de vida; o mesmo ocorrendo com os anticorpos da classe IgM. Os anticorpos das classes IgA e IgM podem ser detectados pelas técnicas de ELISA ou Imunoblot (OLIVEIRA *et al.*, 1995).

A detecção de antígeno p24 pode ser utilizada; entretanto, este teste isoladamente não é indicado para excluir uma infecção pelo HIV ou para diagnosticar infecção em crianças com idade inferior a 1 mês de vida (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1998).

A cultura para HIV é uma técnica sensível para detecção do HIV-1 em crianças com suspeita de infecção, via perinatal, porém, não é usada rotineiramente, por envolver dificuldades técnicas, que exigem condições laboratoriais especiais de segurança (EDWARDS *et al.*, 1989) e, pelo resultado definitivo do teste, levar aproximadamente de 2 a 4 semanas para ser obtido (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido o teste mais promissor no diagnóstico precoce do HIV-1 em crianças com suspeita de infecção via perinatal (DUNN *et al.*, 1995). O início de sua utilização para detecção do HIV-1, em pacientes pediátricos, aconteceu em 1988 (CLEWLEY, 1989).

A PCR permite detecção de infecção pelo HIV antes da soroconversão, possibilitando um diagnóstico precoce em crianças (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Dentre as vantagens de um diagnóstico precoce, pode-se citar: início de uma terapia antiviral precoce; profilaxia de infecções oportunistas; tratamento agressivo de infecções bacterianas; evitar procedimentos desnecessários a pacientes não infectados; reduzir a ansiedade do desconhecimento do diagnóstico e, finalmente, poder mudar a história natural da infecção.

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention, resultados positivos para PCR, em amostras distintas, revelam diagnóstico de infecção pelo HIV (BAKSHI *et al.*, 1995).

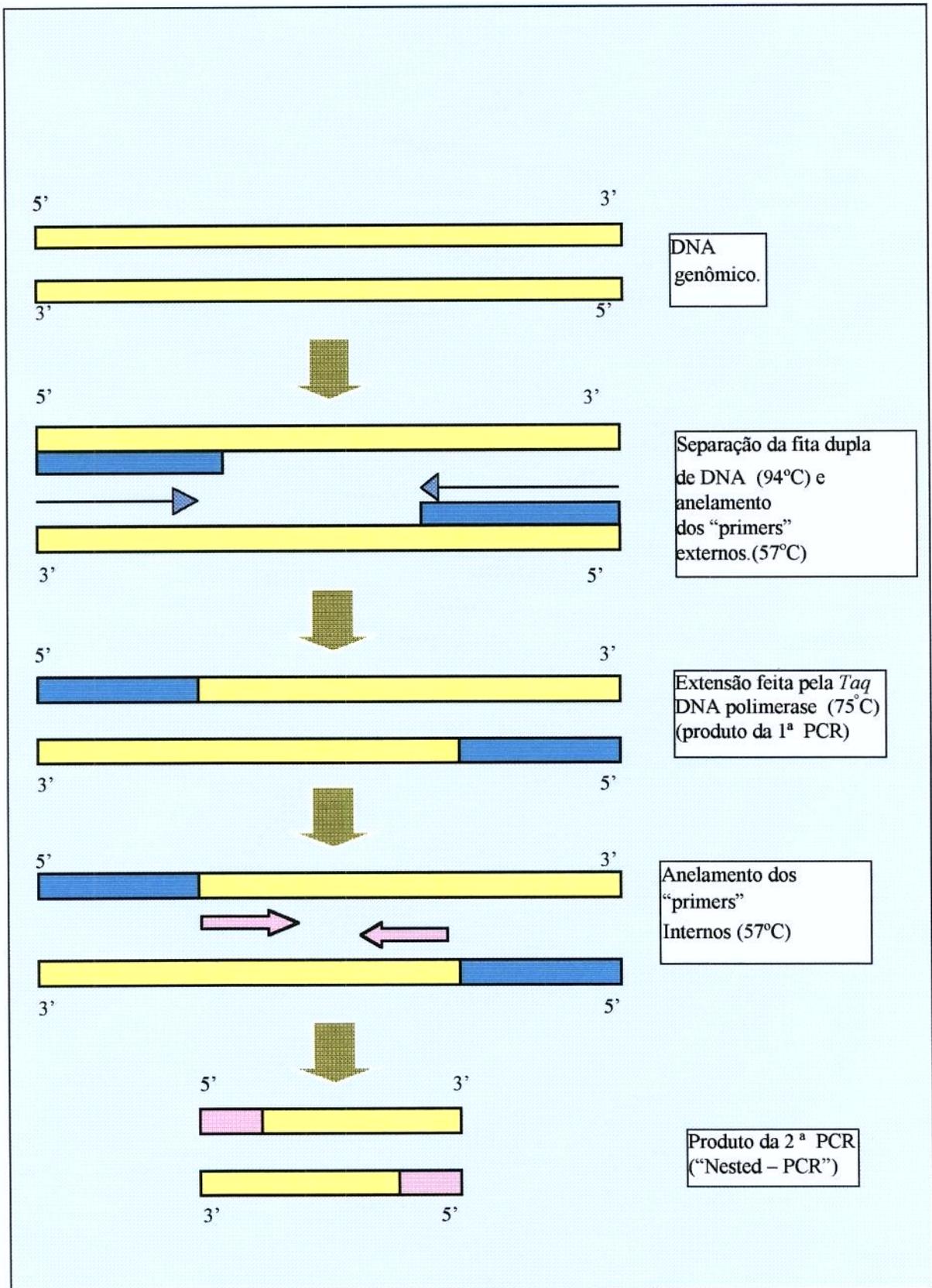
Ensaio que detectam o RNA do HIV no plasma, também são disponíveis para utilização com finalidade de diagnóstico da infecção perinatal e podem ser mais sensíveis que a PCR do DNA viral, para detecção precoce do HIV em crianças com suspeita de infecção. Entretanto, dados em relação à PCR do RNA viral são relativamente mais limitados, quando comparados à PCR do DNA viral para diagnóstico precoce (CENTERS FOR DISEASES CONTROL, 1998).

O HIV pode ser transmitido verticalmente através da mãe infectada, durante a gestação, no momento do parto ou após o nascimento, pelo aleitamento materno (BRYSON, 1996; DOMACHOWSKIE, 1996).

Vários fatores estão associados à redução da transmissão vertical do HIV-1, entre elas, o uso da zidovudina (AZT) durante o período gestacional por parte materna, o parto do tipo cesareo e o não aleitamento materno pela mãe infectada (NEWELL *et al.*, 1996).

Em fevereiro de 1994 o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas revelou a ocorrência de redução na transmissão vertical do HIV-1, através da terapia com zidovudina (AZT) no período que precede o nascimento, seguindo o protocolo ACTG 076, onde a utilização do AZT só pode ser realizada em mães infectadas pelo

HIV com contagem de células CD4+  $\geq$  200 células /  $\mu$ l (MATHESON *et al.*, 1995). A duração do rompimento da membrana torna-se um fator importante na transmissão materno-fetal do HIV-1, revelando assim, a correlação entre a transmissão viral e o tipo, de parto ao qual a mãe infectada é submetida (LANDESMAN *et al.*, 1996). O não aleitamento materno por mãe infectada tem demonstrado redução na transmissão perinatal do HIV-1 (LEROY *et al.*, 1998).



**Figura 3:** Esquema da "Nested-PCR" para detecção do HIV-1

**XXX**

***OBJETIVO***

## **2. OBJETIVO**

- Padronizar a reação em cadeia da polimerase (PCR), tipo “NESTED”, para diagnóstico precoce do HIV-1, em crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus, em seguimento no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

**XXX**

***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### *Casuística*

Foram estudadas 41 crianças, com idade inferior a 18 meses, nascidas de mães infectadas pelo vírus HIV-1, em seguimento no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica, do Hospital de Clínicas da Unicamp, Campinas, SP; no período de maio de 1996 a junho de 1997. A Tabela 1 mostra os dados clínicos das crianças estudadas; tipo de parto (normal ou cesareo), aleitamento materno e uso de AZT, durante a gestação, pela mãe da criança estudada.

O critério de inclusão das crianças, foi realizado com base na idade do paciente; sendo que foram incluídas no estudo as crianças em seguimento no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica da UNICAMP com idade inferior a 18 meses, na 1ª coleta de sangue periférico e excluídas as que ultrapassavam os 18 meses de idade. A criança deveria ser filha de mãe confirmadamente infectada pelo HIV-1.

**Legenda da Tabela 1:** Os dados descritos na Tabela 1 foram obtidos por meio da análise do prontuário médico da criança estudada.

**Coluna 4:** utilização de AZT durante o período gestacional.

**Coluna 5:** AZT (P. Gest.), refere-se a partir de que mês gestacional a mãe iniciou o uso do AZT.

**Coluna 6:** Aleit. Materno, refere-se ao uso de aleitamento materno.

**Coluna 7:** Temp. Aleit. Mat., refere-se ao tempo (em meses), em que a criança recebeu aleitamento materno.

**Coluna 8:** Tipo de parto (Normal ou Cesareo).

**Para as colunas 4, 5, 6, 7 e 8:**

- S. Inf.: quando não foi possível obter a informação por meio da análise do prontuário médico da criança;

Tabela 1. Dados pessoais e clínicos das crianças estudadas.

Crianças	Idade (na 1ª coleta)	Sexo	AZT (Mãe)	AZT (P. Gest.)	Aleit. Materno	Temp. Aleit. Mat.	Parto
1	9 meses	F	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.
2	6 meses	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Normal
3	14 meses	F	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.
4	6 meses	F	Usou	8º mês	Não recebeu	-	Cesareo
5	12 meses	F	Usou	4º mês	Não recebeu	-	Cesareo
6	4 meses	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
7	1 mês	M	Não usou	-	Recebeu	11 meses	Normal
8	2,5 meses	F	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.
9	7 meses	M	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.
10	4 meses	M	Usou	3º mês	Não recebeu	-	Normal
11	10,5 meses	M	Usou	3º mês	Não recebeu	-	Cesareo
12	6 meses	M	Não usou	-	Recebeu	1,5 meses	Cesareo
13	1 mês	F	Não usou	-	Recebeu	4 meses	Normal
14	2 meses	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
15	11 meses	F	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
16	8,5 meses	F	Não usou	-	Não recebeu	-	Normal
17	4,5 meses	F	Usou	6º mês	Não recebeu	-	Normal
18	1 mês	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
19	11 meses	F	Não usou	-	Recebeu	1 mês	S.Inf.
20	12 meses	M	Usou	7º mês	Recebeu	0,2 meses	Cesareo
21	12 meses	F	Usou	3º mês	Não recebeu	-	Normal
22	8,5 meses	M	Usou	8,5º mês	Não recebeu	-	Normal
23	6 meses	M	Usou	6º mês	Não recebeu	-	Normal
24	11 meses	M	Não usou	-	Recebeu	8 meses	Cesareo
25	11 meses	F	Não usou	-	Recebeu	9 meses	Normal
26	2 meses	M	Usou	3º mês	Não recebeu	-	Normal
27	4 meses	M	Usou	6º mês	Não recebeu	-	Normal
28	5,5 meses	F	Não usou	-	Não recebeu	-	Normal
29	1 mês	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Normal
30	6 meses	F	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.	S.Inf.
31	15 meses	M	Não usou	-	Recebeu	3 meses	Cesareo
32	12 meses	F	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
33	1 mês	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
34	13 meses	M	Não usou	-	Recebeu	1 mês	Normal
35	9,5 meses	F	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
36	1,5 meses	F	Usou	5º mês	Não recebeu	-	Cesareo
37	9 meses	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Normal
38	4 meses	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Normal
39	5,5 meses	M	Não usou	-	Não recebeu	-	Cesareo
40	1 mês	F	Usou	3º mês	Não recebeu	-	Normal
41	1 mês	M	Usou	6º mês	Não recebeu	-	Cesareo

## ***Métodos***

Primeiramente foi determinada a presença de anticorpos contra o HIV-1 nas crianças analisadas, através do método sorológico ELISA (ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti HIV-1 e HIV-2, Kit - COBAS® CORE Anti HIV-1/HIV-2 EIA DAGS – Roche), realizado no Laboratório de AIDS do Hospital de Clínicas da Unicamp. Todas as crianças incluídas foram submetidas a esta triagem sorológica. O outro método laboratorial utilizado foi a reação em cadeia da polimerase tipo “Nested” (“Nested-PCR”), a fim de detectar partículas do HIV-1 no sangue.

As amostras de sangue foram obtidas no laboratório de coleta geral do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, por solicitação do Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica da mesma instituição; através de punção venosa em tubos estéreis, contendo (EDTA) como anticoagulante; sendo colhidos 3 a 5 ml de sangue em cada coleta

Coletaram-se no mínimo, duas e no máximo quatro amostras de sangue periférico por criança estudada, com intervalo de aproximadamente 3 meses, para observação da fidelidade dos resultados da “Nested-PCR” nas diferentes coletas.

As amostras foram obtidas após informações e autorizações das respectivas mães ou dos responsáveis pelas crianças.

### **Critérios de diagnóstico**

Foram sugeridos como sendo pacientes positivos para infecção pelo HIV-1 neste trabalho, as crianças que apresentaram positividade ao método sorológico ELISA, em

no mínimo dois testes e que tiveram resultados positivos em pelo menos três das quatro regiões amplificadas do HIV-1 (genes *gag*, *env* – 2 regiões e *pol*), para cada coleta de amostra de sangue periférico (mínimo de 2 e máximo de 4 coletas por paciente), por meio da “Nested-PCR”. Este critério foi utilizado, porém, cabe resaltar que o método sorológico ELISA não é considerado teste padrão-ouro para indivíduos com idade inferior a 18 meses, com suspeita de infecção perinatal pelo HIV-1, devido à presença dos anticorpos maternos da classe IgG.

Como pacientes negativos à infecção pelo HIV-1, foram sugeridos aqueles que resultaram em negativo em todas as quatro regiões testadas do HIV-1 pela “Nested-PCR”, em todas as coletas de sangue periférico.

Com os resultados sugeridos pela “Nested-PCR” foi realizada uma análise em relação a alguns fatores associados à infecção pelo HIV-1, via transmissão perinatal. Os fatores analisados foram o uso da Zidovudina (AZT) durante a gestação pela mãe infectada, o tipo de parto ao qual a mãe foi submetida (normal ou cesarea) e o uso do aleitamento materno. Entretanto, os dados obtidos nesta análise apenas sugerem observações, já que as informações foram obtidas de prontuários médicos, não levando-se em consideração nos cálculos, o período de uso do AZT, a dosagem que foi usada, se houve utilização do medicamento no momento do parto e posterior a ele por parte da criança, o período de aleitamento materno, intercorrências no parto.

### **3.1. Extração do DNA**

#### **3.1.1. Preparação das amostras**

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 2.500 rpm por dez minutos, para a separação do plasma, sendo este descartado.

### **3.1.2. Lise das hemáceas:**

As hemáceas foram lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>CL), a 0,0114M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) a 0,01M (0,5 vezes o volume de células). Após quinze minutos em repouso à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado duas vezes, por vinte minutos a 2500 rpm ; foi removido o sobrenadante e o precipitado de leucócitos sofreu lise, conforme item a seguir.

### **3.1.3. Lise de Leucócitos:**

Os leucócitos foram lisados através de lavagens com solução de Tris-HCL 10mM (pH=7,6); KCL 10mM; MgCL<sub>2</sub> 10mM e EDTA 20mM, sendo centrifugados por dez minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foi adicionado, aproximadamente, quatro gotas de Nonidet p40, na primeira lavagem. A segunda lavagem não continha nenhum desses dois últimos especificados; o sobrenadante foi descartado e, após essa etapa foi acrescentado ao precipitado, 0,8ml da solução contendo Tris-HCL 10mM (pH=7,6); KCL 10mM; NaCL 0,4M; MgCL<sub>2</sub> 10mM; EDTA 2mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, em seguida o material foi incubado durante quarenta minutos a uma temperatura de 56°C. Após a incubação adicionou-se ao mesmo, 0,3 ml de NaCL 5M; nessa etapa descartou-se o precipitado e fez-se uso do sobrenadante, que foi transferido para outro tubo estéril.

#### **3.1.4. Precipitação do DNA:**

Ao sobrenadante, referido no item anterior foi adicionado 4ml de etanol absoluto (gelado), havendo assim a precipitação do DNA. Após essa etapa, o DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada e estéril; sendo deixado por 8 horas em banho-maria a 37°C, ou levado a uma temperatura de aproximadamente 4°C, por 16 horas e sua concentração foi estimada em espectrofotômetro, por meio do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm. (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATS,1989).

#### **3.2. Reação de amplificação gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A reação em cadeia da polimerase seguiu com algumas modificações, o método descrito por Saiki *et al.*, (1985) e Albert & Fenyö (ALBERT & FENYÖ, 1990). Em tubo tipo “eppendorf” foi adicionado 0,4 µl do DNA a ser estudado (extraído das amostras de sangue periférico); 50 mM de cloreto de potássio; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 2,5 mM de cloreto de magnésio; 0,1 mM de cada “primer” (Veja seqüência de nucleotídeos e localização genômica na tabela 2: JA4/7; JA9/12; JA13/16 e JA17/20); 200 mM da mistura desoxirribonucléica - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP; dTTP) e 2.0 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco – BRL). A esta mistura reacional de 20µl foram adicionadas 2 gotas de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes.

A reação foi conduzida, inicialmente por 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos (para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática) e, posteriormente, por 30 ciclos de amplificação em ciclador automático e,

cada ciclo, sob as seguintes condições: 94°C durante 30 segundos (para separação das hélices de DNA); 57°C durante 30 segundos (para ocorrer a ligação complementar entre os “primers” e o DNA) e 75°C durante 30 segundos (para a síntese do DNA, através da enzima DNA *Taq* polimerase). Ao término dos 30 ciclos, o produto de amplificação foi mantido a 75°C durante 5 minutos (período final da síntese de DNA), completando um único ciclo. Após este último ciclo, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C. Tais reações de amplificação foram realizadas em termociclador automático (“DNA Thermal Cycler”, Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

Foram utilizadas, como controles positivos da reação, amostras de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), tendo várias sorologias positivas para o vírus e com sintomatologia evidente; e como controles negativos, amostras de indivíduos com várias sorologias negativas para HIV-1, e como controle Branco de reação, utilizou-se água, ou seja, todos os reagentes necessários para o PCR, nas quantidades corretas, porém sem a adição do DNA.

### **3.2.1. “Nested-PCR”**

O protocolo de amplificação para a “Nested” PCR foi realizado com a mesma mistura reacional da PCR já citada. O programa utilizado (número de ciclos, temperaturas e períodos) é também idêntico ao descrito anteriormente, no item (3.2). Na “Nested-PCR”, uma alíquota (0,4 µl) do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado com pares de “primers” internos aos primeiros. Os “primers” utilizados foram: JA5/6; JA10/11; JA14/15 e JA18/19. (Tabela 2).

**Tabela 2.** Seqüência dos nucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR e “Nested PCR”) e sua localização no genoma do HIV-1.

“Primers”	Seqüência de nucleotídeos (5’ – 3’)	Gene e localização
JA4	GAAGGCTTTCAGCCCAGAAG	<i>Gag</i> (1319 – 1338)**
A5	ACCATCAATGAGGAAGCTGC	<i>Gag</i> (1446 – 1465)***
JA6	TATTTGTTCTGAAGGGTAC	<i>Gag</i> (1577 – 1558)***
JA7	TCTCCTACTGGGATAGGTGG	<i>Gag</i> (1615 – 1596)**
JA9	CACAGTACAATGTACACATG	<i>Env</i> (7137 – 7156)**
JA10	AAATGGCAGTCTAGCAGAAG	<i>Env</i> (7191 – 7210)***
JA11	ACAATTTCTGGGTCCCCTCC	<i>Env</i> (7532 – 7513)***
JA12	ACAGTAGAAAAATTCCCCTC	<i>Env</i> (7572 – 7533)**
JA13	TTCCTTGGGTTCTTGGGAGC	<i>Env</i> (8004 – 8023)**
JA14	GCAGCAGGAAGCACTATGGG	<i>Env</i> (8022 – 8041)***
JA15	CCAGGACTCTTGCCTGGAGC	<i>Env</i> (8194 – 8175)***
JA16	AGGTATCTTCCACAGCCAG	<i>Env</i> (8209 – 8190)**
JA17	TACAGGAGCAGATGATACAAG	<i>Pol</i> (2431 – 2450)**
JA18	GGAAACCAAAAATGATAGGG	<i>Pol</i> (2481 – 2500)***
JA19	ATTATGTTGACAGGTGTAGG	<i>Pol</i> (2610 – 2591)***
JA20	CCTGGCTTTATTTTACTGG	<i>Pol</i> (2697 – 2678)**

Os “primers” foram descritos por ALBERT, J. & FENYÖ, E.M.,1990., e sintetizados por GIBCO – BRL – LIFE TECHNOLOGIES™ – USA.

\*\* “Primers” utilizados na primeira PCR (Externos)

\*\*\* “Primers” utilizados na “Nested-PCR” (Internos)

### 3.2.2. Detecção do fragmento amplificado pela “Nested PCR”

Após as reações de amplificação e reamplificação, 8µl do produto da “Nested PCR” foram submetidos à eletroforese em cuba de eletroforese horizontal, contendo gel

de agarose 2% com brometo de etídio, para a possível visualização do fragmento amplificado, sob luz ultravioleta. Foram observados nas amostras positivas, incluindo os controles positivos, fragmentos de DNA com 129; 131; 172 e 341 pares de bases, sendo esses fragmentos originados de seus respectivos genes selecionados: *gag*, *env*, *env* e *pol*. Já nas amostras e controles negativos da reação, não ocorreu amplificação de nenhum desses fragmentos citados. Para cada coleta de amostras das crianças com suspeita de infecção pelo HIV-1, via materno-fetal foi feita a “Nested- PCR” de cada uma dessas quatro regiões gênicas descritas (*gag*, *env*, *env* e *pol*).

### **3.3. Amplificação gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando-se “primers” que detectam o gene da $\beta$ -Globina humana para controle interno da reação.**

Em cada criança estudada foi realizada a PCR e “Nested-PCR” para a 2<sup>a</sup> coleta de sangue periférico, em pelo menos uma das quatro regiões testadas do HIV-1, para com a utilização de “primers” que flanqueiam o gene da  $\beta$ -Globina humano, para atuar como um controle interno de reação, a fim de ter-se uma maior confiabilidade nos resultados. O fragmento obtido para o gene da  $\beta$ -Globina foi de 365 pb.

A reação em cadeia da polimerase, utilizando o gene da  $\beta$ -Globina seguiu o método descrito por SAIKI *et al.*, (1985), para PCR simples, com algumas modificações.

Para a primeira PCR foram utilizados os “Primers” P3 e P5, e o protocolo utilizado foi o mesmo descrito para o item (3.2).

**Tabela 3.** “Primers” que flanqueiam uma região constante do gene da  $\beta$ -globina humano utilizados como controle interno da reação para a primeira PCR.

“Primers”	Seqüência (5’- 3’)	Sentido
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	“sense”
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	“anti-sense”

### 3.3.1. “Nested-PCR” para o gene da $\beta$ -globina humano

Seguindo o mesmo método descrito no item (3.2.1), uma alíquota do DNA amplificado na primeira PCR foi reamplificado com um par de “primers” interno aos primeiros. Os “primers” utilizados para a “nested-PCR” foram P3 e 109 (Tabela 4).

**Tabela 4.** “Primers” que flanqueiam uma região constante do gene da  $\beta$ -globina utilizados como controle interno da reação para “Nested PCR”.

“Primers”	Seqüência (5’- 3’)	Sentido
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	“sense”
109	CCCTTCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	“anti-sense”

Em amostras positivas para o HIV-1 foram encontrados fragmentos de 129; 131; 172 e 341 pb correspondentes as quatro regiões testadas, dos genes: *gag*, *env* (2 regiões) e *pol*, sendo que não foi amplificado nenhum fragmento nas negativas. Nas amostras

testadas com “primers” para o gene da  $\beta$ -globina foi possível a observação de um fragmento de 365 pb.

### **3.4. Normas utilizadas para evitar contaminação nas amostras**

Durante a execução da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vários cuidados foram tomados, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação nas amostras manipuladas. Os cuidados utilizados foram:

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) daquela onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR).
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes.
- Antes da abertura de tubos tipo “eppendorf”, era efetuada rápida centrifugação em microcentrífuga, para concentrar o líquido contido no tubo, na região inferior deste e evitar a dispersão do mesmo por aerosol.
- Todo material plástico (ponteiras e tubos do tipo “eppendorf”) utilizado era novo e estéril, e não autoclavado.
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.
- Uso de hipoclorito 10% e etanol 70%, antes e depois do uso da bancada.
- Ponteiras com filtro, para se evitar a contaminação via aerosol.
- Jogo de pipetas para cada área.
- Prática laboratorial meticulosa.

### 3.5. Hibridação

Realizou-se a reação de hibridação em 6 das 41 crianças estudadas, para confirmação de resultados obtidos pela “Nested-PCR” neste estudo, sendo que foram utilizados para o procedimento, um controle positivo e um controle negativo; ambos para a reação de PCR que precedeu a hibridação. O controle positivo de reação utilizado foi um paciente sabidamente infectado pelo HIV-1 e o controle negativo, um indivíduo sem história e sem diagnóstico laboratorial de contaminação pelo vírus. Os controles positivo e negativo foram previamente submetidos a testes sorológicos e a PCR.

A PCR que precedeu a hibridação foi realizada com o par de “primers” JA4 e JÁ7 do gene *gag* do HIV-1

As crianças submetidas à hibridação foram: 1, 13, 14, 17, 22, 23 e a sonda utilizada foi a SK38 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Sonda que flanqueia uma região constante do gene *gag* do HIV-1 utilizada na reação de hibridação.

Sonda	Seqüência (5'- 3')	Posição no genoma do HIV-1
SK 38*	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGA	1551 – 1578

\*Sonda descrita por SANCHEZ-PESCADOR *et al.*, 1985.

### **3.5.1. Protocolo de Hibridação**

Após a realização da reação em cadeia da polimerase com os “primers” JA4 e JA7, com condições e programação de reação análoga à descrita no item (III.2.) foi feita a aplicação das amostras em gel de agarose 2%, com posterior visualização, sob luz ultravioleta; registro fotográfico, com uma régua marcadora de peso molecular ao lado do gel; e transferência das amostras contidas no gel de agarose 2%.

Após eletroforese em gel de agarose 2%, o material foi transferido para membrana de nitrocelulose, pelo método ‘seco’ isto é, sobre o gel foi colocada a membrana de nitrocelulose, papel de filtro e papel toalha. O único tampão utilizado foi aquele contido no próprio gel. O tempo de duração de transferência foi ao redor de 12 horas, o que resultou em transferência total do DNA da agarose para a membrana. Após a transferência, a membrana foi neutralizada por 2 minutos em tampão 0,45M NaCl, 0,5M Tris-HCL pH 7,5. Após secagem, o DNA foi estabilizado pelo aquecimento a 80°C, por 2 horas.

#### **3.5.1.a. Marcação das sondas com isótopos radioativos**

Em tubo tipo “ependorf”, foram adicionadas as seguintes substâncias; 31µl de dH<sub>2</sub>O, 5µl de Buffer, 1 µl do “primer” a ser marcado radioativamente (SK38 - Sonda), 8µl de [ $\gamma^{32}$ P]ATP, 5µl de enzima Kinase 50 mM, dando uma quantidade final de 50µl. Esse “ependorf”, contendo os 50µl de reação citados, foi mantido no banho – maria por 2 horas, sob temperatura de 37° C. Após retirada do banho - maria, foi adicionado aos 50µl de reação, 100µl de TNE e, posteriormente, este tubo foi colocado em caixa própria para recipientes que contém material radioativo.

### **3.5.1.b. Preparação da coluna de Sephadex**

Em uma seringa de 1 ml foi colocado, na parte inferior desta, onde o líquido é ejetado, um chumaço de lã de vidro, com o auxílio do próprio êmbolo da seringa, descartado posteriormente. Colocou-se na coluna 1 ml de Sephadex de G-50, evitando a formação de bolhas; posteriormente a coluna foi submetida à centrifugação a 1000 rpm, durante 2 minutos; sendo repetido este procedimento de adição de cerca de 1 ml de Sephadex e posterior centrifugação, até formar uma quantidade na coluna, de 1 ml. A etapa seguinte foi a adição à coluna de Sephadex, de 150 ml de TNE, seguido de centrifugação a 1000 rpm, durante 2 minutos. A coluna foi submetida à temperatura de aproximadamente 4° C, por aproximadamente 14 horas.

### **3.5.1.c. Preparo do tampão de hibridação**

Em balão volumétrico de 200 ml, foi adicionado 65 ml de dH<sub>2</sub>O, 25 ml de SSPE (20X), 5 ml de Denhart's (100X) e 5 ml de SDS 10%, sendo o balão volumétrico, submetido à temperatura de 37° C, por cerca de 30 minutos.

Após essa etapa, a coluna de Sephadex foi centrifugada a 1000 rpm por 2 minutos e, a esta foi adicionado 1µl da sonda previamente marcada com isótopo radioativo e, em seguida ocorreu a centrifugação da coluna a 1000 rpm, durante 2 minutos. Posterior à centrifugação, houve formação de um resíduo (sonda), que em seguida sofreu denaturação (separação da dupla hélice de DNA) a 95° C, durante 2 minutos.

O próximo passo foi a adição de 20 ml do tampão de hibridação a um tubo contendo a membrana de nitrocelulose, com as amostras na qual realizou-se a PCR com os "primers JA4 e JA7. No seguimento seguinte, o tubo foi colocado em um forno por 2

horas, sob temperatura de 42° C, com movimentação giratória lenta. Posterior a essas 2 horas, foi descartado o tampão inicial e colocado mais 20 ml de tampão de hibridação e também, a sonda SK38 previamente marcada radioativamente e denaturada. O tubo contendo a membrana foi mantido no forno, sob as mesmas condições anteriores, porém “overnight”.

#### **3.5.1.d. Lavagens**

Após “overnight” a membrana foi lavada com a solução I, que incluiu: 156 ml de dH<sub>2</sub>O, 40 ml de SSPE (20X), e 4 ml de SDS (10%), sendo realizada, por duas vezes consecutivas, a lavagem com esta solução, com tempo de aproximadamente 15 minutos para cada lavagem. Após a lavagem com a solução I, foi feita a lavagem com a solução II, que continha, 222 ml de dH<sub>2</sub>O, 75 ml de SSPE (20X), 3 ml de SDS (10%), à temperatura de 55 °C, durante 10 minutos.

Depois das lavagens, a membrana foi deixada à temperatura ambiente por cerca de 1 hora, para sua secagem, posterior auto-radiografia e revelação do filme.

#### **3.6. Seqüenciamento do fragmento de DNA amplificado pela “Nested PCR”**

Realizou-se a reação de seqüenciamento direto pelo método de “Sanger” (SANGER, NIKLEN, COULSON, 1977), para posterior comparação entre os fragmentos genéticos obtidos neste estudo pela “Nested-PCR”, com as seqüências do HIV-1 descritas no GenBank.

Para a realização do seqüenciamento foi utilizado o “Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit” – Amersham Life Scienci, Cleveland, Ohio 44128, USA.

### **3.6.1. Purificação do produto obtido pela “Nested-PCR”**

Cerca de 5 $\mu$ l do produto amplificado pela “Nested-PCR” foi purificado com 1U de Fosfatase alcalina e 1 $\mu$ l de Exonuclease (1U/ $\mu$ l), a 37° C, durante 15 minutos e posteriormente o material foi mantido a 80°C durante mais 15 minutos, em termociclador automático.

### **3.6.2. Reação de terminação**

Foram utilizados à reação de terminação, 2 $\mu$  l de dGTP Master Mix (7,5 $\mu$ M dATP, dGTP, dCTP e dTTP), para cada reação, o produto da “Nested-PCR” purificado, acrescido de 1,2 pmols dos “primers” utilizados na “Nested-PCR”, e 0,5 $\mu$  l de [ $\alpha^{33}$ P]ddATP.

### **3.6.3. Reação do seqüenciamento**

A etapa seguinte foi a reação do seqüenciamento; contendo 2 $\mu$ l de tampão de reação (260mM Tris-HCL, pH 9,5, 65mM MgCl<sub>2</sub>), 2 $\mu$ l do produto da “Nested-PCR” purificado, 1 $\mu$ l de “primer” para 2' PCR, 2 $\mu$ l de Thermostequenase e 13 $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O. Com isso, o volume total de reação, resultou em 20 $\mu$  l. Desses 20 $\mu$ l, 4,5 $\mu$ l + 2,5  $\mu$  l do produto da reação de terminação + 1 gota de óleo mineral foi aplicado em programa de

95° C, durante 30 segundos; 59° C, durante 30 segundos e 72° C, durante 1 minuto, num total de 35 ciclos, em termociclador (Perkin – Elmer). Após esta reação de seqüenciamento, foi adicionado a cada tubo (amostra), 4µl da solução Stop (95% formamida, 20mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xylene cyanol FF).

#### **3.6.4. Eletroforese**

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.

#### **3.6.5. Raio- X**

O último procedimento deste método foi a exposição, em filme de raio-X, para posterior revelação e análise seqüencial comparatória, entre a seqüência obtida por ele com a descrita no GenBank para o HIV-1.

#### **3.7. Cálculo estatístico utilizado neste trabalho, para obtenção de evidência ou não de associação.**

Os cálculos, para se obter os valores de “p”, foram realizados pelo teste exato de Fisher para verificar associação entre as variáveis. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, quando  $p\text{-valor} \leq 0,05$  existe evidência de associação.

**Obs.** A 4ª coleta de sangue periférico de cada criança, não foi incluída em nenhuma tabela de resultados, devido ao número reduzido de crianças participantes dessa coleta e por não Ter, conseqüentemente, significância para os cálculos estatísticos.

**XXX**

***RESULTADOS***

#### 4. RESULTADOS

Os “primers”, utilizados neste trabalho foram selecionados a partir de regiões conservadas do HIV-1. Os conjuntos de “primers” para o gene *pol* (JA17 – JA20) e gene *gag* (JA4 – JA7), mostraram uma concordância maior de resultados, quando comparados às duas regiões amplificadas do gene *env*, primers (JA9 – JA12) e (JA13 – JA16). A mais eficiente amplificação dos fragmentos foi encontrada com concentração de MgCl<sub>2</sub> de 2,5 mM, e foi possível uma única padronização de programação (temperaturas, períodos, número de ciclos) para os dois passos (1º PCR e “Nested – PCR”) da reação de amplificação gênica. O programa de amplificação foi anteriormente descrito no item Casuística e Métodos.

Os resultados obtidos pela “Nested-PCR” foram 12 pacientes positivos (29,3%), ao qual seria a proporção de crianças infectadas pelo HIV-1 que foram incluídas no trabalho, com base no critério de diagnóstico utilizado, com positividade sugerida pelo teste padronizado neste estudo (“Nested-PCR”) e pelo ELISA, apesar de sua limitação para crianças com idade inferior a 18 meses; e 29 pacientes negativos (70,7%), de um total de 41 pacientes (100%).

Os resultados da “Nested-PCR” para cada coleta de amostragem de sangue periférico de cada criança analisada estão demonstrados na Tabela (6). A “Nested-PCR” foi realizada mesmo quando a criança já havia completado os 18 meses de vida, para ter-se uma observação quanto a ‘fidelidade’ nos resultados obtidos pelo teste, para as diferentes coletas e regiões virais.

Para obtenção dos resultados gerais da “Nested-PCR”, demonstrados na tabela 6, foram amplificadas 4 regiões gênicas do HIV-1 (genes *gag*, *env* - 2 regiões e *pol*), isto para cada coleta de sangue periférico de cada criança estudada. Os resultados das

amplificações para os respectivos genes do HIV-1 selecionados para esse estudo, estão nas tabelas 6.a., 6.b., 6.c. e 6.d.

#### **4.1. Dificuldades durante a padronização e aplicação da “Nested-PCR”**

A reação em cadeia da polimerase tipo “Nested” apresentou algumas dificuldades durante sua padronização e aplicação em crianças com suspeita de infecção perinatal pelo HIV-1, entre elas estão:

- Problemas de contaminação, já que ocorria amplificação de fragmento do HIV-1 no controle negativo de reação ou em pacientes que resultaram em negativo para todas as regiões virais e coletas, porém, em certa região, ocorria amplificação. Nessas situações a “Nested-PCR” era repetida por no mínimo duas vezes.
- Não amplificação do controle positivo de reação e de pacientes com resultados positivos para a maioria das regiões virais e coletas analisadas. Nessas ocorrências, a “Nested-PCR” era realizada novamente, porém, em alguns casos, mesmo com a repetição do experimento, certas amostras continuavam a não amplificar determinada região viral; isso ocorreu principalmente para o gene *env* do HIV-1.
- Amplificação de bandas inespecíficas, que algumas vezes dificultavam a interpretação das bandas de real interesse, porém, esse problema foi bastante minimizado com a padronização da concentração de MgCl<sub>2</sub> para 2,5mM, e com a temperatura de pareamento dos “primers” com a fita de DNA a 57°C.
- Amplificação de bandas com intensidade baixa (muito claras), dificultando a visualização e a interpretação do resultado. Esse problema foi bastante

minimizado com a padronização da temperatura, número de ciclos e período da síntese do DNA através da enzima DNA *Taq* polimerase para 75°C por 30 segundos durante 30 ciclos e 75°C por 5 minutos durante 1 ciclo (período da extensão final).

Nem todas as crianças estudadas compareceram à 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas; por esta razão, as referidas colunas encontram-se sem resultados.

**Tabela 6:** Resultados da “Nested-PCR” para detecção do HIV-1 nas crianças estudadas, com suas respectivas idades (em meses) em cada coleta de sangue periférico (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas).

Criança	PCR (1 <sup>a</sup> Coleta)	Idade (meses)	PCR (2 <sup>a</sup> Coleta)	Idade (meses)	PCR (3 <sup>a</sup> Coleta)	Idade (meses)	PCR (4 <sup>a</sup> Coleta)	Idade (meses)
1	-	9	-	12				
2	-	6	-	9				
3	-	14	-	15,5				
4	+	6	+	8				
5	-	12	-	16				
6	-	4	-	15				
7	+	1	+	2,5				
8	+	2,5	+	5				
9	-	7	-	10				
10	-	4	-	6				
11	-	10,5	-	13,5	-	17,5		
12	+	6	+	9	+	15		
13	-	1	-	2,5	-	6,5		
14	-	2	-	6	-	10		
15	-	11	-	15	-	21		
16	+	8,5	+	11,5	+	17,5		
17	-	4,5	-	9	-	11,5		
18	-	1	-	4	-	10		
19	-	11	-	14	-	22		
20	-	12	-	15	-	22		
21	-	12	-	15	-	22		
22	-	8,5	-	11,5	-	18,5		
23	-	6	-	9	-	15		
24	+	11	+	14	+	20		
25	+	11	+	12	+	20		
26	-	2	-	6	-	10		
27	-	4	-	5,5	-	7		
28	-	5,5	-	8,5	-	15,5		
29	-	1	-	5	-	10		
30	+	6	+	8,5	+	11		
31	+	15	+	16	+	18		
32	+	12	+	14	+	17		
33	-	1	-	5,5	-	9,5	-	13,5
34	+	13	+	16	+	22	+	25
35	-	9,5	-	12,5	-	19,5	-	22
36	-	1,5	-	4,5	-	11,5	-	15,5
37	+	9	+	11	+	12	+	16
38	-	4	-	6	-	9	-	12
39	-	5,5	-	10	-	13	-	16
40	-	1	-	4	-	7	-	10
41	-	1	-	4	-	9	-	12

**Tabela 6.a. :** Resultados das ampliações gênicas por meio da “Nested-PCR” dos genes *gag*, *env* (2 regiões) e *pol* do HIV-1, para a 1ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.

Paciente	1ª Coleta (Resultados da “Nested-PCR”)			
	gene <i>gag</i>	gene <i>env</i> (1)	Gene <i>env</i> (2)	gene <i>pol</i>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	+	+
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	+	+	+	+
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
32	+	+	+	+
33	-	-	-	-
34	+	+	+	+
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	+	+	+
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-

**Tabela 6.b.** Resultados das ampliações gênicas por meio da "Nested-PCR" dos genes *gag*, *env* (2 regiões) e *pol* do HIV-1, para a 2ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.

Paciente	2ª Coleta (Resultados da "Nested-PCR")			
	gene <i>gag</i>	gene <i>env</i> (1)	gene <i>env</i> (2)	Gene <i>pol</i>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	+	-	+
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	-	+
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	+	+	+	+
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
32	+	+	+	+
33	-	-	-	-
34	+	+	+	+
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	+	+	+
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-

**Tabela 6.c.** Resultados das ampliações gênicas por meio da “Nested-PCR” dos genes *gag*, *env* (2 regiões) e *pol* do HIV-1, para a 3ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.

Paciente	3ª Coleta (Resultados da “Nested-PCR”)			
	gene <i>gag</i>	gene <i>env</i> (1)	gene <i>env</i> (2)	gene <i>pol</i>
11	-	-	-	-
12	+	+	-	+
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	+	+	+	+
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
32	+	+	+	+
33	-	-	-	-
34	+	+	+	+
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	-	+	+
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-

**Tabela 6.d.** Resultados das ampliações gênicas por meio da “Nested-PCR” dos genes *gag*, *env* (2 regiões) e *pol* do HIV-1, para a 4ª coleta de sangue periférico de cada criança estudada.

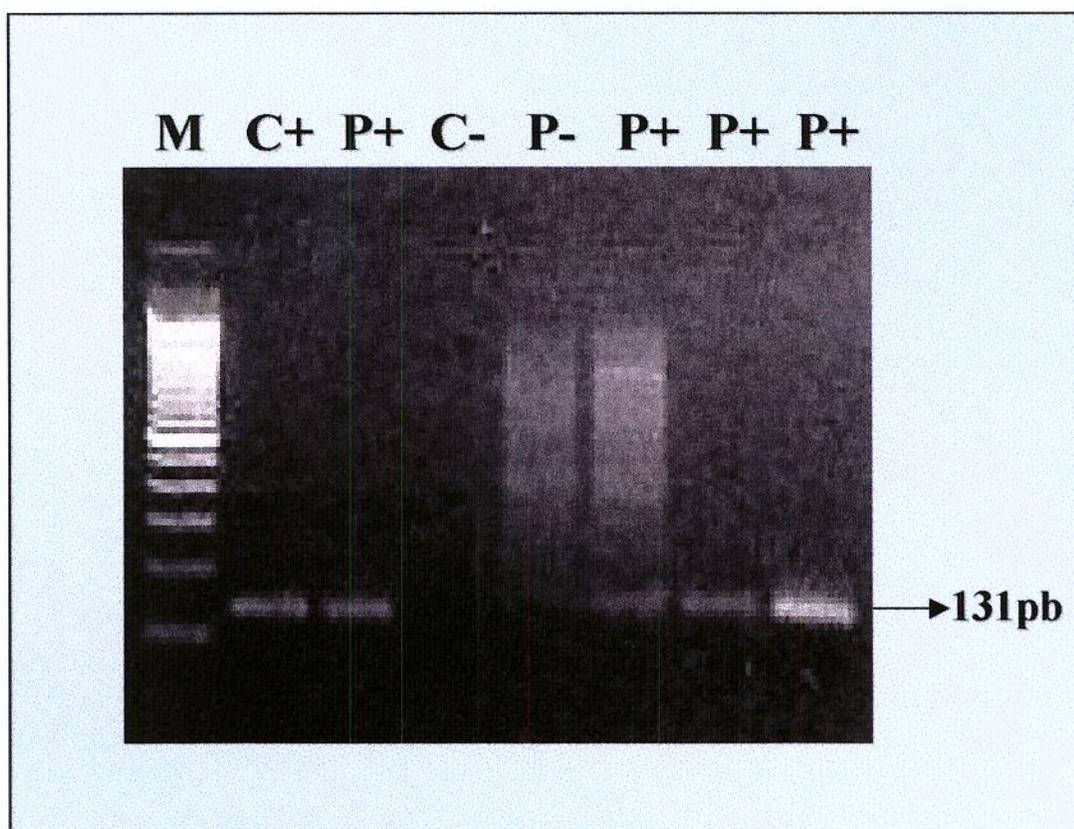
Paciente	4ª Coleta (Resultados da “Nested-PCR”)			
	gene <i>gag</i>	gene <i>env</i> (1)	gene <i>env</i> (2)	Gene <i>pol</i>
33	-	-	-	-
34	+	+	+	+
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	+	+	+	+
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-

Houve alternância de resultados para os pacientes:

- Paciente nº 4: Apresentou “Nested-PCR” positiva, para os genes *gag* e *pol*, nas duas primeiras coletas de sangue periférico. Já para as duas regiões do gene *env*, apresentou resultados positivos para a 1ª coleta, mas na 2ª coleta, apresentou resultado positivo para a região do gene *env* (1), mas resultado negativo para a região (2) (Tabela 6.b., item Resultados).
- Paciente nº 12: Apresentou “Nested-PCR” positiva, para os genes *gag* e *pol*, nas duas primeiras coletas de sangue periférico. Já para as duas regiões do gene *env*, apresentou resultados positivos para a 1ª coleta, mas na 2ª e 3ª coletas, apresentou resultado positivo para a região do gene *env* (1), e resultado negativo para a região (2) do *env* (Tabela 6.b. e 6.c., item Resultados).
- Paciente nº 37: Apresentou “Nested-PCR” positiva, para os genes *gag* e *pol*, nas duas primeiras coletas de sangue periférico. Já para as duas regiões do gene *env*, apresentou resultados positivos para a 1ª coleta, mas na 2ª e 3ª coletas, apresentou

resultado negativo para a região do gene *env* (1), e resultado positivo para a região (2) do *env* (Tabela 6.b. e 6.c., item Resultados).

Para cada região gênica do HIV-1 amplificada, genes *gag*, *env* (2 regiões), e *pol*, os fragmentos obtidos foram respectivamente: 131 pb, 341 pb, 172 pb e 129 pb. As figuras 4, 5, 6 e 7 demonstram esses fragmentos amplificados.



**Figura 4.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *gag* do HIV-1 (“primers” JA4-JA7), com produto final de 131 pb.

**Legenda referente à Figura 4:**

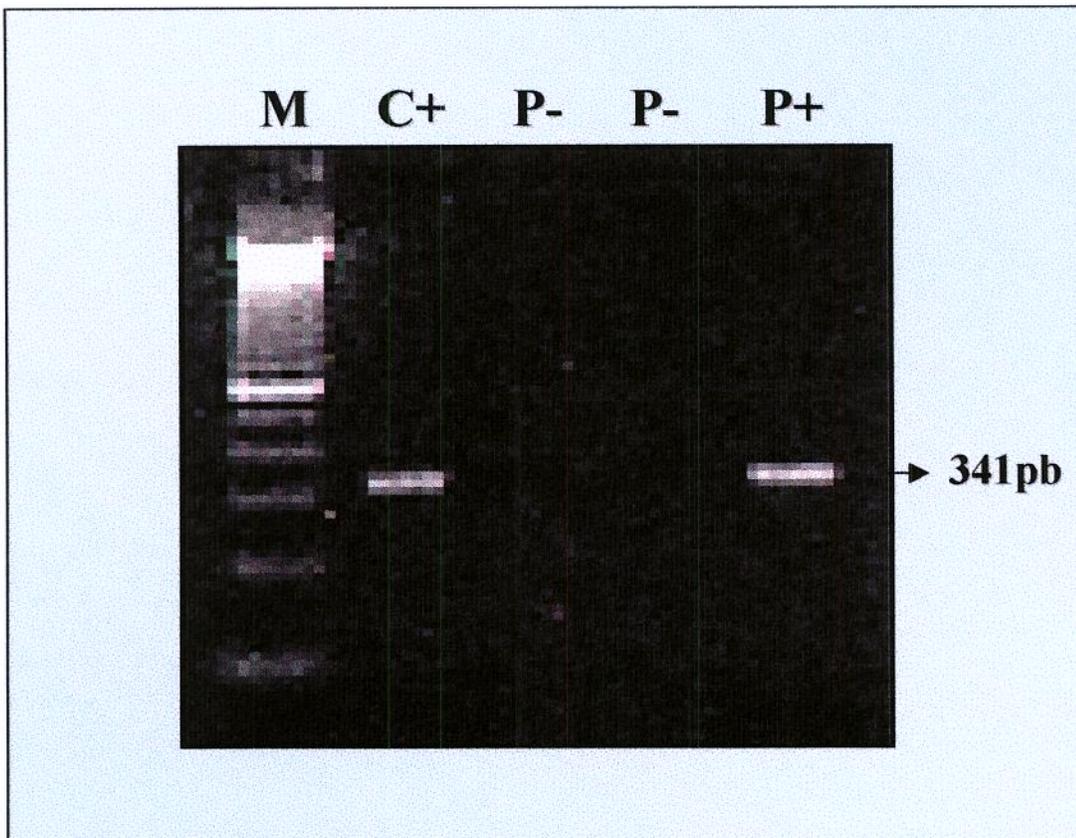
**M:** Marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BRL, LIFE TECHNOLOGIES<sup>TM</sup>, USA).

**C+:** Controle (+) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente infectado pelo HIV-1)

**C-:** Controle (-) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente não infectado pelo HIV-1).

**P+:** Paciente positivo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.

**P-:** Paciente negativo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.



**Figura 5.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *env* (1) do HIV-1 (“primers” JA9-JA12), com produto final de 341 pb.

**Legenda referente à Figura 5:**

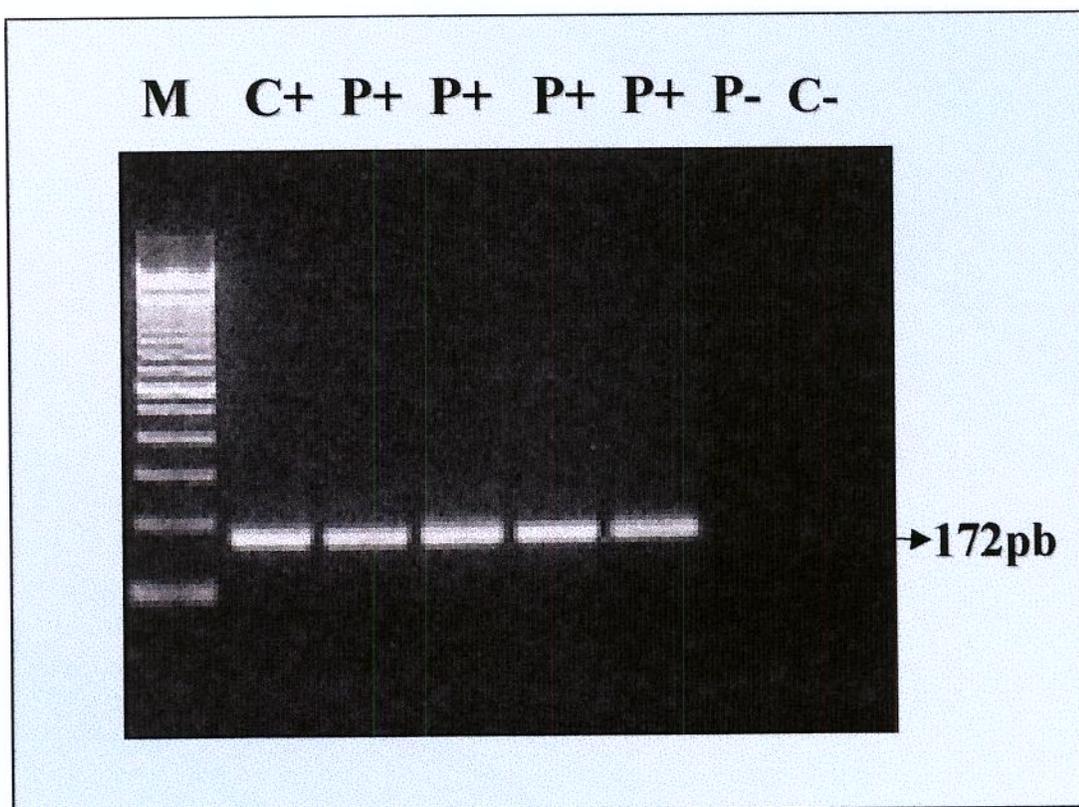
**M:** Marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BRL, LIFE TECHNOLOGIES<sup>TM</sup>, USA).

**C+:** Controle (+) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente infectado pelo HIV-1)

**C-:** Controle (-) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente não infectado pelo HIV-1).

**P+:** Paciente positivo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.

**P-:** Paciente negativo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.



**Figura 6.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *env* (2) HIV-1 (“primers” JA13-JA16), com produto final de 172 pb.

**Legenda referente à Figura 6:**

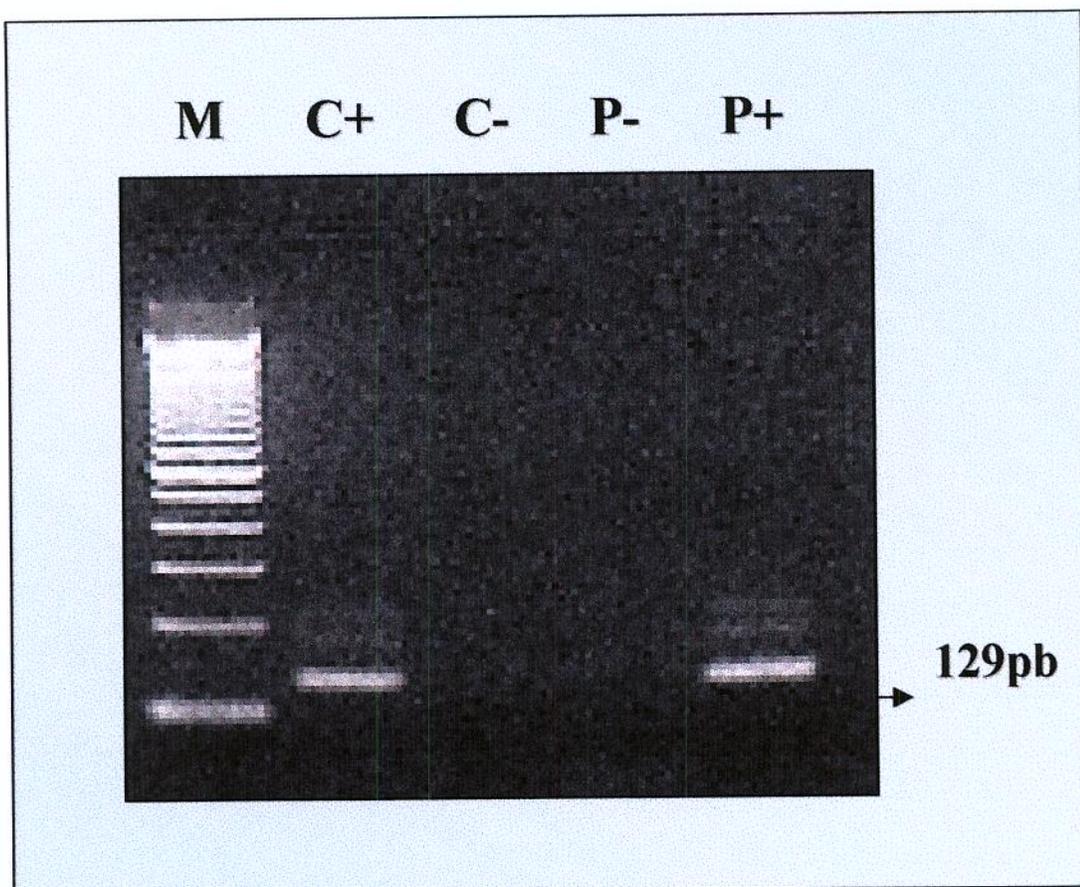
**M:** Marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BRL, LIFE TECHNOLOGIES<sup>TM</sup>, USA).

**C+:** Controle (+) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente infectado pelo HIV-1)

**C-:** Controle (-) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente não infectado pelo HIV-1).

**P+:** Paciente positivo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.

**P-:** Paciente negativo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.



**Figura 7.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *pol* do HIV-1 (“primers” JA17-JA20), com produto final de 129 pb.

**Legenda referente à Figura 7:**

**M:** Marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BRL, LIFE TECHNOLOGIES™, USA).

**C+:** Controle (+) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente infectado pelo HIV-1)

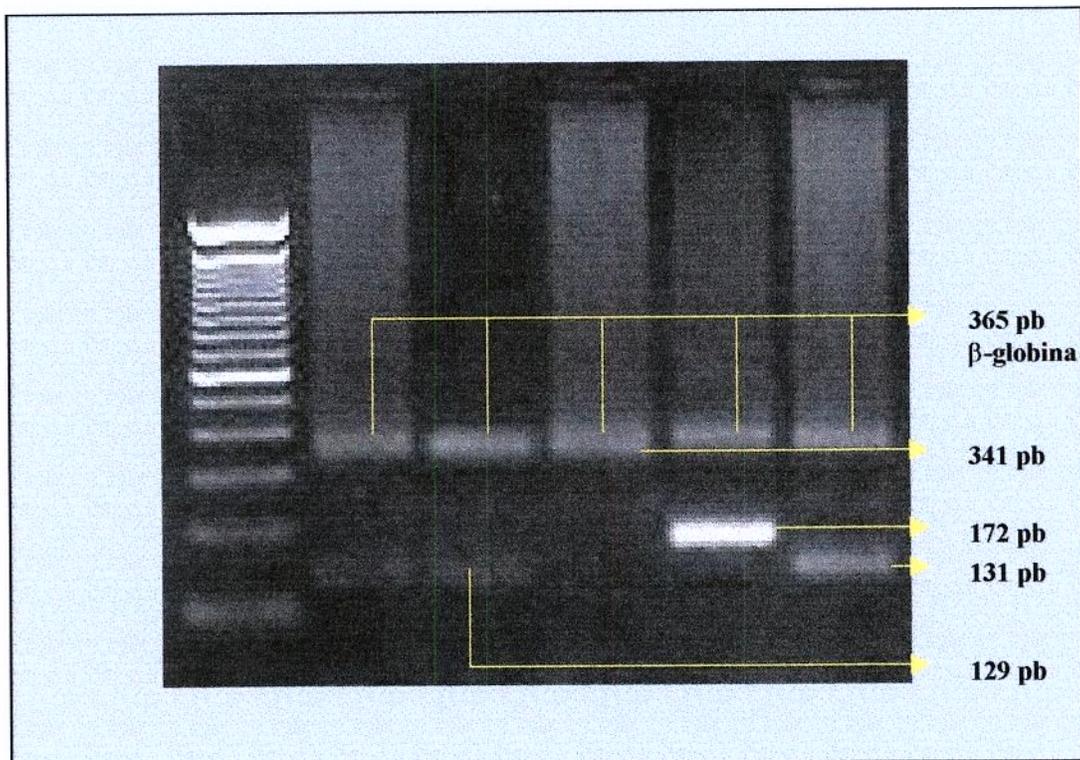
**C-:** Controle (-) para “Nested-PCR” (paciente confirmadamente não infectado pelo HIV-1).

**P+:** Paciente positivo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.

**P-:** Paciente negativo para infecção pelo HIV-1, pela “Nested-PCR”.

#### **4.2. Resultados da “Nested-PCR”, tendo-se como controle interno de reação, a amplificação do gene humano da $\beta$ -globina.**

Como já mencionado no item Casuística e Métodos, as crianças foram submetidas à amplificação com “primers” que flanqueiam região do gene da  $\beta$ -globina, em pelo menos uma região genética viral testada (gene *gag*, *env* – 2 regiões e *pol*) da 2<sup>a</sup> coleta de sangue periférico de cada criança estudada. A figura 8 representa a amplificação de regiões do HIV-1, tendo-se como controle interno de reação, a amplificação de região flanqueada do gene da  $\beta$ -globina (365 pb); e os fragmentos dos genes do HIV-1 apresentam respectivamente na figura, 131 pb, 129 pb, 341 pb e 129 pb.



**Figura 8.** Amplificação das regiões gênicas do HIV-1 por “Nested-PCR”, utilizando-se com controle interno, a amplificação de fragmento do gene da  $\beta$ -globina humano.

### 4.3. Análise comparativa dos resultados obtidos pelo método sorológico ELISA e pela “nested-PCR”

A coleta de material (sangue periférico) para a realização da “Nested-PCR” e do ensaio sorológico ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) foi realizada conjuntamente.; porém para o ELISA, a amostra foi colhida em tubo ‘seco’ ou seja, sem anticoagulante; já o material para PCR, foi colhido em tubo contendo como anticoagulante, EDTA. Os resultados do teste ELISA para HIV-1 eram liberados no prontuário médico de cada paciente. Após a obtenção dos resultados do ELISA e da “Nested-PCR” foi realizada uma análise comparativa entre os resultados obtidos por essas duas técnicas de diagnóstico da infecção pelo HIV-1. Entretanto essa comparação, apenas sugere observações, já que o método ELISA foi utilizado e incluído na análise, mesmo quando a criança apresentava idade inferior a 18 meses e tal método somente é considerado padrão-ouro, para pacientes com idade superior a 18 meses. As tabelas 7.a., 7.b., 7.c. e 7.d., demonstram os dados encontrados.

**Tabela 7.a.** Comparação de resultados do ELISA com a “Nested-PCR”, para detecção do HIV-1, na 1ª coleta de sangue periférico das crianças estudadas.

	<b>Criança (+)</b>	<b>Criança (-)</b>	<b>Total de crianças</b>
<b>ELISA 1ª coleta</b>	33 (86,84%)	5 (13,16%)	38 (100%)
<b>PCR 1ª coleta</b>	10 (26,32%)	28 (73,68%)	38 (100%)

**Tabela 7.b.** Comparação de resultados do ELISA com a "Nested-PCR", para detecção do HIV-1, na 2ª coleta de sangue periférico das crianças estudadas.

	Criança (+)	Criança (-)	Total de crianças
ELISA 2ª coleta	30 (78,95%)	8 (21,05%)	38 (100%)
PCR 2ª coleta	10 (26,32%)	28 (73,68%)	38 (100%)

Nas Tabela 7.a. e 7.b., o número total de crianças, não completam as 41 selecionadas para a Casuística deste trabalho, pois não foram possíveis alguns resultados do teste sorológico imunoenzimático ELISA, para realização da análise comparatória com a "Nested-PCR". Para a tabela 7.c., o número total de crianças decai ainda mais, pois além dessa dificuldade, inclui-se o não comparecimento de todas as crianças, para as 3ª e 4ª coletas de sangue periférico.

**Tabela 7.c.** Comparação de resultados do ELISA com a "Nested-PCR", para detecção do HIV-1, na 3ª coleta de sangue periférico das crianças estudadas.

	Criança (+)	Criança (-)	Total de crianças
ELISA 3ª coleta	17 (56,67%)	13 (43,33%)	30 (100%)
PCR 3ª coleta	8 (26,67%)	22 (43,33%)	30 (100%)

#### 4.4. Análise do aleitamento materno em relação à transmissão vertical do HIV-

1.

Neste estudo foi realizada a análise, levando em consideração a influência do aleitamento materno por parte da mãe infectada com o HIV-1, na transmissão vertical do vírus. As tabelas 8.a., 8.b. e 8.c., demonstram os resultados da “Nested-PCR”, para cada coleta de sangue periférico. (1<sup>ª</sup>, 2<sup>ª</sup> e 3<sup>ª</sup> coletas).

**Tabela 8.a.** Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1, realizada nas crianças estudadas, em relação ao aleitamento materno por parte da mãe infectada, para 1<sup>ª</sup> coleta de sangue periférico.

<b>Aleitamento Materno</b>	<b>Total de crianças</b>	<b>PCR (+) 1<sup>ª</sup> coleta</b>	<b>PCR - 1<sup>ª</sup> coleta</b>
<b>Crianças que não receberam</b>	27 (75%)	4 (14,81%)	23 (85,19%)
<b>Crianças que receberam</b>	9 (25%)	6 (66,67%)	3 (33,33%)

p= 0,006 (teste de Fisher)

**Tabela 8.b.** Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1, realizada nas crianças estudadas, em relação ao aleitamento materno por parte da mãe infectada, para 2ª coleta de sangue periférico.

<b>Aleitamento Materno</b>	<b>Total de crianças</b>	<b>PCR (+) 2ª coleta</b>	<b>PCR - 2ª coleta</b>
<b>Crianças que não receberam</b>	27 (75%)	4 (14,81%)	23 (85,19%)
<b>Crianças que receberam</b>	9 (25%)	6 (66,67%)	3 (33,33%)

p= 0,006 (teste de Fisher)

**Tabela 8.c.** Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1, realizada nas crianças estudadas, em relação ao aleitamento materno por parte da mãe infectada, para 3ª coleta de sangue periférico.

<b>Aleitamento Materno</b>	<b>Total de crianças</b>	<b>PCR (+) 3ª coleta</b>	<b>PCR - 3ª coleta</b>
<b>Crianças que não receberam</b>	22 (73,33%)	3 (13,64%)	19 (86,36%)
<b>Crianças que receberam</b>	8 (26,67%)	5 (62,50%)	3 (37,50)

p= 0,016 (teste de Fisher)

**4.5. Análise do uso de AZT por parte da gestante, em relação à transmissão vertical do HIV-1**

Realizou-se, também, neste trabalho, um levantamento quanto ao uso ou não de AZT pela gestante infectada pelo HIV-1 durante a gestação, e foi analisada a influência de seu uso como fator de associação à transmissão perinatal do vírus. Os resultados da análise estão nas tabelas 9.a., 9.b., 9.c., de acordo com as respectivas coletas de sangue periférico (1<sup>ª</sup>, 2<sup>ª</sup>, 3<sup>ª</sup> coletas).

**Tabela 9.a.:** Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1 realizada nas crianças estudadas, em relação ao uso ou não de AZT pela gestante infectada, para 1<sup>ª</sup> coleta de sangue periférico.

AZT	Total de crianças	PCR (+) 1 <sup>ª</sup> coleta	PCR (-) 1 <sup>ª</sup> coleta
Crianças cuja mãe não usou AZT durante a gestação	22 (61,11%)	9 (40,91%)	13 (59,04%)
Crianças cuja mãe usou AZT durante a gestação	14 (38,89%)	1 (7,14%)	13 (92,86%)

p= 0,05 (teste de Fisher)

**Tabela 9.b.:** Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1, realizada nas crianças estudadas, em relação ao uso ou não de AZT pela gestante infectada, para 2ª coleta de sangue periférico.

AZT	Total de crianças	PCR (+) 2ª coleta	PCR (-) 2ª coleta
Crianças cuja mãe não usou AZT durante a gestação	22 (61,11%)	9 (40,91%)	13 (59,04%)
Crianças cuja mãe usou AZT durante a gestação	14 (38,89%)	1 (7,14%)	13 (92,86%)

p= 0,05 (teste de Fisher)

**Tabela 9.c.:** Resultados da “Nested-PCR” para HIV-1, realizada nas crianças estudadas, em relação ao uso ou não de AZT pela gestante infectada, para 3ª coleta de sangue periférico.

AZT	Total de Pacientes	PCR (+) 3ª coleta	PCR (-) 3ª coleta
Crianças cuja mãe não usou AZT durante a gestação	19 (63,33%)	8 (42,11%)	11 (57,89%)
Crianças cuja mãe usou AZT durante a gestação	11 (36,67%)	0 (0%)	11 (100%)

P= 0,014 (teste de Fisher)

**4.6. Análise conjunta da influência de fatores associados a transmissão perinatal do HIV-1.**

Foi também realizado neste trabalho um cálculo da proporção de crianças estudadas infectadas pelo HIV-1 via perinatal, cujas mães fizeram uso conjunto ou não, dos três 3 fatores de associação à infecção pelo HIV-1. Os fatores analisados foram o uso do AZT durante a gestação pela gestante; o não aleitamento materno; e o parto do tipo cesarea, como já citados anteriormente.

As tabelas 10.a. e 10.b., demonstram essas duas análises.

**Tabela 10.a.:** Resultados do índice de transmissão vertical, para as crianças cujas mães seguiram os fatores indicados para se reduzir o risco de infecção vertical.

Total de Pacientes	Nº de crianças (utilizaram)*	PCR (+)	PCR (-)
38 (100%)	5 (13, 15%)	1 (20%)	4 (80%)

\* Número de crianças cujas respectivas mães infectadas pelo HIV-1, utilizaram os três fatores indicados para redução da transmissão perinatal do HIV-1

**10.b.:** Resultados do índice de transmissão vertical, para as crianças cujas mães não seguiram os fatores indicados para reduzir o risco de infecção vertical.

Total de Pacientes	Nº de crianças (não utilizaram)**	PCR (+)	PCR (-)
38 (100%)	4 (10, 52%)	3 (75%)	1 (25%)

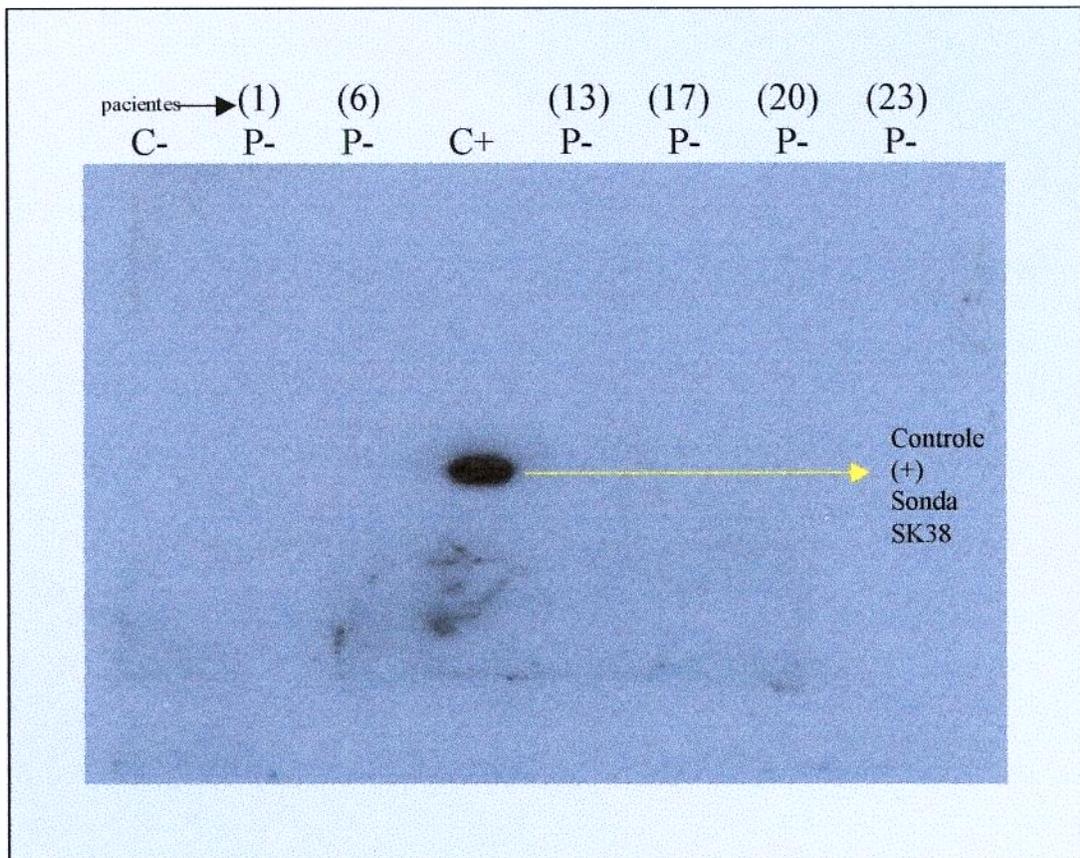
\*\* Número de crianças cujas respectivas mães infectadas pelo HIV-1, não utilizaram os três fatores indicados para redução da transmissão perinatal do HIV-1

#### 4.7. Resultados da hibridação

Para uma confirmação de resultados obtidos pela “Nested-PCR” foi feita hibridação, com sonda radioativa, das crianças números 1, 6, 13, 17, 20, 23, 1 controle (+) e 1 controle (-), com a sonda SK38. O fragmento obtido pela PCR pré-hibridação com o par de “primers” JA4 e JA7 apresentou um fragmento de 296pb. O resultado obtido pela hibridação, equivaleu aos realizados pela “Nested-PCR”, que estão expressos na tabela 11.

**Tabela 11:** Resultado da hibridação com a sonda SK 38 e comparação com os obtidos pela “Nested-PCR” com o par de “primers” JA4-JA7 para os pacientes 1, 6, 13, 17, 20, 33.

<b>Crianças</b>	<b>Hibridação</b>	<b>“Nested-PCR”</b>
<b>1</b>	-	-
<b>6</b>	-	-
<b>13</b>	-	-
<b>17</b>	-	-
<b>20</b>	-	-
<b>33</b>	-	-
<b>Controle (+)</b>	+	+
<b>Controle (-)</b>	-	-



**Figura 9.** Resultado da hibridação

**Legenda referente à Figura 9:**

**C+:** Controle (+) para hibridação (paciente confirmadamente infectado pelo HIV-1)

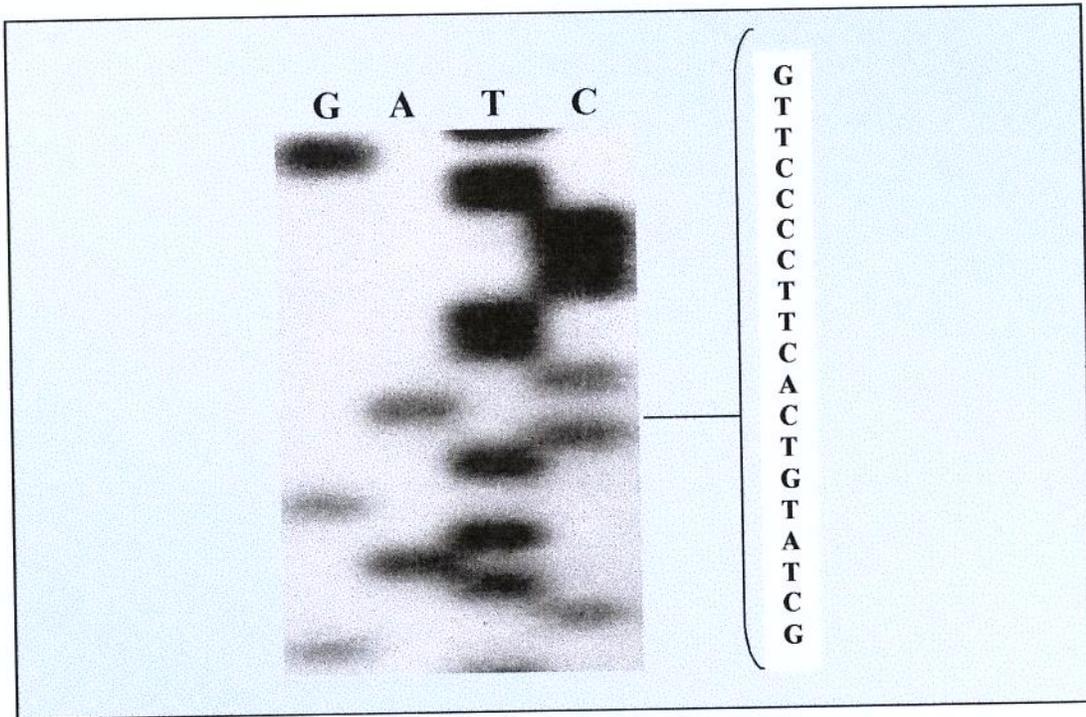
**C-:** Controle (-) para hibridação (paciente confirmadamente não infectado pelo HIV-1).

**P-:** Paciente negativo para infecção pelo HIV-1, pela Hibridação.

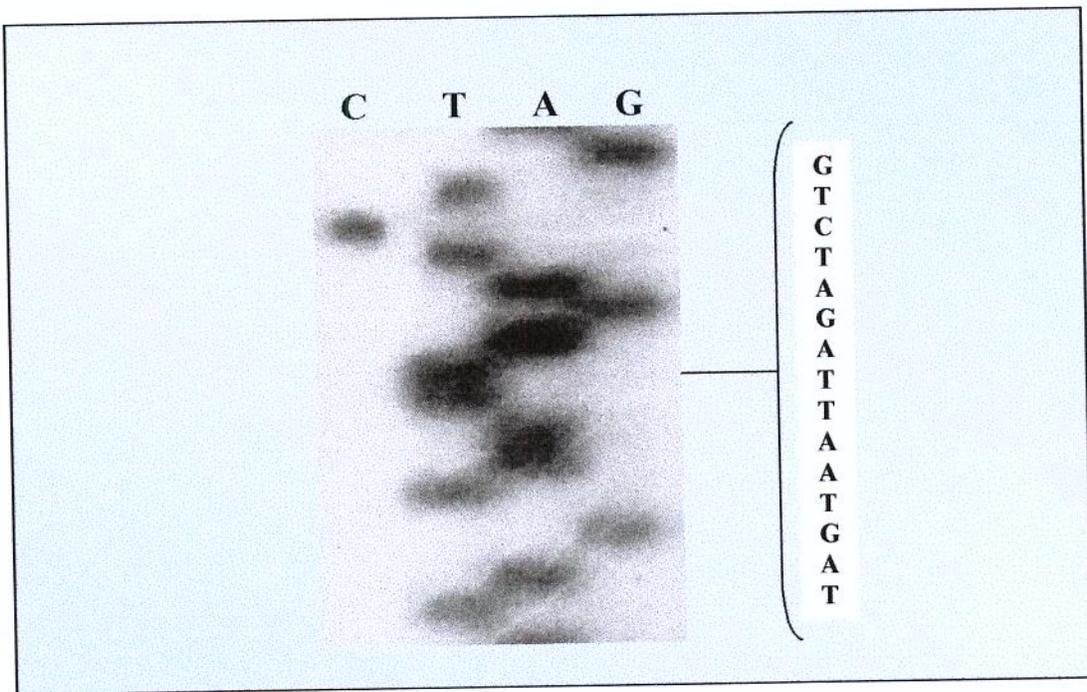
#### **4.8. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados, correspondentes às quatro regiões do HIV-1 selecionadas para o estudo.**

Realizou-se o seqüenciamento de algumas amostras positivas para infecção pelo HIV-1 pela “Nested-PCR”, a fim de se comprovar que as seqüências que estavam sendo amplificadas eram mesmo pertencentes ao código genético do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Os resultados obtidos através do seqüenciamento direto, pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977), foram quase totalmente idênticos aos do HIV-1, ou seja, houve identificação das seqüências selecionadas para diagnóstico do HIV-1 por “Nested –PCR”, com as descritas para o HIV-1 no GenBank.

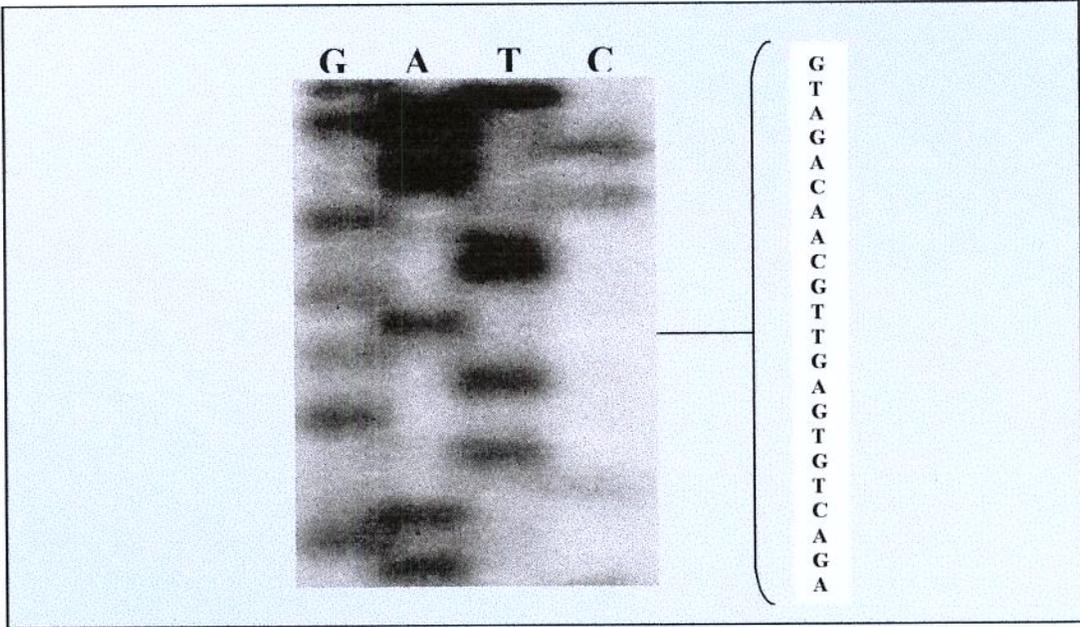
As figuras 10, 11, 12 e 13 demonstram os resultados obtidos pelo seqüenciamento e foram comparadas às descritas por GUILOON *et al.*, 1995 (GENBANK, accession U34604).



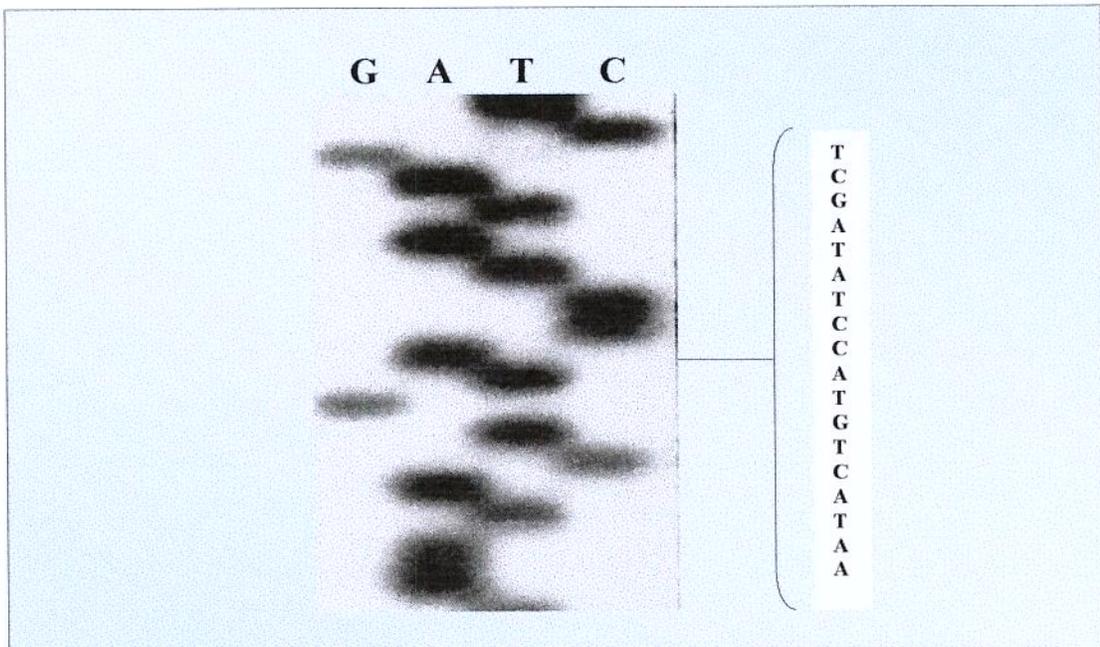
**Figura 10.** Seqüenciamento da região do gene *gag* do HIV-1, com utilização do “primer” JA6.



**Figura 11.** Seqüenciamento da região do gene *env* do HIV-1, com utilização do “primer” JA10



**Figura 12.** Seqüenciamento da região do gene *env* do HIV-1, com utilização do “primer” JA15.



**Figura 13.** Seqüenciamento da região do gene *pol* do HIV-1, com utilização do “primer” JA19.

**XXX**

***DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Durante as duas últimas décadas, a transmissão perinatal do HIV tem se tornado a maior causa do aumento de mortes em crianças nos Estados Unidos (SIMONDS & ROGERS, 1996). Segundo o “Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS)” estima-se que a cada ano, 350 mil crianças, nos países em desenvolvimento, infectem-se com o HIV, por transmissão perinatal (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1998).

Um teste eficaz, para diagnóstico precoce do HIV-1 em crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus, é essencial, para que se possa: iniciar terapia antiviral precoce; utilizar uma profilaxia contra infecções oportunistas; mudar a história natural da doença; iniciar um tratamento contra infecções bacterianas (PIETRELLA *et al.*, 1998) ou virais, como o citomegalovírus (CMV) que por isolamento viral e testes sorológicos tem demonstrado alta prevalência em crianças infectadas pelo HIV (FORBES, 1989; STEWART *et al.*, 1995; MUSSI-PINHATA *et al.*, 1998); evitar procedimentos desnecessários em pacientes que não estão infectados pelo vírus; reduzir a ansiedade pelo desconhecimento do diagnóstico, por parte dos responsáveis pela criança.

Os métodos sorológicos, para detecção do HIV-1 em crianças nascidas de mães infectadas, tornam-se problemáticos para esse tipo de diagnóstico, já que os anticorpos maternos da classe IgG, que atravessam, passiva ou ativamente, a placenta e podem permanecer circulantes, até aproximadamente os dezoito meses de idade; com isso, resultados falsos-positivos podem permanecer até este período. O transporte ativo da IgG da mãe para o feto, via placentária, é controlado, em parte, por receptores Fc, presentes nas células placentárias (MADURAI *et al.*, 1997).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), descrita por Saiki (SAIKI *et al.*, 1985), consiste em uma técnica para amplificação de segmentos específicos de DNA *in vitro*;

o método é extremamente sensível e permite a detecção de uma simples molécula de DNA (ALBERT & FENYÖ, 1990). A PCR tem sido o método virológico mais utilizado para diagnóstico da infecção pelo HIV durante a infância. O método diagnóstico de cultura do HIV tem demonstrado sensibilidade similar à obtida pela PCR, entretanto, trata-se de um método complexo, de alto custo, e um resultado definitivo da cultura viral não se torna disponível antes de 2 – 4 semanas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1998). Um estudo realizado (DUNN *et al.*, 1995), com finalidade de determinar a sensibilidade da PCR no período neonatal, em crianças com suspeita de infecção pelo HIV, mostrou 38% de crianças infectadas pelo HIV-1, positivas pela PCR até 48 horas após o nascimento; não sendo observada mudança substancial na sensibilidade da PCR, durante a primeira semana de vida da criança; porém, a sensibilidade desta técnica apresentou aumento rápido, durante a segunda semana de vida do paciente, elevando-se para 93% a porcentagem de crianças infectadas pelo vírus, que puderam ser identificadas por esta técnica (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1998). Outro estudo (KUHN *et al.*, 1996), em relação à sensibilidade da PCR, mostrou sensibilidade que superou 95%, para crianças com 39 dias de idade; entretanto, a sensibilidade da PCR, ao nascimento, foi de 22%, subindo para 42% no 4º dia de vida da criança, alcançando 73% de sensibilidade, no 14º dia de vida, e 90%, em 21 dias.

A fim de se aumentar a especificidade do teste da PCR, tem-se utilizado a “Nested-PCR” (2ª PCR), que reamplifica um fragmento interno do produto obtido pela primeira PCR (ALBERT & FENYÖ, 1990).

No presente trabalho realizou-se a padronização e aplicação da “Nested-PCR”, em pacientes acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Para tal, foram feitas, no mínimo, 2 coletas de sangue periférico

por paciente e no máximo, 4, para com isso ser possível a observação da fidelidade dos resultados da “Nested-PCR” entre as 4 regiões virais testadas (genes *gag*, *env* – 2 regiões, *pol*), durante as diferentes coletas.

Usou-se a “Nested-PCR”, por ser um método que não utiliza materiais radioativos, menos complexo e mais rápido, quando comparado à hibridação e por apresentar sensibilidade alta.

Um problema potencial com a alta sensibilidade da PCR é o risco de contaminação das amostras ou reagentes, com o DNA alvo pois a partir de pouquíssima quantidade, este pode ser amplificado e, conseqüentemente, pode gerar um resultado falso positivo (ALBERT & FENYÖ, 1990). Com a finalidade de se reduzir o risco de contaminação, durante as etapas da PCR, utilizaram-se neste trabalho normas de segurança anteriormente descritas em Casuística e Métodos; entretanto, como descrito no item (4.1.), apesar de todos os cuidados ocorreram problemas de contaminação no período de padronização e de aplicação do método exigindo com isso, a repetição da técnica em algumas situações, por pelo menos duas vezes. Em alguns casos foi possível detectar a origem da contaminação, como por exemplo reagentes contaminados, erros no momento de aliquotar o DNA no tubo de reação; porém, em certas situações não foi possível confirmação da origem da contaminação; entretanto, suspeita-se de contaminação por aerosol.

Além dos problemas de contaminação, outras intercorrências ocorreram durante a implantação da “Nested-PCR”, como situações, em que não houve amplificação do controle positivo de reação e de pacientes com positividade para praticamente todas as regiões virais e coletas testadas; nesses casos suspeita-se de inibição da reação, por algum fator não identificado no estudo, também, por erros no momento da prática laboratorial ou ainda por mutação gênica viral, já que na maioria dos casos, a região que

eventualmente tinha algum problema de amplificação pertencia ao gene *env* do HIV-1, que apresenta a alça V3, sendo esta a região viral de maior variabilidade (CASTRO, FERREIRA, BONGERTZ, 1994). Entretanto, esta situação apesar de rara ocorreu também, para os genes *gag* e *pol*, porém, para esses, após refeita a PCR a amplificação era observada.

Outra dificuldade foi em algumas reações, a presença de bandas inespecíficas, que comprometiam a visualização da banda de interesse; entretanto, este problema foi sendo minimizado durante a padronização da técnica, sendo que várias temperaturas, períodos, número de ciclos, concentrações e quantidades dos reagentes foram testados. A temperatura de pareamento dos “primers” com o DNA a 57°C e a concentração de MgCl<sub>2</sub> a 2,5mM proporcionaram uma ótima eliminação de inespecificidade no teste; entretanto, essa intercorrência ocorreu novamente, mas com inespecificidade que não comprometia a interpretação do resultado.

A amplificação de bandas com intensidade baixa (muito claras), dificultou algumas vezes a análise do resultado. Esse problema é explicado provavelmente pela presença de pouca quantidade de cópias do fragmento alvo do DNA, produto da PCR; portanto, para minimizar a ocorrência de tal fato fêz-se diversas variações, no programa pertencente à etapa da PCR que envolve a síntese do DNA através da enzima DNA Taq polimerase, encontrando-se com isso, uma situação que minimizou essa problemática, porém a eliminação total do problema não foi possível, pois esporadicamente ele ocorre.

Não ocorreu em nenhum paciente estudado, amplificação pela “Nested-PCR” em apenas uma ou duas regiões virais testadas.

Foi possível, neste estudo, a padronização de uma única programação (94°C durante 5’ por 1 ciclo; 94°C durante 30” por 30 ciclos; 57°C durante 30” por 30 ciclos; 75°C durante 30” por 30 ciclos e 75°C durante 5’ por 1 ciclo), para os dois passos da

PCR, sendo: 1ª PCR e “Nested-PCR”. Também padronizou-se a concentração única de MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), para todos os conjuntos de “primers” utilizados, para as duas etapas da PCR; em contraste ao estudo de Albert & Fenyö (ALBERT & FENYÖ, 1990), que utilizaram variações na temperatura de pareamento, para os 4 conjuntos de “primers” usados (50°C para os “primers” JA9 e JA12, JA10 e JA11, JA14 e JA15; 47°C para o conjunto JA4 e JA7; 45°C para JA13 e JA16; e 41°C para JA5 e JA6, JA17 e JA20, JA18 e JA19) e nas concentrações de MgCl<sub>2</sub> (7,0 mM para os “primers” JA4 e JA7, JA13 e JA16, JA17 e JA20; 4,0 mM para JA9 e JA12, JA14 e JA15; 3,0 mM para JA5 e JA6, JA10 e JA11, JA18 e JA19).

Os “primers” utilizados para 1ª PCR e “Nested-PCR”, pertencem a duas regiões mais conservadas do vírus (gene *gag* – “primers” JA4-JA7 e gene *pol* – “primers” JA17-JA20) e a uma região viral mais variável, que pertence ao gene *env* do HIV-1 (“primers” JA9-JA12 e JA13-JA16). O conjunto de “primers” JA9-JA12, foi desenhado para amplificar fragmento pertencente à região de maior diversidade do HIV-1, que corresponde à alça V3, (34 aminoácidos) (ROBERTSON *et al.*, 1992), da glicoproteína do envelope viral (PLANTIER *et al.*, 1998), a gp120, do gene *env* do HIV-1, que é o gene de maior variabilidade (HALAPI *et al.*, 1997). Nas 41 amostras analisadas, todos os conjuntos de “primers” funcionaram com êxito, principalmente os conjuntos que flanquearam regiões dos genes *gag* e *pol* do HIV-1 (JA4-JA7 e JA17-JA20 respectivamente), onde para esses não ocorreu, em nenhum paciente, alternância de resultados, ou seja, todos os pacientes considerados positivos ou negativos, tiveram positividade ou negatividade em 100% dos testes que incluíram esses dois genes. Já para os “primers” do gene *env* do HIV-1 (JA9-JA12 e JA13-JA16), os pacientes de números 4, 12, 37 apresentaram variações de resultados.

Os demais pacientes, apresentaram total concordância de resultados para todas as regiões virais testadas, incluindo o gene *env* provavelmente, por ser este o gene viral de maior diversidade (CASTRO, 1994).

De acordo com o critério de diagnóstico incluído neste estudo foi sugerida uma proporção de crianças infectadas pelo HIV-1 de 29,3% para as 41 analisadas, em acompanhamento no Hospital de Clínicas da UNICAMP. Entretanto, cabe ressaltar que os dados apenas sugerem essa proporção, já que o método sorológico ELISA, entrou como critério de diagnóstico, mesmo para crianças com idade inferior a 18 meses, sendo que nesse caso, o teste não é considerado padrão-ouro para diagnóstico perinatal do HIV-1 e também não foi avaliado o desempenho clínico por parte do paciente.

Estudos realizados na Europa, América do Norte e África, têm demonstrado um índice de transmissão vertical, variando entre 15% e 35% e o risco global da transmissão vertical do HIV-1 na população do Estado de São Paulo, estimado em 16% (TESS *et al.*, 1998).

Foi realizada a “Nested-PCR” com “primers” que flanqueiam região do gene da  $\beta$ -globina humano, como controle interno de reação, para uma das quatro regiões virais testadas, na 2ª coleta de cada paciente, a fim de se minimizar as chances de resultados falsos-negativos para a detecção da infecção pelo HIV-1 pela PCR. Os “primers” do gene da  $\beta$ -globina funcionaram eficientemente; entretanto ocorreram pequenas intercorrências relacionadas à contaminação do controle ‘branco’ de reação e não amplificação de algumas amostras, porém, esses problemas foram resolvidos com a repetição da técnica.

A hibridação com a sonda SK38 também foi realizada, tendo-se como objetivo a comparação entre os resultados obtidos pela “Nested-PCR”, com os observados por um outro método de altas sensibilidade e especificidade, a hibridação (GIRI *et al.*, 1994). Os

resultados da hibridação, mostraram concordância com os obtidos pela “Nested-PCR”, através do uso dos conjuntos de “primers” (JA4-JA8; JA9-JA12; JA13-JA16; JA17-JA20). Os resultados da hibridação (1,6,13,17,20 e 23) (Tabela 11) foram todos negativos havendo positividade, apenas para o controle positivo de reação, como obtido pela “Nested-PCR”.

Realizou-se também neste trabalho, o seqüenciamento pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977) de fragmentos do HIV-1 com os “primers” JA6, JA10, JA15 e JA19, a fim de se confirmar que as seqüências amplificadas pela “Nested-PCR” pertenciam realmente ao HIV-1. Os resultados do seqüenciamento demonstraram analogia entre as seqüências de fragmentos do HIV-1 obtidas pelo teste, com as já descritas e inseridas no GenBank.

O teste sorológico, para diagnóstico de anticorpos contra o HIV-1, utilizado, mais rotineiramente nas crianças com suspeita de infecção, via perinatal no Hospital de Clínicas da UNICAMP, onde o presente estudo foi desenvolvido, é o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Trata-se de um teste bastante sensível, entretanto, no diagnóstico da infecção pelo HIV-1, por transmissão vertical torna-se limitado, devido à presença dos anticorpos maternos da classe IgG, que como já citado, podem permanecer circulantes por 18 meses (BALOTA *et al.*, 1997; MOODLEY *et al.*, 1995).

Quando comparado ao ELISA, os dados obtidos, neste estudo, demonstraram uma detecção mais precoce do HIV-1 nas crianças com suspeita de infecção, via perinatal através da “Nested-PCR”, como esperado, já que os testes para detecção de anticorpos da classe IgG anti-HIV não podem ser usados como teste padrão, para indicar infecção em crianças com idade inferior a 18 meses (DOMACHOWSKE, 1996). Já a PCR e a cultura viral são provavelmente os ensaios mais sensíveis e específicos para detecção do HIV-1, em crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus (CENTERS FOR DISEASE

CONTROL, 1994; LAURE *et al.*, 1988). As tabelas 7.a, 7.b e 7.c, demonstram tais observações. A comparação entre as tabelas 7a e 7b (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> coletas), revela uma queda nos valores de ELISA positivos e um conseqüente aumento do número de ELISAs negativos (1<sup>a</sup> coleta: 86,84% de ELISA + e 2<sup>a</sup> coleta: 78,95% de ELISA +); essa queda, pode ser explicada pela eliminação dos anticorpos maternos da classe IgG, recebidos pela criança via perinatal; ou seja, com o passar do tempo, o número de testes falsos-positivos (criança positiva devido somente à presença dos anticorpos maternos) pelo ELISA, vai decaindo, mas como citado anteriormente, pode levar até aproximadamente 18 meses, para este acontecimento. Já a “Nested-PCR” manteve seus resultados de uma coleta a outra, sem qualquer variação, tendo 26,32% de positividade para infecção pelo HIV-1 e 76,38% de negatividade, para a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> coletas. A tabela 7.c. mostra alterações nos valores da “Nested-PCR”, devido ao fato de ter ocorrido diminuição do número total de crianças à 3<sup>a</sup> coleta de sangue periférico.

A transmissão perinatal do HIV-1 pode ocorrer no útero, durante o nascimento ou após o nascimento (BURTON *et al.*, 1996), e pode ser afetada pelo “status” da doença por parte materna, onde a alta carga viral durante a gestação e (ou) durante o nascimento, tem sido associada ao aumento do risco da transmissão perinatal do HIV-1 (WILLY *et al.*, 1998). A transmissão perinatal é influenciada da mesma forma, pelo tipo de parto ao qual a mãe é submetida; pela duração da ruptura da membrana; pela presença de complicações obstétricas, causando desta maneira, hemorragia ou infecção; pelo aleitamento materno (DOMACHOWSKE, 1996), e pelo colostro. Em 1985 foi descrito o isolamento do HIV-1 de células livres, no sobrenadante de leite materno de três mulheres infectadas pelo HIV-1 e também mencionou-se o isolamento do HIV-1 de componentes celulares do colostro (GUAY *et al.*, 1996).

No presente trabalho avaliou-se a proporção de crianças infectada pelo HIV-1 via vertical, em relação à administração ou não do leite materno por parte da mãe infectada à criança; entretanto, cabe enfatizar que os dados para positividade e negatividade para HIV-1 seguiram o critério de diagnóstico utilizado no estudo, com a utilização do ELISA antes dos 18 meses de idade, e que as informações foram obtidas somente por análise de prontuários médicos e não incluiu-se nos cálculos o período cuja criança recebeu aleitamento. As tabelas 7.a e 7.b mostram os resultados obtidos, para as 1ª e 2ª coletas de sangue. Essas duas tabelas são idênticas, já que o número de crianças foi o mesmo, e a “Nested-PCR” não apresentou variação em seus resultados.

De um total de 75% de crianças que não receberam aleitamento materno, 14,84% foram PCR (+) e 85,19% foram PCR(-), para detecção de infecção pelo HIV-1; o  $p=0,006$  pelo teste estatístico de Fisher sugeriu significância e co-relação com os dados para os quais o aleitamento materno é um fator contribuinte à infecção pelo HIV-1 via perinatal. Estudos têm demonstrado que o risco de transmissão vertical do HIV-1, através do aleitamento materno, varia aproximadamente de 5% a 12%. (LEROY *et al.*, 1998). Para a tabela 8.c., que representa a 3ª coleta de sangue periférico das crianças, o  $p=0,016$  permanece significativo, apesar do número total de crianças participantes dessa coleta ter decaído em relação às tabelas 8.a e 8.b.

Em relação ao tratamento contra o HIV-1, a utilização da Zidovudina (AZT) tem mostrado benefícios clínicos em adultos e crianças (NIELSEN *et al.*, 1995; WIZNIA *et al.*, 1996); e, por isso, tem se tornado padrão, para redução do risco de transmissão vertical do HIV-1 (BRYSON *et al.*, 1996).

Segundo “The Pediatric AIDS Clinical Trials Group” (ACTG), o estudo do protocolo 076 demonstra que a Zidovudina tem reduzido, significativamente, o risco de transmissão materno-fetal do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), de

22,6% para 7,6% (EASTMAN *et al.*, 1998). O uso da Zidovudina é aconselhável durante a gestação; no trabalho de parto, por via intravenosa; e deve ser prolongado à criança entre 8 – 12 horas após o nascimento e estendido por seis semanas. (MATHESON *et al.*, 1995).

No Hospital de Clínicas de Campinas, o fator associado à redução da infecção materno-fetal para gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana, baseada no uso de AZT a partir do terceiro trimestre de gestação, no momento do parto (por parte materna) e após o nascimento do feto, (por parte do recém-nato), já foi implantada regularmente desde o mês de agosto de 1996, pelo departamento de Ginecologia e Obstetrícia, juntamente com o departamento de Pediatria do Hospital, a fim de provocar uma queda da transmissão vertical nos recém-nascidos de mães infectadas pelo HIV-1, em acompanhamento neste Hospital.

Neste trabalho foi realizado uma análise entre o uso da zidovudina por parte materna, durante o período gestacional e os índices de positividade ou negatividade para HIV-1 obtidos pela “Nested-PCR”; ressaltando-se as mesmas limitações já citadas para análise do aleitamento materno e também o fato de não se levar em consideração nos cálculos, o período de uso do AZT, sua utilização durante e após o parto e dosagens.

As tabelas 9.a. 9.b. e 9.c. demonstram os resultados sugeridos pela “Nested-PCR”, para as crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV-1 que fizeram uso ou não de Zidovudina durante a gestação. As tabelas 9.a. e 9.b. são idênticas, já que o total de crianças para as 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> coletas manteve-se o mesmo e a “Nested-PCR”, não apresentou variação em seus resultados, tanto os positivos quanto os negativos. Os resultados propostos pela “Nested-PCR” sugeriram uma análise significativa,  $p= 0,05$  obtida pelo teste estatístico de Fisher para as crianças cujas mães utilizaram AZT, indicando significância quanto à utilização da Zidovudina durante a gestação, por parte materna, e

a redução do risco de contaminação pelo HIV-1 via perinatal (SHAH, LI, CHRISTENSEN, 1996; FISCUS, *et al.*, 1996).

Na tabela 9.c., também foi sugerida uma significância,  $p= 0,014$  (teste de Fisher) propondo também, uma diminuição da transmissão vertical do HIV-1 pelo uso do AZT pela mãe durante a gestação.

Apesar da terapia com Zidovudina, durante o período gestacional ter propiciado uma redução na transmissão materno-fetal do HIV-1, ainda não foi possível a eliminação total da transmissão (TESS *et al.*, 1998).

O uso de fatores associados à infecção pelo HIV-1, como a utilização do AZT no período gestacional, o não aleitamento materno e o parto do tipo cesarea, reduzem o risco da infecção pelo HIV-1 por via materno-fetal (ROGERS, 1994; NEWELL *et al.*, 1996; MAGUIRE *et al.*, 1997), sendo que o período de duração do rompimento da membrana é um determinante importante da transmissão do HIV-1 para a criança e sugere que essa variação de tempo pode, pelo menos parcialmente explicar a associação entre a transmissão vertical e o tipo de parto ao qual a mãe é submetida (LANDESMAN *et al.*, 1996).

Neste estudo utilizou-se os dados obtidos dos prontuários médicos dos pacientes e foi realizada uma análise da utilização conjunta de 3 fatores associados à infecção pelo HIV-1 entre eles, o não aleitamento materno, o uso do AZT durante a gestação pela gestante e o parto do tipo cesarea (Tabela 10.a.). Os dados sugeriram um percentual de 20% de positividade para infecção pelo HIV-1, para as crianças cujas mães utilizaram os fatores para redução da infecção pelo HIV-1, em contraste com 75% de positividade para as crianças cujas mães não fizeram uso dos fatores.

O número de crianças utilizadas nesta análise e expressas na tabela 10.a. e 10.b. foi muito reduzido, dificultando assim uma análise estatística significativa.

Em seu conjunto, os dados obtidos neste trabalho, aliados àqueles da literatura sugerem que o emprego da “Nested-PCR” pode ser indicado para o diagnóstico precoce da infecção pelo HIV-1, em crianças nascidas de mães infectadas pelo vírus e que a utilização de fatores associados à redução da infecção pelo HIV-1, via perinatal podem influenciar na redução da transmissão viral; cabendo ressaltar, entretanto, as limitações nos critérios de diagnóstico e na forma de obtenção das informações necessárias à realização da análise, utilizadas neste estudo.

**XXX**

***CONCLUSÕES***

## 6. CONCLUSÕES

1. Padronizou-se e aplicou-se a reação em cadeia da polimerase tipo “Nested” (“Nested-PCR”) para detecção precoce de partículas virais do HIV, no sangue periférico de crianças com idade inferior a 18 meses, nascidas de mães infectadas pelo vírus, em seguimento no ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da UNICAMP;
2. A “Nested-PCR” foi padronizada, para quatro regiões do genoma do HIV-1 (genes *gag*, *env* e *pol*), com utilização de uma mesma concentração de MgCl<sub>2</sub>, para os quatro pares de “primers” (JA4-JA7, JA9-JA12, JA13-JA16 e JA17-JA20) usados, sendo que foi também padronizada uma única programação (temperaturas, períodos e número de ciclos), para as primeira e segunda reações de amplificação;
3. Os resultados obtidos pela “Nested-PCR” sugeriram analogia em relação à estudos que demonstram a PCR, como sendo um método indicado para diagnóstico precoce do HIV-1, em crianças com suspeita de infecção perinatal, quando comparado ao método sorológico ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay), antes de 18 meses de idade e foi sugerida uma proporção de crianças infectadas de 29,3%;
4. Com base nos resultados obtidos pela “Nested-PCR” e nas informações dos prontuários médicos, a análise do uso da Zidovudina (AZT) por parte materna durante o período gestacional, o não aleitamento materno pela mãe infectada e o uso conjunto de 3 fatores associados à queda da transmissão perinatal do HIV-1 sugeriu significância na redução da transmissão vertical do HIV-1 na população estudada.

---

---

**XXX**

***SUMMARY***

---

---

## SUMMARY

The diagnosis of the HIV infection is usually set by serologic assays that identify specific antibodies against the HIV. However, the newborn can get the IgG class maternal antibodies, during the pregnancy, at the delivery time, or after birth, and thus, can present false-positive results up to about 18 months old. There are several other methods to the diagnosis of the HIV-1 in children, but, nowadays, PCR (polymerase chain reaction) is the one that is being suggested because it is a quick method with high sensitivity and specificity that can be risen by performing a 2<sup>nd</sup> amplification reaction (Nested PCR). The PCR detects target fragments of the viral genome.

Based on the necessity of an early diagnosis of the HIV-1, the present study had as goal the standardization of the Nested-PCR technique with the utilization of the primers that flank 4 preserved viral areas of the HIV-1 (gens *gag*, *env* – 2 areas and *pol*) to the detection of the HIV-1 and the application of the method in 41 infants (with at least 2 collects and at most 4 collects of the peripheral blood sample) followed at Hospital de Clínicas da UNICAMP, with suspicion of infection. The data allowed a comparative study between the diagnosis made by the “Nested-PCR” and the diagnosis obtained from the serologic immune enzymatic method, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), in spite of the children had been under 18 months old, they did not have the ELISA as a gold-standard test.

Based on the results of the Nested PCR, a rate of the HIV infected children who are being followed at the ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica and that were included in this work was evaluated. The influence of the use of Zidovudine (AZT), the type of the delivery (caesarian or normal), and the maternal breastfeeding were also analyzed since these factors are known to be influent to augment the HIV-1 perinatal transmission.

The positive results acquired by the Nested-PCR to the 1<sup>st</sup> peripheral blood collect of the children under study were 26,32%; to the 2<sup>nd</sup> collect, the same value was maintained, and to the 3<sup>rd</sup> collect, 26,67%. The positive results by ELISA, to the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> collects, were 86,84%, 78,95%, and 56,67% respectively.

The rate of the HIV infected children in the studied population was 29,3%. The analyzes of the association of the prophylactic use of AZT during the pregnancy period

presented 0,05% 'p' (obtained by the Fisher's test) to the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collects, and 0,014 to the 3<sup>rd</sup> collect. These results suggest that there was significance between the use of AZT (on the mother's side) and a reduction of the HIV-1 vertical transmission. Regarding the maternal breastfeeding the values of 'p' were: 0,006 (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> collects) and 0,016 (3<sup>rd</sup> collect), also suggesting association with the reduction of the HIV-1 vertical transmission in this population. The analysis from children whose mothers made use of the factors related to the reduction of the HIV infection via perinatal (use of AZT, during the pregnancy; cesarian delivery, and non maternal breastfeeding), showed a 20% percentage of the positiveness to the HIV-1 infection by Nested-PCR; yet in the children born from mothers that did not made any use of such factors, this percentage increased to 75%.

The results obtained by the "Nested-PCR" were confirmed in some of the samples, through the hybridization and the direct sequencing method of the HIV-1 genetics sequences.

The results obtained in this study suggest that the Nested-PCR is really an early and quick method to the diagnosis to the HIV-1 infection via perinatal.

The use of the factors related to the reduction of the perinatal HIV infection indicated to the infected pregnant suggested the influence in the reduction of the perinatal transmission of the virus in the studied population.

**XXX**

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, J. & FENYÖ, E.M. – Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. **J Clin Microbiol**, **28**: 1560-1564, 1990.
- ANTONI, B.A.; STEIN, S.B.; RABSON, A.B. – Regulation of human immunodeficiency virus infection: implications for pathogenesis In: MOROSCH, K.M.; MURPHY, F.A.; SHATKIN, A.J. – **Advance in Virus Research**. San Diego, California, Academic Press, Inc, 1994. p. 53-145.
- BAKSHI, S.S.; TETALI, S.; ABRAMS, E.J.; PAUL, M.O.; PAHWA, S.G. – Repeatedly positive human immunodeficiency virus type 1 DNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus-exposed seroreverting infants. **J Infect Dis**, **14**: 658-662, 1995.
- BALOTA, C.; COLOMBO, M.C.; COLUCCI, G.; VIGANÒ, A.; RIVA, C.; PAGAGNO, L.; VIOLIN, M.; CRUPI, L.; BRICALLI, D.; SALVAGGIO, A.; MORONI, M.; PRINCIPI, N.; GALLI, M. – Plasma Viremia and virus Phenotype are Correlates of Disease progression in Vertically human Immunodeficiency Virus Type 1 – Infected Children. **Pediatr Infect Dis J**, **16**: 205-211, 1997.
- BARIN, F.; COUROUCE, A.M.; PILLONEL, J.; BUZELAY, L. – Retrovirus Group of the French Society of Blood Transfusion. – Increasing diversity of HIV-1 M sorotypes in French blood donors over a 10-year period (1985-1995). **AIDS**, **11**: 1503-1508, 1997.
- BRYSON, Y.J. – Perinatal HIV-1 transmission: recent advances and therapeutic interventions. **AIDS**, **10**: (suppl. 3): S33-42, 1996.
- BURTON, G.L.; O'SHEA, S.; ROSTRON, T.; MULLEN, J.E.; AIYER, S.; SKEPPER, J.N.; SMITH, R.; BANATVALA, J. – Physical breaks in the placental trophoblastic surface: significance in vertical transmission of HIV. **AIDS**, **10**: 1294-1295, 1996.

- CARVALHO, M.B.; HAMERSCHLAK, N.; VAZ, R.S.; FERREIRA, O.C.J. – Risk factor analysis and serological diagnosis of HIV-1 / HIV-2 infection in a Brazilian blood donor population: validation of the World Health Organization strategy for HIV testing. **AIDS**, **10**: 1135-1140,1996.
- CASTRO, B.A; CHENG-MAYER, C.; EVANS, L.A.; LEVY, J.A. HIV heterogeneity and viral pathogenesis. - **AIDS**, **2**: S17-27, 1988.
- CASTRO, B.M.; FERREIRA, O.C.; BONGERTZ, V. – Vacinas contra HIV/AIDS: Desenvolvimento e Perspectivas. **Cadernos Técnicos do programa Nacional de doenças sexualmente Transmissíveis e AIDS**. Secretaria de Assistência à Saúde. Ministério da Saúde. Ano 1, jul **01**: 5-9, 1994.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. – Interpretation and Use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, **38**: 1-7, 1989.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. – 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definitions for AIDS among adolescents and adults. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, **41**: RR-17, 1992.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. – 1994 Revised classificatin system for human immunodeficiency vírus infection in children less than 13 years of age. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, **43**: 1-10, 1994.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL – Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, **47**: 1-43, 1998.
- CHIANG, C.S.; GROVE, T.; COOPER, M.; CUAN, J.; KOWALSKI, A.; PARCELLS, K.; TSUNOKAWA, M.; ROSENBERG, M.; ARCURI, E.; FRANKLIN, S.; SMITH, T.; DEBOUCK, C. – Development of a Confirmatory Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for HIV-1 Antibodies. **Clinical Chemistry**, **35**: 946-952, 1989.

- CLEWLEY, J.P. – The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. **Journal of Virological Methods**, **25**: 179-188, 1989.
- COFFIN, J.M. - The virology of AIDS. **AIDS**, **4** (suppl. 1): S1-8, 1990.
- COSTA, F.F. & COSTA, S.C.B. – Reação em cadeia da polimerase (PCR) princípios e aplicações clínicas. **Rev. Bras. Reumatol**, **32**: 142-146, 1992.
- COWAN, M.J.; HELLMANN, D.; CHUDWIN, D.; WARA, D.W. CHANG, R.S.; AMMANN, A.J. Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome. **Pediatrics**, **73**: 382-386, 1984.
- CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E.; MILLS, J.; MONTAIGNIER, L. – Structure and function of HIV. **MJA**, **164**: 161-171, 1996.
- CURRAN, J.W.; JAFFE, H.W.; HARDY, A.M.; MORGAN, W.M.; SELIK, R.M.; DONDERO, T.J. – Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United states. **Science**, **239**: 610-616, 1988.
- DOMACHOWSKE, J.B. – Pediatric human immunodeficiency virus infection. **Clin Microbiol Rev**, **9**: 448-469, 1996.
- DORENBaum A.; VENKATESWARAN, K.S.; YANG, G.; COMEAU, A.M.; WARA, D.; VYAS, G.N. – Transmission of HIV-1 in infants born to seropositive mothers: PCR-amplified proviral DNA detected by flow cytometric analysis of immunoreactive beads. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **15**: 35-42, 1997.

- DUNN, D.T.; BRANDT, C.D.; KRIVINE, A.; CASSOL, S.A.; ROQUES, P.; BORKOWSKY, W.; DE ROSSI, A.; DENAMUR, E.; ENRNST, A.; LOVEDAY, C.; HARRIS, J-A.; McINTOSH, K.; COMEAU, .A.M.; RAKUSAN, T.; NEWELL, M-L.; PECKHAM, C. - The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. **AIDS**, **9**: F7-F11,1995.
- EASTMAN, P.S.; SHAPIRO, D.E.; COOMBS, R.W.; FRENKEL, L.M.; McSHERRY, G.D.; BRITTO, P.; HERMAN, S.A.; SPERLING, R.S. – Maternal viral genotypic zidovudine resistance and infrequent failure of zidovudine therapy to p0revent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in pediatric AIDS clinical trials group protocol 076. **J Infect Dis**, **177**: 557-564, 1998.
- EDWARDS, J.R.; ULRICH, P.P.; WEINTRUB, P.S.; COWAN, M.J.; LEVY, J.A.; WARA, D.W.; VYAS, G.N. - Polymerase chain reaction compared with concurrent viral cultures for rapid identification of human immunodeficiency virus infection among high-risk infants and children. **J Pediatr**, **115**: 200-203, 1989.
- EMINI, E.A. – Hurdles in the path to na HIV-1 vaccine. **Scientific American**, may/jun: 38-47, 1995.
- FALLON, J.; EDDY, J.; WIENER, L.; PIZZO, P.A. – Human immunodeficiency virus infection in children. **J Pediatr**, **114**: 1-30, 1989.
- FFRENCH, R.; STEWART, G.J.; PENNY, R.; LEVY, J.A. – How HIV produces immune deficiency. **MJA**, **164**: 166-171, 1996.
- FISCUS, S.A.; ADIMORA, A.A.; SCHOENBACH, V.J.; LIM, V.; McKINNEY, R.; RUPAR, D.; KENNY, J.; WOODS, C.; WILFERT, C. – Perinatal HIV infection and the effect of zidovudine therapy on transmission in rural and urban counties. **JAMA**, **275**: 1483-1488, 1996.

- FORBES, B.A. – Acquisition of cytomegalovirus infection. **Clin Microbiol Rev**, **2**: 204-216, 1989.
- GALEL, S.A.; LIFSON, J.D.; ENGLEMAN, E.G. – Prevention of AIDS Transmission Trough Screening of The Blood Supply. **Annu Ver Immunol**, **13**: 201-227, 1995.
- GALLO, C.R. & MONTAIGNIER, L. – AIDS in 1988. **Scientific American**, **259**: 41:71, 1988.
- GALLO, R.C. – Human retroviruses: a decade od discovery and link with human disease. **J Infect Dis**, **164**: 235-243, 1991.
- GALVÃO-CASTRO, B.; JR, O.C.F.; BONGERTZ, V. – Vacinas contra HIV/AIDS: Desenvolvimento e perspectivas. **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS**. Secretaria de Assistência à Saúde. Ministério da Saúde Cadernos Técnicos, **1**: 5-9, 1994.
- GIRI, A.A.; LILLO, F.B.; MCDERMOTT J.L.; JANUZZI, C.; RISSO, S.; FORNIA, G.; CONCEDI, D.R.; VARNIER, O.E. – Detection of HIV-1 sequences in children using radioactive and colorimetric polymerase chain reactions. **Journal of Medicine Virology**, **42**: 414-419, 1994.
- GOUDSMIT, J.; LANGE, J.M.A.; PAUL, D.A.; DAWSON, G.J. – Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex, and subclinical human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis**, **155**: 558-560, 1987.
- GREENE, W.C. – The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **N Engl J Med**, **321**: 308-316, 1991.

- GUAY, L.A.; HOM, D.L.; MMIRO, F.; PIWOWAR, E.M.; KABENGERA, S.; PARSONS, J.; NDUGWA, C.; MARUM, L.; OLNESS, K.; KATAAHA, P.; JACKSON, J.B. – Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) DNA and p24 Antigen in Breast Milk of HIV-1-Infected Ugandan Women and Vertical Transmission. **Pediatrics**, **98**: 438-444, 1996.
- GUILLOIN, C.; BEDIN, F.; FOUCHIER, R.A.M.; SCHUITEMAKER, H.; GRUTERS, R.A. – Human immunodeficiency virus HIV-1, clone ACH320.2A.2.1, complete genome. GenBank, ACCESSION U34604, 1996.
- HALAPI, E.; LEITNER, T.; JANSSON, M.; SCARLATTI, G.; ORLANDI, P.; PLEBANI, A.; ROMITI, L.; ALBERT, J.; WIGZELL, H.; ROSSI, P. Correlation between HIV sequence evolution, specific immune response and clinical outcome in vertically infected infants. **AIDS**, **11**: 1709-1717, 1997.
- HANSELTINE, W.A. – Silent HIV Infections. - **N Engl J Med**, **320**: 1487-1489, 1989.
- HO, D.D.; Viral Counts Count in HIV Infection. **Science**, **272**: 1124-1125, 1996.
- HÖGLUND, S.; ÖHAGEN, A.; LAWRENCE, K.; GABUZDA, D. – Role of vif during the packing of the core of HIV-1. **Virology**, **201**: 349-355, 1994.
- HORSBURGH, C.R.J.; OU, C.Y.; JASON, J.; HOLMBERG, S.D.; LIFSON, A.R.; MOORE, J.L.; WARD, J.W.; SEAGE, G.R.; MAYER, K.H.; EVATT, B.L.; SCHOCHETMAN, G.; JAFFE, H.W. – Concordance of Polymerase Chain Reaction with Human Immunodeficiency Virus Antibody Detection. **J Infect Dis**, **162**: 542-545, 1990.
- HUSSON, R.N.; COMEAU, A.M.; HOFF, R. – Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants and children. **Pediatrics**, **86**: 2-10, 1990.
- INDACOCHEA, F.G.; & SCOTT, G.B. - Recent advances in the management of the HIV-infected infant. **AIDS**, **4**: 227-234, 1990.

- JOSEPHSON, S.L.; SWACK, N.S.; RAMIREZ, M.T.; HAUSLER, W.J.J. – Investigation of Atypical Western Blot (Immunoblot) Reactivity Involving Core Proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **J Clin Microbiol**, 27: 932-937, 1989.
- KÄMMERER, R.; BÜRGISSER, P.; FREI, P.C. – Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibodies of Noninfected Subjects Are Not Related to Autoantibodies Occuring in Systemic Diseases. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 2: 458-461, 1995.
- KELLOGG, D.E. & KWOK, S. - Detection of human immunodeficiency virus. In: INNIS, M.A.; GELFAND, A.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications** 1<sup>a</sup> edition, California Academic Press, Inc., 1990. Cap 40, p. 337-347.
- KIFFER, C.R.V.; LINS, A.L.G.P.; SANTOS, C.P.; BARONE, M.A.; FELIPE, Y.X. – Aconselhamento e exames para o HIV. In: LIMA, A.L.M.; KIFFER, C.R.; UIP,D;; OLIVEIRA, M.S.; LEITE, O.M. – **HIV/AIDS: perguntas e respostas**. São Paulo. Atheneu, 1995. p 75-92.
- KLINE, M.W.; HOLLINGER, F.B.; ROSENBLATT, H.M.; BOHANNON, B.; KOZINETZ, C.A.; SHEARER, W.T. - Sensitivity, specificity and predictive value of physical examination, culture and other laboratory studies in the diagnosis during early infancy of vertically acquired human immunodeficiency virus infection. **Pediatr Infect Dis J**, 12: 33-36, 1993.
- KUHN, L.; ABRAMS, E.J.; CHINCHILLA, M.; TSAI, W-Y.; THEA, D.M.; THE NEW YORK CITY PERINATAL HIV TRANSMISSION COLLABORATIVE STUDY GROUP. – Sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period. **AIDS**, 10: 1181-1182, 1996.

- LACKRITZ, E.M.; SATTEN, G.A.;GRASSE, J.A.; DODD, R.Y.; RAIMONDI, V.P.; JANSSEN, R.S.; LEWIS, W.F.; NOTARI, E.P.; PETERSEN, L.R. – Estimated Risk of Transmission of the Human Immunodeficiency Virus by Screened Blood In The United States. **N Engl J Med**, **333**: 1721-1725, 1995.
- LANDESMAN, S.H.; KALISH, L.A.; BURNS, D.N.; MINKOFF, H.; FOX, H.E.; ZORRILLA, C.; GARCIA, P.; FOWLER, M.G.; MOFENSON, L.; TUOMALA, R. – Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. **N Engl J Med**, **334**: 1617-1623, 1996.
- LAURE, F.; ROUZIOUX, C.; VEBER, F.; JACOMET, C.; COURGNAUD, V.; BLANCHE, S.; BURGARD, M.; GRISCELLI, C.; BRECHOTT, C. – Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet**, **3**: 538-540, 1988.
- LEROY, V.; NEWELL, M-L.; DABIS, F.; PECKHAM, C.; PERRE, P.V.; BULTERYYS, M.; KIND, C.; SIMONDS, R.J.; WIKTOR, S.; MSELLATI, P. – International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. **Lancet**, **352**: 597-600, 1998.
- LIFSON, A.R.; STANLEY, M.; PANE, J.; O'MALLEY, P.M.; WILBER, J.C.; STANLEY, A.; JEFFERY, B.; RUTHERFORD, G.W.; SOHMER, P.R. - Detection of human immunodeficiency virus DNA using the polymerase chain reaction in a well-characterzed group of homossexual and bissexual men. **J Infect Dis**, **161**: 436-439, 1990.
- LUCIW, P.A. – Human immunodeficiency virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. – **Fundamental Virology**, Philadelphia, Lippincott – Raven, 1996. p. 845-916.

- MACDONALD, K.S.; EMBREE, J.; NJENGA, S.; NAGELKERKE, N.J.D.; NGATIA, I.; MOHAMMED, Z.; BARBER, B.H.; NDINYA-ACHOA, J.; BWAYO, J.; PLUMMER, F.A. – Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. **J Infect Dis**, **177**: 551-556, 1998.
- MADURAI, S.; MOODLEY, D.; COOVADIA, H.M.; GOPAUL, W.; SMITH, A.N.; D.F. YORK. - Infant- maternal HIV-specific immunoglobulin G1 antibody ratios as an indicator of vertical transmission. **AIDS**, **11**: 1191-1193, 1997.
- MAGUIRE, A.; SÁNCHEZ, E.; FORTUNY, C.; CASABONA, J.; THE WORKING GROUP ON HIV-1 VERTICAL TRANSMISSION IN CATALONIA. – Potential risk factors for vertical HIV-1 transmission in Catalonia, Spain: the prospective role of cesarean section. **AIDS**, **11**: 1851-1857, 1997.
- MATHESON, P.B.; ABRAMS, E.J.; THOMAS, P.A.; HERNÁN, M.A.; THEA, D.M.; LAMBERT, G.; KRASINSKI, K.; BAMJI, M.; ROGERS, M.F.; HEAGARTY, M.; The new york city perinatal hiv transmission collaborative study group. – Efficacy of Anteneonatal Zidovudine in Reducing Perinatal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **J Infect Dis**, **172**: 353-358, 1995.
- MELLORS, J.W.; RINALDO, C.R.J.; GUPTA, P.; WHITE, R.M.; TODD, J.A.; KINGSLEY, L.A. – Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. **Science**, **272**: 1167-1170, 1996.
- MOODLEY, D.; BOBAT, R.A.; COUTSODIS, A.; COOVADIA, H.M. – Predicting perinatal human immunodeficiency virus infection by antibody patterns. **Pediatr Infect Dis J**, **14**: 850-852, 1995.
- MORGAN, G.; WILKINS, H.A.; PEPIN, J.; JOBE, O.; BREWSTER, D.; WHITTLE, H. - AIDS following mother-to-child transmission of HIV-2. **AIDS**, **4**: 879-882, 1990.

- MUSSI-PINHATA, M.M.; YAMAMOTO, A.Y.; FIGUEIREDO, L.T.M.; CERVI, M.C.; DUARTE, G. – Congenital and perinatal cytomegalovirus infection in infants born to mothers infected with human immunodeficiency virus. **J Pediatr**, **132**: 285-290, 1998.
- NEWELL, M.L.; LOVEDAY, C.; DUNN, D.; KAYE, S.; TEDDER, R.; PECKHAM, C.; MARIA, A.; GIAQUINTO, C.; OMENACA, F.; CANOSA, C.; MÛR, A. – Use of polymerase chain reaction and quantitative antibody tests in children born to human immunodeficiency virus- 1- infected mothers. **J Med Virol**, **47**: 330-335, 1995.
- NEWELL, M.L.; DUNN, D.T.; PECKHAM, C.S.; SEMPRINI, A.E. – Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. **AIDS**, **10**: 1675-1681, 1996.
- NIELSEN, K.; WEI, L.S.; SIM, M.S.; DEVEIKIS, A.; KELLER, M.; STIEHM, E.R.; FRENKEL, L.M.; BRYSON, Y.J. – Correlation of Clinical Progression in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children with In Vitro Zidovudine Resistance Measured by a Direct Quantitative Peripheral Blood Lymphocyte Assay. **J Infect Dis**, **172**: 359-364, 1995.
- OLIVEIRA, M.S.; SILVA, A. C.C.M.; FILHO, O.F.A.; GERALDES, S.M. – Aspectos clínicos e tratamentos específicos-manifestações pediátricas. In: LIMA, A.L.M.; KIFFER, C.R.; UIP,D.; OLIVEIRA, M.S.; LEITE, O.M. – **HIV/AIDS: perguntas e respostas**. São Paulo. Atheneu, 1995. p. 225-245.
- OLIVEIRA, L.H. – AIDS a 1% da cura. **SuperInteressante**, nº **10**: 38-45, 1996.
- PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A.S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**, **328**: 328-335, 1993.

- PIETRELLA, D.; MONARI, C.; RETINI, C.; PALAZZETTI, B.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. - Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 impairs intracellular antifungal mechanisms in human monocytes. **J Infect Dis**, **177**: 347-54, 1998.
- PLANTIER, J.C.; POGAM, S.L.; POISSON, F.; BUZELAY, L.; LEJEUNE, B.; BARIN, F. – Extent of antigenic diversity in the V3 region of the surface glycoprotein, gp120, of human immunodeficiency virus type 1 group M and consequences for serotyping. **J Virol**, **72**: 677-683, 1998.
- POLLET, D.E.; SAMAN, E.L.; PEETERS, D.C.; WARMENBOL, H.M.; HEYNDRIKX, L.M.; WOUTERS, C.J.; BEELAERT, G.; GROEN, G.; HEUVERSWYN, H.V. – Confirmation and Differentiation of Antibodies to Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 with a Strip-Based Assay Including Recombinant antigens and Synthetic Peptides. **Clinical Chemistry** , **37**: 1700-1707, 1991.
- ROBERTSON, C.A.; MOK, J.Y.Q.; FROEBEL, K.S.; SIMMONDS, P.; BURNS, S.M.; MARSDEN, H.S.; GRAHAM, S. – Maternal antibodies to gp120 V2 sequence do not correlate with protection against vertical transmission of human immunodeficiency virus. **J Infect Dis**, **166**: 704-709, 1992.
- ROGERS, M. - Prevention of Materno-Fetal Transmission of HIV. Tenth International Conference on AIDS. UCLA – AIDS Institute; August 12, Pacific Convention Plaza. Yokohama, Japan, 1994.
- ROSEN, C.A. & PAVLAKIS, G.N. – Tat and rev: positive regulators of HIV gene expression. **AIDS**, **4**: 499-509, 1990.
- ROUZIOUX, C. – Le diagnostic de l'infection par VIH chez l'enfant. **Annales De Pédiatrie**, **43**: 14-30, 1996.

- RUBINI, N.P. – Avaliação laboratorial na infecção pelo HIV. **Prática Hospitalar**, 33-40, 1995.
- SABINO, E.C.; DIAZ, R.S.; BRIGIDO, L.F.; LEARN, G.H.; MULLINS, J.I.; REINGOLD, A.L.; DUARTE, A.J.S.; MAYER, A.; BUSCH, M.P. - Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. **AIDS**, 10: 1579-1584, 1996.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, A.; ARNHEIM, E.N. – Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell and anemia. **Science**, 230: 1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. – **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, 2 ed. New York, Cold Spring Harbor, Laboratory, 1989.
- SANCHEZ-PESCADOR, R.; POWER, M.D.; BARR, P.J.; STEIMER, K.S.; STEMPIEN, M.M.; BROWN – SHIMER, S.L.; GEE, W.W.; RENARD, A.; RANDOLPH, A.; LEVY, J.A.; DINA, D.; LUCIW, P.A. – Nucleotide sequence and expression of AIDS – associated retrovirus (ARV – 2). **Science**, 227: 484–492, 1985.
- SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A.R. – DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74: 5463-5467, 1977.
- SAYRE, K.R.; DODD, R.Y.; TEGTMEIER, G.; LAYUG, L.; ALEXANDER, S.S.; BUSCH, M.P. – False-positive human immunodeficiency virus type 1 Western blot tests in noninfected blood donors. **Transfusion**, 36: 45-52, 1996.
- SCHACKER, T.W.; HUGHES, J.P.; SHEA, T.; COOMBS, R.W.; COREY, L. – Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, 128: 613-620, 1998.

- SCHLEUPNER, C.J. – Diagnostic testes for HIV-1 infection. **Principles and Praticce of infectious Diseases**, 1: 1-15, 1988.
- SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, S.P. Programa DST/AIDS - Mortalidade no Estado de São Paulo. Equipe de Vigilância Epidemiológica do Programa de DST/AIDS/CVE, **Boletim Epidemiológico**, 2 23p, 1998.
- SHAH, M.M.; LI, Y.; CHRISTENSEN. – Effects of perinatal zidovudine on hematopoiesis: a comparison of effects on progenitors from human fetuses versus mothers. **AIDS**, 10: 1239-1247, 1996.
- SIMONDS, R.J. & ROGERS, M. – Preventing perinatal HIV infection. **JAMA**, 275: 1514-1515, 1996.
- SLAVIK, T.; WOLFAARDT, M.; ZYL, H.V.; SIMSON, I.W. – Retrospective determination of HIV-1 status by a PCR method on paraffin wax embedded sections. **J Clin Pathol**, 48: 733-736, 1995.
- STEKETEE, R.W.; ABRAMS, E.J.; THEA, D.M.; BROWN, T.M.; LAMBERT, G.; ORLOFF, S.; WEEDON, J.; BAMJI, M.; SCHOENBAUM, E.E.; RAPIER, J.; KALISH, M.L.; THE NEW YORK CITY PERINATAL HIV TRANSMISSION COLLABORATIVE STUDY. – Early detection of perinatal human immunodeficiency virus (HIV) type 1 minfection using HIV RNA amplification and detection. **J Infect Dis**, 175: 707-711, 1997.
- STRATHDEE, S.A.; FRANK, J.W.; MCLAUGHLIN, J.; LEBLANC, M.; MAJOR, C.; O'SHAUGHNESSY, M.V.; READ,S.E. – Quantitative Measures of Human immunodeficiency Virus-Specific Antibodies Predict Progression to AIDS. **J Infect Dis**, 172: 1375-1379,1995.

- STEWART, J.A.; REEF, S.E.; PELLETT, P.E.; COREY, L.; WHITLEY, R.J. Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**, **21** (suppl 1): S114-20, 1995.
- TESS, B.H.; RODRIGUES, L.C.; NEWELL, M.L.; DUNN, D.T.; LAGO, T.D.G.; and the São Paulo Collaborative study for Vertical Transmission of HIV-1. Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in Sao Paulo State, Brazil. **AIDS**, **12**: 513-520, 1998.
- VARMUS, H. - Retroviruses. **Science**, **240**: 1427-35, 1988.
- WILFERT, C.M. & MCKINNEY, R.E.J. - When children harbor HIV. **Scientific American**, jul: 74-75, 1998.
- WILLIAMS, P.; SIMMONDS, P.; YAP, P.L.; BALFE, P.; BISHOP, J.; BRETTELE, R.; HAGUE, R.; HARGREAVES, D.; INGLIS, J.; BROWN, A.L.; PEUTHERER, J.; REBUS, S.; MOK, J. - The polymerase chain reaction in the diagnosis of vertically transmitted HIV infection. **AIDS**, **4**: 393-398, 1990.
- WILLY, M.E.; HOOVER, D.R.; HALSEY, N.A.; MALONEY, E.M.; PATE, E.J.; WIKTOR, S.Z.; BLATTNER, W.A.; MANNING, A. - Primary human immunodeficiency virus type 1 infection during pregnancy associated with transmission of SI/MT-2 cell tropic virus and precipitous loss of CD4 cells in mother and infant. **Pediatr Infect Dis J**, **17**: 528-530, 1998.
- WIZNIA, A.A.; CRANE, M.; LAMBERT, G.; SANSARY, J.; HARRIS, A.; SOLOMON, L. - Zidovudine use to reduce perinatal HIV type 1 transmission in a urban medical center. **JAMA**, **275**: 1504-1506, 1996.

- ZAZZI, M.; ROMANO, L.; CATUCCI, M.; DE MILITO, A.; ALMI, P.; GONNELLI, A.; RUBINO, M.; VALENSIN, P.E. – Low human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA burden as a major cause for failure to detect HIV-1 DNA in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol*, **33**: 205-208, 1995.
- ZIEGLER, J.B.; BLANCHE, S.; LOH, R. – Children with HIV. *JAMA*, **164**: 672:679, 1996.
- ZÖLLNER, B.; FEUCHT, H-H.; MATTNER, U.M.; HELING-GIESE, G.; BAUMGARTNER, E.M.; LAUFS, R. - Better prediction of vertical HIV-1 transmission from maternal blood at delivery compared with cor blood samples. *AIDS*, **10**: 1600-1601, 1996.

**XXX**

***APÊNDICE***

---

## 9. APÊNCICE

**Apêndice 1.** Resultados dos testes ELISA e “Nested-PCR” para diagnóstico da infecção pelo HIV-1 para as 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas de sangue periférico de cada criança estudada.

Crianças	PCR 1 <sup>a</sup> coleta	ELISA 1 <sup>a</sup> coleta	PCR 2 <sup>a</sup> coleta	ELISA 2 <sup>a</sup> coleta	PCR 3 <sup>a</sup> coleta	ELISA 3 <sup>a</sup> coleta	PCR 4 <sup>a</sup> coleta	ELISA 4 <sup>a</sup> coleta
1	-	+	-	+				
2	-	+	-	+				
3	-	-	-	-				
4	+	+	+	+				
5	-	+	-	+				
6	-	+	-	-				
7	+	+	+	+				
8	+	+	+	+				
9	-	+	-	+				
10	-	+	-	+				
11	-	+	-	+	-	-		
12	+	+	+	+	+	+		
13	-	+	-	+	-	+		
14	-	+	-	+	-	+		
15	-	-	-	-	-	-		
16	+	+	+	+	+	+		
17	-	+	-	+	-	-		
18	-	+	-	+	-	-		
19	-	-	-	-	-	-		
20	-	-	-	-	-	-		
21	-	-	-	-	-	-		
22	-	+	-	+	-	-		
23	-	+	-	-	-	-		
24	+	+	+	+	+	+		
25	+	+	+	+	+	+		
26	-	+	-	+	-	+		
27	-	+	-	+	-	+		
28	-	+	-	+	-	-		
29	-	+	-	+	-	-		
30	+	+	+	+	+	+		
31	+	+	+	+	+	+		
32	+	+	+	+	+	+		
33	-	+	-	+	-	+	-	-
34	+	+	+	+	+	+	+	+
35	-	+	-	-	-	-	-	-
36	-	+	-	+	-	+	-	S. Inf.*
37	+	+	+	+	+	+	+	+
38	-	+	-	+	-	+	-	-
39	-	+	-	+	-	-	-	-
40	-	+	-	+	-	+	-	+
41	-	+	-	+	-	+	-	-

\* Informação não encontrada no prontuário médico da respectiva