UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do
herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco
epidemiológico e em população sadia de São Paulo**

Paulo Henrique Lage Carbone

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

São Paulo
2002

Paulo Henrique Lage Carbone

**Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do
herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco
epidemiológico e em população sadia de São Paulo**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo
orientador/presidente

Profa. Dra. Mirthes Ueda
(1º. examinador)

Profa. Dra. Kioko Takei
(2º. examinador)

São Paulo, 21 de fevereiro de 2003.

“A inteligência é o farol que nos guia,
mas é a vontade que nos faz caminhar”

Aos meus pais, José Carbone Filho e Neusa Lage Carbone,
que quando vivos, foram os responsáveis pela minha
formação acadêmica e incentivadores incondicionais.
Minha eterna gratidão e saudades.

À minha irmã, Neusa Maria Carbone Aires,
pelo carinho e incentivo constantes.

À Dita, nosso Anjo da Guarda,
pela dedicação dispensada à nossa família.

Ao Joel Rogério, pela amizade, companheirismo
e pelos mapas apresentados na dissertação.

Dedico este trabalho

À Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo, por ter me recebido
em seu laboratório e pela participação ativa,
entusiasmada e decisiva na elaboração
e execução desse trabalho.

Muito obrigado, principalmente,
por me mostrar o que é trabalhar
com dedicação, respeito e competência.

Agradecimentos

À Pesquisadora Científica Elizabeth de los Santos Fortuna da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na manutenção das linhagens celulares, na padronização dos ensaios de Imunofluorescência Indireta LANA e Lítico e na leitura das lâminas.

À bióloga Sandra Elisa Lopes Cibella da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na execução dos ensaios de Western Blot LANA e Lítico e de Imunofluorescência Lítico e na tabulação dos resultados.

Ao Pós-Graduando da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e estagiário da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, Abdiel Aparecido Moreira pelo auxílio na padronização e execução dos ensaios de Western Blot LANA e Lítico.

À Profa. Dra. Sabina Lea Davidson Gotlieb da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pelas sugestões na forma de apresentação dos resultados e ao Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela aplicação dos testes estatísticos.

Às médicas Eliana Rodrigues da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Luisa Keiko Oyafuso do Instituto de Infectologia Emílio Ribas pelo encaminhamento das biópsias dos casos com sarcoma de Kaposi.

Aos médicos Jamal Suleiman e Luiz Alberto Costa Barra do Instituto de Infectologia Emílio Ribas pelo encaminhamento das amostras de soro dos pacientes com sarcoma de Kaposi e dos casos infectados pelo HIV/AIDS sem sarcoma de Kaposi.

Ao Dr. Fábio Leôncio Borstein Martinelli do Instituto de Infectologia Emílio Ribas pelo levantamento dos prontuários dos pacientes.

À Profa. Dra. Kioko Takei da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela sugestão em analisar casuística do Centro Espírita Nosso Lar - Casas André Luiz, por facilitar a interlocução com profissionais desta Instituição e pelas sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Frederico Camelo Leão, Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro Espírita Nosso Lar - Casas André Luiz, pela auxílio para procedimento de pedido de autorização para utilização de soros estocados de pacientes e funcionários desta Instituição e à Dra Sonia M. Kulik pelo levantamento dos dados dos casos que resultaram sorologia positiva.

À Profa. Dra. Mirthes Ueda pelo incentivo e sugestões apresentadas no exame de qualificação.

À Todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos

**Trabalho realizado na Seção de Imunologia
do Serviço de Microbiologia e Imunologia
da Divisão de Biologia Médica
do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP.**

Apoio Financeiro:

**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
de São Paulo (FAPESP) processo # 98/13313-
5.**

**Instituto Adolfo Lutz de São Paulo projeto #
35/99**

Bolsa Mestrado CNPq

Sumário

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Quadros e Tabelas	v
Resumo	viii
Summary	x
Introdução	1
Objetivos	29
Casuística e Métodos	30
Casuística	
• Indivíduos sadios normais	30
• Indivíduos com deficiência mental e/ou física	30
• Indivíduos HIV/AIDS	31
• Pacientes com sarcoma de Kaposi	32
Métodos	
• Ensaio Imunoenzimático (ELISA-ABI)	33
• Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI-ABI)	34
• Ensaio de Imunofluorescência Indireta “in house”	35
Manutenção e cultivo de linhagem BCBL-1	35
Preparo das Lâminas	36
Ensaio de IFI-LANA	37
Manutenção e cultivo de linhagem de células Ramos	38
Absorção dos soros com células HEp2	40
Padronização do ensaio IFI-Lítico	40

• “Western Blot” (WB-LANA e WB-Lítico)	42
Preparo do antígeno LANA	42
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	42
“Western Blotting”	44
Determinação do Peso Molecular (PM)	46
• Reação em cadeia de polimerase (PCR)	46
Apresentação e análise dos resultados	47
Resultados	
Descrição dos resultados	49
Quadros, Tabelas e Figuras	56
Discussão	68
Conclusões	87
Referências Bibliográficas	88
Anexos	
Anexo A	117
Quadro de bibliografia relacionada com estudos de soro- prevalência de infecção HHV-8 usando IFI-LANA e IFI-Lítico	
Anexo B	127
Conjunto de reagentes do ELISA-ABI	
Anexo C	127
Conjunto de reagentes da IFI-ABI	
Anexo D	128
Meios de Cultura	
Meio de cultura para célula BCBL-1	
Meio de cultura para célula Ramos	
Meio de cultura para célula Hep2	
Anexo E	130
Soluções utilizadas na IFI-LANA e IFI-Lítico	
PBS	

Tampão carbonato de sódio
Tampão bicarbonato de sódio
Glicerina tamponada
Azul de Evans
PBS/Leite 1%

Anexo F

131

Soluções utilizadas no SDS-PAGE

Solução A
Solução B
Solução C
SDS 20%
Persulfato de amônio a 10%
Tampão de corrida
Tampão de ruptura
Gel de separação
Gel de empilhamento

Coloração de proteínas com Comassie blue

Solução fixadora
Corante Comassie blue
Solução descorante

Anexo G

135

Soluções utilizadas no WB-LANA e WB-Lítico

Soluções utilizadas na transferência

Tampão de transferência
Corante para controle da transferência
TRIS-salina
Solução bloqueadora
Corante de revelação da reação

Anexo H

137

Conjugado utilizado na IFI-LANA e IFI-Lítico

Conjugado anti-IgG humano marcado com
Fluoresceína

Conjugado utilizado no WB-LANA e WB-Lítico

Conjugado anti-IgG humano marcado com
Peroxidase

Anexo I

138

Quadro 3A

Anexo J

147

Trabalho publicado na revista *AIDS*

Lista de Abreviaturas

aa	Aminoácido
Ag	Antígeno
“Cut off”	Limiar de positividade
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BC-1	Linhagem celular de fluido ascítico humano duplamente infectada pelo EBV e HHV-8
BC-2	Linhagem celular de fluido ascítico humano duplamente infectada pelo EBV e HHV-8
BC-3	Linhagem celular de fluido ascítico humano infectada pelo HHV-8
BCBL	“Body Cavity-Based Lymphoma” – linfoma de células B com efusão em cavidades
BCBL-1	Linhagem celular obtida de linfoma de células B com efusão em cavidades
BCBL-AIDS	Linfoma de células B com efusão em cavidades associado à AIDS
BCP-1	Linhagem celular de sangue periférico humano infectada pelo HHV-8
BHK-21	Linhagem de fibroblasto de rim de hamster
bp	Pares de bases nitrogenadas
C	Citosina
CDC	“Center for Diseases Control and Prevention”, Atlanta, EUA
CENLICAL	Centro Espírita Nosso Lar - Casas André Luiz
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DST	Doença sexualmente transmissível
EBV	Vírus Epstein Barr
ELISA-ABI	Ensaio imunoenzimático da Advanced Biotechnologies Inc.
ELISAr	Ensaio imunoenzimático com proteína recombinante
FLICE	“Fas-associated death domain-like interleukin-1(β) converting enzyme”
FLIP	Proteína inibitória da FLICE
g	Força centrífuga
G	Guanina
gp B	Glicoproteína B
h	Hora
HBL-6	Linhagem celular de fluido ascítico humano duplamente infectada pelo EBV e HHV-8
HBV	Vírus da hepatite B
HEp2	Linhagem de célula epitelial proveniente de carcinoma hepatocelular
HHV-3	Herpesvírus humano tipo 3
HHV-4	Herpesvírus humano tipo 4
HHV-5	Herpesvírus humano tipo 5
HHV-6	Herpesvírus humano tipo 6
HHV-7	Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HSV	Herpesvírus saimiri
HSV-1	Herpesvírus simples tipo 1
HSV-2	Herpesvírus simples tipo 2
HTLV	Vírus Linfotrópico de células T humanas
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IB	Ensaio de “Immunoblotting”
IFI	Ensaio de Imunofluorescência Indireta
IFI-ABI	Ensaio de Imunofluorescência Indireta da Advanced Biotechnologies Inc.
IFI-LANA	Ensaio de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos a

	antígenos de fase latente viral
IFI-Lítico	Ensaio de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica viral
IFIr	Ensaio de imunofluorescência indireta com proteína recombinante
IgG	Imunoglobulina G
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
Kb	Quilo pares de bases nitrogenadas

Cont. Lista de Abreviaturas

KDa	Quilo Dalton
KS	" <i>Kaposi's sarcoma</i> "
KS-1	Linhagem celular de fluido ascítico humano infectada pelo HHV-8
KSHV	" <i>Kaposi's sarcoma herpesvirus</i> "
MCD-HIV	" <i>Multicentric Castleman's disease</i> " associada ao HIV
MIFA	Ensaio de Imunofluorescência com anticorpo monoclonal
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NR	Não realizado
ORF	" <i>Open reading frame</i> " - região aberta de leitura
p/v	Peso/volume
p53	Proteína de 53 KDa
PA	Para análise
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	" <i>polymerase chain reaction</i> "- reação em cadeia da polimerase
PEL	" <i>primary effusion lymphoma</i> "- linfoma de efusão em cavidades
pH	Concentração hidrogênio-iônica
PHLS	Public Health Laboratory Service of London
PM	Peso Molecular
PMA	" <i>phorbol myristate acetate</i> "- forbol éster
pt.	paciente
RDA	" <i>Representational Difference Analysis</i> "
Rf	" <i>Reference front</i> "
RIPA	Ensaio de radioimunoprecipitação
RPHV	Herpesvírus da fibrose retroperitoneal
RRV	Radinovírus de macaco Rhesus
rSFV	" <i>recombinant semliki Forest viruses</i> "
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
SK	Sarcoma de Kaposi
SK-AIDS	Sarcoma de Kaposi associado à infecção HIV/AIDS ou Sarcoma de Kaposi epidêmico
tat	Proteína transativadora do HIV
TMB	Tetra metil benzidina
TPA	" <i>tetradecanoyl phorbol ester acetate</i> "
TR	" <i>terminal repeat</i> " ou regiões repetitivas
Tris-HCl	Tampão Tris-ácido clorídrico
TY-1	Linhagem celular de fluido pericárdico humano infectada pelo HHV-8
V	Volts

v/v	Volume a volume
vBcl-2	"viral B-cell leukemia/lymphoma-2"
vFLIP	Proteína viral inibitória da FLICE
vGPCR	Receptor acoplado a proteína G viral
vIL-6	Interleucina 6 viral
vMIP-I,II,III	Proteínas virais inflamatórias semelhantes às de macrófagos tipos I, II e III
VP 16	Proteína de capsídeo viral de 16 KDa
VZV	Vírus da varicela zoster
WB	Ensaio de "Western Blotting"
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	micromoles

Lista de Figuras

Figura A. Capsídeos e nucleocapsídeos de HHV-8 no núcleo de células BCBL-1 infectadas e estimuladas com forbol éster	5
Figura B. Partículas virais maduras em vesícula no citoplasma de células BCBL-1 infectadas e estimuladas com forbol éster	5
Figura C. Partícula HHV-8 em cisterna entre a membrana nuclear interna e externa de células KS-1	5
Figura D. Partícula HHV-8 no exterior de células KS-1	5
Figura E. Representação esquemática de herpesvírus	5
Figura F. Representação esquemática simplificada do genoma HHV-8 na sua forma linear	8
Figura G. Genoma HHV-8 na forma linear	9
Figura H. Genoma HHV-8 na forma episomal	10
Mapa A. Soroprevalência de infecção HHV-8 na Itália em população sadia	21
Mapa B. Soroprevalência de infecção HHV-8 na África em população sadia	22
Mapa C. Soroprevalência de infecção HHV-8 nos vários continentes em população sadia	26
Mapa D. Soroprevalência de infecção HHV-8 nos vários continentes	27

em população infectada pelo HIV/AIDS

Figura 1A. Padrão de coloração obtido com soro positivo para a infecção HHV-8 no ensaio de IFI-LANA	38
Figura 1B. Padrão de coloração obtido com soro negativo para a infecção HHV-8 no ensaio de IFI-LANA	38
Figuras 2A e 2B. Padrão de coloração obtido com soros positivos para a infecção HHV-8 no ensaio de IFI-LANA e negativos no WB-LANA quando testados na IFI-Ramos	39
Figura 3A. Padrão de coloração obtido com soro positivo para a infecção HHV-8 no ensaio de IFI-Lítico	41
Figura 3B. Padrão de coloração obtido com soro negativo para a infecção HHV-8 no ensaio de IFI-Lítico	41
Figura 4A. Perfil eletroforético obtido no SDS-PAGE utilizando antígeno bruto de células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8, submetido a diferentes tampões de lise	44
Figura 4B. Perfil eletroforético no SDS-PAGE utilizando antígeno bruto de células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 obtido por lise com SDS e 2 mercaptoetanol	44
Figura 5A. Padrão eletroforético de extratos de DNAs obtidos de material de biópsia de lesão SK	46
Figura 5B. Padrão eletroforético de produtos de PCR “nested” ORF 26 obtidos de casos de SK	46
Figura 1. Amostras representativas do perfil de bandas obtido no WB-LANA de casos positivos e negativos para a infecção HHV-8	67
Figura 2. Amostras representativas do perfil de bandas obtido no WB-Lítico de casos positivos e negativos para a infecção HHV-8	67

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro A. Distribuição de herpesvírus segundo a subfamília a que pertencem	6
Quadro B. Relação de herpesvírus que causam doenças em tecido linfóide	7
Quadro C. Relação de genes e respectivas proteínas envolvidas na patogênese do SK	12
Quadro D. Relação das principais proteínas imunogênicas do HHV-8	13
Quadro 1. Resultados individuais obtidos com os ensaios de IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em população com sarcoma de Kaposi	56
Tabela 1A. Distribuição de resultados obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 44 pacientes com sarcoma de Kaposi, de acordo com a categoria de risco e sexo	57
Tabela 1B. Resultados obtidos nos ensaios de WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em população com sarcoma de Kaposi	57
Quadro 2. Resultados individuais obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 21 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, sem sarcoma de Kaposi	58
Quadro 3B. Resultados positivos individuais obtidos em pelo menos um dos ensaios de ELISA-ABI, IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 95 amostras de soro de pacientes infectados pelo HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi	59
Tabela 2A. Distribuição de resultados obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi, de acordo com a categoria de risco e sexo	61
Tabela 2B. Resultados obtidos nos ensaios de WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em população de indivíduos infectados pelo HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi	61

Tabela 3. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade na IFI-LANA para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi.	62
Tabela 4. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade na IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi	62
Quadro 4. Resultados positivos individuais obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 683 amostras de soro de pacientes com deficiência mental e/ou física do CENLICAL	63
Quadro 5. Resultados positivos individuais obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 736 amostras de soro de funcionários da CENLICAL	64
Tabela 5. Frequência de resultados positivos obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em amostras de soro de 683 pacientes e 736 funcionários da CENLICAL	65
Tabela 6. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade no WB-LANA para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi	66
Tabela 7. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade em pelo menos um dos testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de indivíduos com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi	66
Quadro Anexo A. Relação de trabalhos publicados que empregaram os ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico para estudo de prevalência de infecção HHV-8 em todo o mundo, com detalhes sobre linhagem celular, fixador, diluição do soro, casuística, resultados e local de origem	117
Quadro Anexo B. Reagentes do conjunto ELISA-ABI	127
Quadro Anexo C. Reagentes do conjunto IFI-ABI	127

Quadro Anexo F. Relação de gel de acrilamida para SDS-PAGE em várias concentrações	133
Quadro 3A, Anexo I. Resultados individuais obtidos com os ensaios de ELISA-ABI, IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes infectados pelo HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi	138

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo otimizar ensaios sorológicos para serem utilizados na pesquisa de anticorpos dirigidos ao Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) e com eles explorar grupos de risco para adquirir, transmitir e desenvolver doença relacionada à esta infecção, como o sarcoma de Kaposi (SK). Tomando como base a literatura disponível, as condições do laboratório e a experiência profissional acumulada na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foram selecionados e utilizados os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) e Western blot (WB) para a pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos (Ag) de fase latente (LANA) e lítica da infecção por HHV-8. Para a padronização dos testes sorológicos foram utilizadas amostras de soro de 44 pacientes com SK e 21 controles sadios do Laboratório, e para o cálculo de prevalência de infecção HHV-8 em diferentes populações de São Paulo, soros de 3 grupos de indivíduos: • 477 pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK; • 683 pacientes institucionalizados com deficiência mental e/ou física; • 736 profissionais da área da saúde, sadios. Foram empregados na preparação das lâminas de IFI e nas tiras de WB respectivamente, as células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 ou estimuladas com forbol éster e o antígeno viral bruto obtido de sobrenadante de lisado das mesmas células. Os resultados obtidos na padronização da IFI-LANA mostraram baixa especificidade do ensaio devendo ser acompanhado pelo teste confirmatório de WB-LANA. Por outro lado, a IFI-Lítico se mostrou altamente sensível e específica, prescindindo do teste confirmatório de WB-Lítico. Este último, devido à complexidade de componentes antigênicos aliado aos diferentes perfis de reatividade de anticorpos encontrados em soros controle positivo e negativo, não se mostrou útil para ser empregado no presente trabalho. Levando em consideração os resultados obtidos na IFI-LANA confirmados pelo WB-LANA e na IFI-Lítico, foi possível determinar a prevalência de infecção HHV-8 no grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK que foi de 19,3%, sendo detectados 4,8% de soros positivos para Ag LANA e 17%

para Ag Lítico. Neste grupo de pacientes, houve associação estatisticamente significativa entre sorologia HHV-8 positiva, sexo masculino e prática homossexual. Baixas prevalências de anticorpos foram detectadas nos pacientes institucionalizados com deficiência mental e/ou física (1,6%) e nos profissionais da área da saúde (1,1%). Anticorpos dirigidos a Ag LANA foram encontrados em 0,6% e 0,95% dos casos, e para Ag Líticos em 1,0% e 0,3% dos casos, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que São Paulo não é região endêmica desta infecção viral e que pacientes institucionalizados e profissionais da área da saúde não são grupos de alto risco para adquirir e transmitir o HHV-8; nenhum caso de SK foi relatado neste grupo de indivíduos na ocasião da coleta das amostras de soro. Quanto ao grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK, embora 19,3% deles tenham resultado sorologia HHV-8 positiva sendo a maioria para Ag de fase lítica de replicação viral, apenas 2% desenvolveram SK em estudo longitudinal de 5 anos. A explicação encontrada para o baixo número de casos de SK nesta população de indivíduos foi a introdução em 1994, de terapia anti-retroviral em São Paulo, que mudou o curso da infecção HIV e das doenças à ela associadas. Enfim, foi possível implantar ensaios sorológicos de pesquisa de anticorpos específicos, que juntos, apresentam alta sensibilidade e especificidade e que podem ser empregados em levantamentos epidemiológicos e no diagnóstico de infecção HHV-8.

Summary

The objective of the present study was to optimize serologic assays to be employed in the search for antibodies against human herpesvirus type 8 (HHV-8) and use them to survey groups at risk to acquire, transmit and develop disease related to this infection, such as Kaposi's sarcoma (KS). On the basis of the available literature and of the Laboratory conditions and professional experience accumulated in the Immunology Section of the Adolfo Lutz Institute of São Paulo, we selected and used indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blot (WB) for the search of antibodies against antigens (Ag) of the latent (LANA) and lytic phase of HHV-8 infection. Serum samples from 44 patients with KS and from 21 healthy controls from the laboratory were used for the standardization of the serologic tests, and sera from the following 3 groups of individuals were used to calculate the prevalence of HHV-8 infection in different São Paulo populations: • 477 patients infected with HIV/AIDS without KS; • 683 institutionalized patients with mental and/or physical deficiency; • 736 healthy professionals from the health area. For the preparation of IFA slides and WB strips, we respectively used BCBL-1 cells latently infected with HHV-8 or stimulated with phorbol ester and the crude antigen obtained from the supernatant of a lysate of the same cells. The results obtained in the standardization of the IFA-LANA showed low specificity of the assay, which needed to be accompanied by the confirmatory WB-LANA test. In contrast, the IFA-Lytic proved to be highly sensitive and specific, requiring no confirmatory WB-Lytic test. The latter, due to the complexity of the antigenic components joined to the different reactive profiles of the antibodies detected in positive and negative control sera, was not found to be useful for the present study. Considering the results obtained by IFA-LANA confirmed by WB-LANA and those obtained by IFA-Lytic, it was possible to determine the prevalence of HHV-8 infection in the group of HIV-AIDS patients without KS, which was 19.3%, with the detection of 4.8% sera positive for LANA Ag and 17% positive for Lytic Ag. In this group of patients there was a statistically significant association between HHV-8-positive serology, male sex and homosexual practice. Low antibody prevalences

were detected in institutionalized patients with mental and/or physical deficiency (1.6%) and in health professionals (1.1%). Antibodies against LANA Ag were detected in 0.6% and 0.95% of cases, and antibodies against Lytic Ag in 1.0% and 0.3% of cases, respectively. The results obtained show that São Paulo is not an endemic region for this viral infection and that institutionalized patients and health professionals are not groups at high risk to acquire and transmit HHV-8; no case of KS was reported by these groups on the occasion of the collection of serum samples. With respect to the patients infected with HIV/AIDS without KS, although 19.3% of them showed HHV-8-positive serology, in most cases for Ag of the lytic phase of viral replication, only 2% developed KS in a 5 year longitudinal study. The small number of KS cases detected in this population is explained by the introduction in 1994 of antiretroviral therapy in São Paulo, which changed the course of HIV infection and of the diseases associated with it. In conclusion, it was possible to set up serologic assays for the detection of specific antibodies which, considered jointly, presented high sensitivity and specificity and which could be used in epidemiologic surveys and in the diagnosis of HHV-8 infection.

Introdução

O sarcoma de Kaposi (SK) é uma doença angioproliferativa, podendo manifestar-se como uma única ou várias lesões simultaneamente. Os aspectos macroscópicos são de máculas e placas violáceas, sendo que nos estágios mais avançados apresentam-se em forma de nódulos. Essas lesões localizam-se principalmente nos membros inferiores, mas podem aumentar em número e tamanho, atingindo mucosas e vísceras.

Em análises histológicas, utilizando coloração de hematoxilina-eosina, as biópsias de SK apresentam-se como tumores mesenquimais e multicelulares, caracterizados pelas células endoteliais fusiformes ("spindle-cells"). As lesões possuem intensa angiogênese, extravazamento de eritrócitos, edema e infiltrado de células inflamatórias mononucleares (BOSHOF *et al.*, 1995 e ANTMAN & CHANG, 2000)

A primeira publicação científica desta patologia foi feita em 1872 por Moriz Kaposi, dermatologista húngaro que trabalhava em Viena e que descreveu o encontro de lesões cutâneas principalmente em membros inferiores em cinco homens com idade entre 40 e 68 anos, um dos quais foi a óbito devido à hemorragia gastrointestinal, 15 meses após o aparecimento inicial das lesões da pele. Na autópsia foi constatado comprometimento visceral nos pulmões e no trato gastrointestinal. No trabalho original de Kaposi foi descrito ainda o encontro das mesmas lesões cutâneas em um menino de 10 anos (paciente de um colega seu) e elas foram denominadas na época, sarcomas de pigmentação múltipla idiopática da pele (KAPOSI, 1872). Em 1891, essa patologia passou a ser designada sarcoma de Kaposi em homenagem ao seu descobridor e o trabalho original foi traduzido para o inglês e republicado em 1982 por HAVERKOS & CURRAN.

A incidência do SK é maior em regiões próximas ao Mediterrâneo e no continente africano quando comparada a outras áreas geográficas, sendo suas manifestações clínicas bem diferentes. Os pacientes imunodeprimidos apresentam maior risco de desenvolverem a patologia do que a população geral. Essas observações possibilitaram classificar o SK segundo os critérios clínico-epidemiológicos em:

- **SK clássico** - a maioria dos casos ocorre nos homens, com uma média de 15:1 em relação às mulheres. Manifesta-se a partir dos 50 anos, em particular nos residentes do sul da Europa (principalmente Itália e Grécia) e entre os descendentes de judeus no leste Europeu. A doença clássica, originalmente descrita, caracteriza-se por apresentar uma evolução lenta, com lesões múltiplas na forma de placas ou nódulos, inicialmente nas mãos e pés, porém progredindo para outras partes do corpo num período de anos ou décadas. Dez % dos pacientes desenvolvem lesões em vísceras e mucosas.
- **SK endêmico** - ocorre em países da África equatorial, principalmente em Uganda e Zâmbia e, desde 1950, tem sido documentada a sua alta incidência nessa região. Acomete pessoas de qualquer idade, sendo que no sul da África, corresponde a 25-50% dos sarcomas de tecidos moles nas crianças. Manifesta-se como uma doença agressiva, comprometendo vísceras e gânglios linfáticos, conferindo um pior prognóstico à doença.
- **SK iatrogênico** - outro grupo de indivíduos susceptíveis a desenvolverem o SK é a população em uso de terapia imunossupressora, em especial, os transplantados renais. Na média, em dois terços dos casos, o curso clínico da doença é descrito como indolente e pode apresentar remissão espontânea após a suspensão da terapia. No restante dessa população, pode haver comprometimento de mucosas, vísceras e de gânglios linfáticos. O intervalo de tempo médio entre o transplante e o aparecimento do SK é de 30 meses.

- **SK epidêmico** - teve início em 1981, após notificação pelo Centro de Controle de Doenças de Atlanta (CDC) de uma epidemia de SK entre jovens em Nova York e na Califórnia. Esta forma da doença foi associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tornou-se a forma mais comum, acometendo aproximadamente 15 a 20% dos pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Nos pacientes de sexo masculino infectados pelo HIV, a incidência do SK é cerca de 20.000 vezes maior do que na população geral. Os homens que fazem sexo com homens (HSH) apresentam risco 10 vezes maior de desenvolverem o SK do que os pacientes que adquiriram o HIV pela via parenteral (HAVERKOS & CURRAN, 1982; BIGGAR *et al.*, 1984; BERAL *et al.*, 1990; ZIEGLER, 1993; SPIRA & JAFFE, 1998; ANTMAN & CHANG, 2000).

A observação da alta incidência de SK entre HSH e dentro de áreas geográficas específicas fez com que vários estudos fossem realizados com o objetivo de identificar o fator ou agente etiológico que pudesse estar envolvido na patogênese desse tumor. GIRALDO *et al.*, 1972b, analisando biópsias de SK através da microscopia eletrônica identificaram estruturas virais presentes nessas lesões. Esses mesmos pesquisadores propuseram uma possível associação entre o SK e o citomegalovírus (CMV) (GIRALDO *et al.*, 1980). AMBINDER *et al.*, 1987, pesquisando biópsias de 19 pacientes com SK endêmico pelo método de hibridização molecular, mostraram que o CMV não estava presente na lesão de SK.

Em dezembro de 1994, CHANG *et al.*, partindo de biópsias de pacientes com SK e AIDS e usando as técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), hibridização molecular, RDA (“representational difference analysis”) e digestão de produtos de RDA, foram capazes de mapear uma região genômica de 1.853 pares de bases (bp), que apresentou homologia com a região que codifica proteínas do capsídeo viral nos gamaherpesvírus (herpesvírus Saimiri, HSV e vírus Epstein-Barr, EBV). Esses pesquisadores estabeleceram uma técnica PCR capaz de detectar um segmento de 233 bp dentro da região KS330 do genoma viral. A

seqüência recebeu a denominação de KS330₂₃₃ e foi detectada em 90% dos tecidos obtidos de casos de SK associado à AIDS (SK-AIDS). Posteriormente, outros estudos se seguiram mostrando que as mesmas seqüências eram encontradas em lesões de SK endêmico-africano, SK clássico do mediterrâneo e SK iatrogênico, pós-transplante (DUPIN *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1995; RADY *et al.*, 1995; SCHULZ & WEISS, 1995; SU *et al.*, 1995; ALUIGI *et al.*, 1996; KEDDA *et al.*, 1996; HUDNALL *et al.*, 1998). O novo agente foi provisoriamente denominado KSHV (Kaposi's sarcoma herpesvirus) e posteriormente chamado HHV-8 (human herpesvirus 8) por ter sido encontrado também em casos de tipo raro de linfoma de células B com efusão em cavidades ("Body cavity-based lymphoma", BCBL ou "primary effusion lymphoma", PEL) e em casos de doença de Castleman associada à infecção HIV (MCD-HIV) (CESARMAN *et al.*, 1995, CORBELLINO *et al.*, 1995; EKMAN *et al.*, 1995; NADOR *et al.*, 1996). Nestes, os linfócitos B se apresentavam infectados, enquanto nos casos de SK a infecção se dava nas células endoteliais fusiformes (BOSHOF *et al.*, 1995 e FRIEDMAN-KIEN *et al.*, 1995).

Utilizando células de efusão peritoneal de pacientes com BCBL-AIDS, RENNE *et al.*, 1996, identificaram pela primeira vez, por microscopia eletrônica, o HHV-8 como partícula viral íntegra ("virion") e MESRI *et al.*, 1996, em seguida, conseguiram seu isolamento e transmissão para células B de cordão umbilical.

O HHV-8 se caracteriza por apresentar nucleocapsídeo hexagonal de aproximados 110 nm de diâmetro, contendo, em seu interior, uma molécula de DNA fita dupla, na forma linear. Envolvendo o nucleocapsídeo, um material amorfo rico em proteínas denominado tegumento e na parte externa viral, o envelope com as glicoproteínas de superfície (SAID *et al.*, 1997).

Figura A – Capsídeos e alguns nucleocapsídeos de HHV-8 livres no núcleo de células B obtidas de fluido ascítico de paciente com BCBL-AIDS estimuladas com forbol éster e **Figura B** - partículas virais maduras do mesmo paciente presentes em vesículas no citoplasma das células infectadas (RENNE *et al.*, 1996).

Figuras C e D – Partículas HHV-8 completas presentes em cisterna entre a membrana nuclear interna e externa e livre no exterior de células KS-1, respectivamente (SAID *et al.*, 1997).

Figura E - Representação esquemática de herpesvírus segundo SAID *et al.*, 1997.

Os herpesvírus são altamente disseminados na natureza e infectam algumas espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes ósseos. Estão agrupados na família *Herpesviridae* e subdividem-se em 3 subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae* (LEVY, 1997).

A principal característica dos herpesvírus é sua capacidade de permanecer em estado de latência indefinidamente e reativar, em condições de imunossupressão do hospedeiro.

Oito membros já foram identificados como sendo infecciosos aos seres humanos (**Quadro A**).

Quadro A – Distribuição de herpesvírus infecciosos aos seres humanos segundo a sub-família a que pertencem.

Sub-família	Vírus	Sigla
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Herpesvírus simples tipo-1	HSV-1
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Herpesvírus simples tipo-2	HSV-2
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Herpesvírus humano tipo-3 ou Varicela-zoster	HHV-3 ou VZV
<i>Betaherpesvirinae</i>	Herpesvírus humano tipo-5 ou Citomegalovírus	HHV-5 ou CMV
<i>Betaherpesvirinae</i>	Herpesvírus humano tipo-6	HHV-6
<i>Betaherpesvirinae</i>	Herpesvírus humano tipo-7	HHV-7
<i>Gammapherpesvirinae</i>	Herpesvírus humano tipo-4 ou vírus Epstein-Barr	HHV-4 ou EBV
<i>Gammapherpesvirinae</i>	Herpesvírus humano tipo-8	HHV-8

Os vírus pertencentes à sub-família *gammaherpervirinae* caracterizam-se por replicarem *in vitro* em linfoblastos e causarem infecções líticas em células epiteliais e fibroblásticas. Esses vírus podem infectar tanto linfócitos T como também linfócitos B sendo que a infecção pode estar no estágio de latência ou em atividade (fase lítica), mas sem produção de progênie infecciosa. O vírus latente é freqüentemente demonstrado em tecidos linfóides. Essa subfamília é subdividida em dois gêneros: *Lymphocryptovirus* (EBV) e *Rhadinovirus* (HSV e HHV-8) (ROIZMAN, 1996).

Quadro B – Relação de herpesvírus que causam doenças associadas à tecidos linfóides.

Vírus	Hospedeiro	Doenças associadas
Vírus Epstein-Barr (EBV)	Humanos	Linfoma de Burkitt Carcinoma nasofaríngeo Doença de Hodgkin Linfoproliferação pós-transplante
Herpesvírus saimiri (HSV)	Macacos	Proliferação de células T
Herpesvírus da fibrose retroperitoneal (RPHV)	Macacos	Fibrose retroperitoneal
Radinovirus macaco rhesus (RRV)	Macacos	Nada demonstrado
Herpes murino 68	Camundongos	Linfoproliferação
Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8)	Humanos	Sarcoma de Kaposi PEL MCD-AIDS

A infecção pelos herpesvírus inicia-se com a interação entre as glicoproteínas do envelope viral e a matrix extracelular. Uma segunda interação da glicoproteína com receptores na membrana celular promove a fusão e a conseqüente liberação do conteúdo viral para o citoplasma da célula hospedeira. O nucleocapsídeo é deslocado para a superfície nuclear através de microtúbulos e o DNA viral é liberado para o interior do núcleo, passando da forma linear para a forma circular (epissomal), não integrada. Uma proteína do tegumento, a VP16, interage com o material genético da célula hospedeira promovendo a transcrição de proteínas virais denominadas antígenos latentes ou LANA (Latency-associated nuclear antigen). Havendo estímulo, proteínas estruturais são produzidas no citoplasma da célula hospedeira, caracterizando assim a fase lítica da infecção viral (ROIZMAN, 1996).

O DNA do HHV-8 é constituído por uma longa região codificadora de 140 Kb (quilo pares de bases) (RUSSO *et al.*, 1996 e NEIPEL *et al.*, 1997) composta por baixas concentrações de nucleotídeos G+C (53,5%), onde se encontram todas as ORFs (“Open Reading Frames”). Nas extremidades, encontram-se regiões repetidas (TR) constituídas por 801 bp com altas concentrações de G+C (84.5%) e nelas estão os sítios controladores para a formação de capsídeo. A análise filogenética dos vários segmentos dessas seqüências de nucleotídeos mostrou uma forte semelhança ao HSV e essas seqüências receberam a denominação de ORFs 1 a 75 (RUSSO *et al.*, 1996). As ORFs encontradas exclusivamente no HHV-8 foram designadas por K1 a K15.

Figura F - Representação esquemática simplificada do genoma HHV-8 em sua forma linear segundo LEVY, 1997.

As **Figuras** a seguir mostram a complexidade de genes que compõem o genoma HHV-8 nas suas formas linear (lítica) e circular ou episomal (latente), segundo FOREMAN, 2001 (**G**) e SHARP & BOSHOFF, 2000 (**H**), respectivamente.

G

Figura G – Genoma HHV-8 (forma linear). Composto por uma região longa central de 140,5 Kb que contém mais de 80 regiões abertas de leitura (ORFs). Nas extremidades, estão as regiões repetidas terminais de 801 bp. As áreas em coloração azul, verde e rosa correspondem às regiões que contém os genes conservados entre os *Rhadinovirus*, enquanto as áreas intermediárias mostram genes únicos do HHV-8. Os genes únicos que codificam homólogos de proteínas celulares do hospedeiro aparecem como setas vermelhas e os que não mostram esta homologia como setas amarelas. São destacados os genes de importância para a patogênese do HHV-8 (FOREMAN, 2001).

Um fato curioso é a alta incidência de SK em pacientes HIV-1 soropositivos e isto pode ser devido à imunossupressão provocada por este retrovírus e/ou a atividade biológica da proteína tat do HIV-1, que pode estar relacionada à:

- indução de citocinas e a expressão de fatores de crescimento celular,
- indução e a expressão de moléculas de adesão,
- modulação de apoptose,
- indução de angiogênese,
- promoção de crescimento e proliferação de células tumorais,
- indução de quimiocinas e conseqüentemente de fatores inflamatórios quimiotáticos,
- indução de replicação do HHV-8 (HARRINGTON *et al.*, 1997 e FOREMAN, 2001).

De particular interesse na patogênese da infecção HHV-8 são os genes que codificam homólogos virais das oncoproteínas humanas e de fatores angiogênicos. São eles:

- ✓ A ciclina D viral do HHV-8 que promove a fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma, importante supressor tumoral;
- ✓ O LANA que pode interagir com a p53, inativando-a e alterando assim o processo de transcrição durante o crescimento celular;
- ✓ Os genes que codificam duas outras proteínas, a FLIP viral (proteína inibitória da FLICE) e a Bcl-2 viral (proteína de leucemia/linfoma de célula B), ambas com ação inibitória no processo de apoptose.

No quadro a seguir, são citados os principais genes e as respectivas proteínas envolvidas no desenvolvimento do SK (NEIPEL & FLECKENSTEIN, 1999; HONG & LEE, 2001 e LEÃO *et al.*, 2002).

Quadro C – Principais genes e respectivas proteínas associadas à patogênese do HHV-8.

Gene do HHV-8	Proteína do HHV-8	Expressão no SK	Propriedades funcionais
K1	Proteína K1	Células líticas	Sinalização e crescimento celular
K2	vIL-6	Sem evidência	Citocina e crescimento celular
K4/4.1	vMIP-II, III	Células líticas	Quimiocina e angiogênese
K6	vMIP-I	Células líticas	Quimiocina e angiogênese
K13	vFLIP	Células latentes	Inibição da apoptose
ORF 16	vBcl-2	Células líticas	Inibição da apoptose
ORF 72	v-ciclina	Células latentes	Controla o ciclo celular
ORF 73	LANA	Células latentes	Controla ciclo celular e persistência episomal
ORF 74	v-GPCR	Células latentes	Crescimento celular e estimulação parácrina de fatores necessários para a manutenção do SK

As infecções primárias por herpesvírus, geralmente induzem resposta de anticorpos, que embora não adequada para evitar a infecção produtiva, se mantém detectável pela vida do hospedeiro. Alguns anticorpos persistem durante a fase de latência viral, enquanto o DNA fica confinado a uma pequena subpopulação de células no hospedeiro infectado.

Desse modo, certos anticorpos dirigidos aos herpesvírus são aceitos como indicadores de infecção latente (KEDES *et al.*, 1996).

Para a identificação de infecção aguda ou ativa, além de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente viral, devem ser pesquisados anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica de replicação. O uso de estimulantes *in vitro* (forbol éster e

butirato), permitiu a transformação do genoma HHV-8 da forma circular para a linear e, conseqüentemente, a produção e expressão de antígenos de fase lítica viral (característica dos herpesvírus) (DECKER *et al.*, 1996).

Várias proteínas do HHV-8 foram identificadas como sendo potentes imunógenos e a detecção dos anticorpos correspondentes mostrou-se útil para identificar indivíduos infectados.

Quadro D – Relação das principais proteínas imunogênicas do HHV-8 e os seus respectivos segmentos no genoma viral.

Segmento do genoma HHV-8	Proteínas codificadas
ORF 6	Proteína ligante do DNA
ORF 8	Glicoproteína B (gp B)
ORF 9	DNA polimerase
ORF 25	Proteína do capsídeo principal
ORF 26	Proteína do capsídeo menor
ORF 59	Proteína de replicação do DNA
ORF 65	Proteína do capsídeo
ORF 73	Proteína de fase latente nuclear (Ag LANA)
ORF K 8.1	Glicoproteína classe I

O isolamento do HHV-8 de células B obtidas de fluido peritoneal, pleural ou pericárdico e de sangue periférico de pacientes com BCBL/PEL permitiu a produção de antígenos para serem utilizados em ensaios sorológicos para pesquisa de anticorpos específicos.

Primeiramente foram isoladas, cultivadas e utilizadas as linhagens celulares duplamente infectadas pelos vírus EBV e HHV-8 (**BC-1** e **BC-2**, GAO *et al.*, 1996a; GAO *et al.*, 1996b; MILLER *et al.*, 1996). Posteriormente, foi possível selecionar e estabelecer linhagens celulares infectadas apenas pelo HHV-8, sendo elas as :

BCBL-1 - obtida de fluido ascítico de paciente com BCBL e AIDS, (RENNE *et al.*, 1996);

KS-1 e **BC-3** - obtidas de fluido ascítico de paciente com PEL, não infectado pelo HIV (SAID *et al.*, 1996; ARVANITAKIS *et al.*, 1996);

BGP-1 - isolada de sangue periférico de paciente com PEL, infectado pelo HIV (BOSHOFF *et al.*, 1998) e

TY-1 - obtida de efusão pericárdica de paciente com PEL, infectado pelo HIV (KATANO *et al.*, 1999).

Estas linhagens celulares foram utilizadas na padronização de vários ensaios sorológicos sendo os pioneiros o "immunoblotting" (IB) e a imunofluorescência indireta (IFI) (GAO *et al.*, 1996a; GAO *et al.*, 1996b; KEDES *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 1996; SIMPSON *et al.*, 1996; GOEDERT *et al.*, 1997; KEDES *et al.*, 1997; KOELLE *et al.*, 1997; MARCELIN *et al.*, 1998; OLSEN *et al.*, 1998). Nestes ensaios foram empregadas preparações antigênicas brutas, ou seja, células totais o que permitiu obter resultados de alta sensibilidade, mas de baixa especificidade.

O tratamento dessas linhagens celulares com forbol éster ou butirato permitiu a indução e expressão de genes de fase lítica viral (ORFs 59, 65, K8.1), cujas proteínas correspondentes puderam ser utilizadas posteriormente em ensaios mais específicos. Muitas técnicas foram descritas com o uso de antígenos de fase lítica e latente viral, antígenos recombinantes e até mesmo peptídeos sintéticos, porém os resultados obtidos têm variado quanto à sensibilidade e especificidade, dependendo da metodologia empregada, do laboratório que os executa e da fase de infecção em que o indivíduo se encontra (RABKIN *et al.*, 1998 e KATANO *et al.*, 2000). O perfil de anticorpos produzidos durante as diferentes etapas da infecção/doença HHV-8 ainda não está totalmente elucidado dificultando, assim, a análise dos resultados obtidos (GAO *et al.*, 1996a).

Os principais ensaios imunológicos utilizados em estudos de soroprevalência de infecção HHV-8 e os respectivos antígenos empregados na detecção de anticorpos específicos são descritos a seguir:

- ✓ **IFI-LANA** – As lâminas de IFI são preparadas com linhagens de células B latentemente infectadas pelo HHV-8 e pesquisados os anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente de infecção viral (LANA codificado pela ORF 73), sendo este o principal componente responsável pelo padrão de fluorescência nuclear pontilhado observado com soro de indivíduos infectados (GAO *et al.*, 1996b; MILLER *et al.*, 1996; SIMPSON *et al.*, 1996; DUPIN *et al.*, 1998; MARCELIN *et al.*, 1998; MELBYE *et al.*, 1998; OLSEN *et al.*, 1998; RABKIN *et al.*, 1998; REGAMEY *et al.*, 1998; REZZA *et al.*, 1998; WHITBY *et al.*, 1998; FUJII *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1999; TEDESCHI *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 1999; DIAMOND *et al.*, 2000; ENBOM *et al.*, 2000; ENGELS *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2000; PERNA *et al.*, 2000; DAVIDOVICI *et al.*, 2001; SCHATZ *et al.*, 2001). Tratamento das células infectadas com solução hipotônica, que lisa a membrana citoplasmática sem alterar seu núcleo, permite retirar possíveis reações cruzadas de anticorpos dirigidos a antígenos presentes no citoplasma dessas células (KEDES *et al.*, 1997; MARTIN *et al.*, 1998; ANDREONI *et al.*, 1999; REZZA *et al.*, 2000).
- ✓ **IFI-Lítico** – Lâminas preparadas com linhagens de células B infectadas pelo HHV-8 e estimuladas por 48 a 72 h com forbol éster (TPA ou PMA). Antígenos de fase lítica viral são detectados pelos anticorpos específicos presentes no soro em 5-20% das células infectadas. O padrão de fluorescência é de coloração difusa no citoplasma e forte nas membranas nuclear e citoplasmática (MILLER *et al.*, 1996; REZZA *et al.*, 1998; VERBEEK *et al.*, 1998; REZZA *et al.*, 1999; TEDESCHI *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 1999; ENBOM *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2000; MASINI *et al.*, 2000; PERNA *et al.*, 2000; REZZA *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2001;

SCHATZ *et al.*, 2001). Segundo CHATLYNNE *et al.*, 1998, padrão de fluorescência difusa em toda a célula representa anticorpos dirigidos a antígenos de fase tardia da infecção viral, enquanto a coloração forte na membrana externa reflete presença de anticorpos dirigidos a proteínas de envelope viral. Finalmente, fluorescência nuclear intensa está relacionada à presença de anticorpos dirigidos a proteínas não estruturais do HHV-8.

- ✓ **IFI-r** – Lâminas preparadas com células que normalmente não se infectam com herpesvírus (BHK-21) e nas quais são inseridos vírus que expressam proteínas recombinantes das ORF 73 e ORF K8.1 (rSFV). Esta técnica aumentou a especificidade do ensaio de IFI, mas diminuiu sua sensibilidade (INOUE *et al.*, 2000).
- ✓ **MIFA** – Lâminas preparadas com células infectadas pelo HHV-8, mas que utilizam uma etapa intermediária de ligação de anticorpos monoclonais anti-IgG humano produzidos em camundongos e conjugado anti-IgG de camundongo, visando aumentar a sensibilidade do ensaio (LENNETTE *et al.*, 1996; RABKIN *et al.*, 1998; BLACKBOURN *et al.*, 1999; ENBOM *et al.*, 2000; SPIRA *et al.*, 2000).
- ✓ **Western Blot (WB) ou Immunoblotting (IB) LANA** – Antígeno bruto preparado a partir de lisado de células B latentemente infectadas pelo HHV-8 que após ultracentrifugação é submetido a eletroforese em SDS-PAGE e transferido para membrana de nitrocelulose. O antígeno LANA é identificado por reação imunoenzimática como proteínas de 234 e 226 KDa, quando se utiliza como fonte de antígeno células BC-1, e 230 e 220 KDa quando se utiliza células BCP-1 (GAO *et al.*, 1996a; MILLER *et al.*, 1996; RAINBOW *et al.*, 1997; GAO *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 1999).
- ✓ **RIPA LANA e Lítico** – Antígeno bruto preparado a partir de lisado de células B infectadas pelo HHV-8 em fase latente ou lítica de replicação viral,

submetido a SDS-PAGE e transferido para membrana de nitrocelulose. A diferença em relação ao WB é a utilização de sonda radioativa no lugar de conjugado marcado com enzima para a detecção de anticorpos específicos (SMITH *et al.*, 1997; CHANDRAN *et al.*, 1998; SOSA *et al.*, 1998).

- ✓ **WB ORF 65** – Antígeno bruto obtido de lisado de células BCBL-1 estimuladas com TPA ou proteína nativa, submetidas a eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. O antígeno codificado pela ORF 65 do HHV-8 é identificado pelo anticorpo específico como uma proteína de 60 KDa (GAO *et al.*, 1998; MELBYE *et al.*, 1998; OLSEN *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 1999; SPIRA *et al.*, 2000).
- ✓ **WB ORF K8.1** - Antígeno bruto obtido de lisado de células BCBL-1 estimuladas com TPA ou proteína nativa, submetidas a eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. O antígeno da ORF K8.1 é identificado pelos anticorpos dirigidos às glicoproteínas de 35-37 KDa (RAAB *et al.*, 1998).
- ✓ **ELISAr ORF 65** – Antígeno recombinante preparado a partir de um segmento da ORF 65 (região imunodominante) que codifica uma proteína do capsídeo viral de 19 KDa. (SIMPSON *et al.*, 1996; MELBYE *et al.*, 1998; REGAMEY *et al.*, 1998; ENBOM *et al.*, 2000).
- ✓ **ELISAr ORF 59** - Antígeno recombinante preparado a partir do segmento ORF 59 que codifica uma proteína de 50 KDa. (KATANO *et al.*, 1999).
- ✓ **ELISAr mista** - Antígeno preparado a partir de uma mistura de proteínas recombinantes obtidas a partir dos segmentos ORFs 59, 65, 73 e K8.1. Este ensaio leva vantagem sobre os anteriores por incluir antígenos de diferentes fases da infecção HHV-8 (latente e lítica) (SHIMIZU *et al.*, 2001).

- ✓ **ELISA lisado viral** – Antígeno bruto preparado a partir de células B infectadas pelo HHV-8 (CHATLYNNE *et al.*, 1998; RABKIN *et al.*, 1998; ENBOM *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2000).
- ✓ **ELISA peptídeo sintético** – Peptídeos sintéticos de 12 a 20 amino ácidos (aa) preparados a partir de epítomos imunodominantes presentes nas proteínas codificadas pelas ORFs 26 e ORF 65 (DAVIS *et al.*, 1997; PAU *et al.*, 1998; TEDESCHI *et al.*, 1999) e K8.1A (LAM *et al.*, 2002).
- ✓ **“Kits” comerciais** - ELISA e IFI da Advanced Biotechnologies Incorporated – ABI, USA, preparados com células KS-1 (antígeno bruto) e que detectam anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica e latente da infecção HHV-8. Esses “Kits” são muito usados em levantamentos soroepidemiológicos e em trabalhos de comparação de técnicas. (CHATLYNNE *et al.*, 1998; MANNS *et al.*, 1998; RABKIN *et al.*, 1998; ABLASHI *et al.*, 1999; GESSAIN *et al.*, 1999; BIGGAR *et al.*, 2000; CATTANI *et al.*, 2000; PLANCOULAIN *et al.*, 2000; SPIRA *et al.*, 2000). ELISA da Diavir Ltd, Germany, preparado com peptídeos sintéticos constitui mais uma opção no mercado (SARMATI, 2001).

Assim, várias técnicas e ensaios sorológicos foram e vêm sendo padronizados e utilizados em levantamentos de infecção HHV-8, porém nenhum deles se mostrou 100% sensível e específico para detectar casos de SK.

Estudos comparativos usando a mesma casuística e diferentes ensaios sorológicos mostraram divergência de resultados e permitiram concluir que nenhuma destas metodologias deve ser empregada de maneira isolada no diagnóstico de infecção HHV-8 (RABKIN *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 1999; ENBOM *et al.*, 2000; ENGELS *et al.*, 2000; SPIRA *et al.*, 2000; SCHATZ *et al.*, 2001).

Embora não haja um consenso sobre qual o melhor ensaio para ser utilizado em levantamentos epidemiológicos, a pesquisa de anticorpos específicos por diferentes metodologias, principalmente pela IFI-LANA e IFI-Lítico, possibilitou o mapeamento de regiões endêmicas de HHV-8 que coincidiram com as regiões de maior incidência de SK (países do Mediterrâneo e África equatorial) (GAO *et al.*, 1996a; LENNETTE *et al.*, 1996, SIMPSON *et al.*, 1996, ANGELONI *et al.*, 1998; HE *et al.*, 1998; MAYAMA *et al.*, 1998; OLSEN *et al.*, 1998; REZZA *et al.*, 1998; SCHULZ, 1998; WHITBY *et al.*, 1998; ABLASHI *et al.*, 1999; ANDREONI *et al.*, 1999; CATTANI *et al.*, 1999; DE THE *et al.*, 1999; REZZA *et al.*, 1999; SCHULZ & MOORE, 1999; SITAS *et al.*, 1999 WHITBY *et al.*, 1999; MASINI *et al.*, 2000; PERNA *et al.*, 2000; VITALE *et al.*, 2000; ALMUNEEF *et al.*, 2001; DAVIDOVICI *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2001; SANTARELLI *et al.*, 2001).

Além disto, permitiu a identificação de populações expostas a risco epidemiológico para adquirir a infecção por via sexual: HSH, infectados ou não pelo HIV (REGAMEY *et al.*, 1998; VERBEEK *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1998; BLACKBOURN *et al.*, 1999; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1999; FUJII *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1999; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2000; DIAMOND *et al.*, 2000; GOUDSMIT *et al.*, 2000; REZZA *et al.*, 2000); pacientes de clínica de doenças sexualmente transmissíveis (DST) (REZZA *et al.*, 1998) e mulheres profissionais do sexo (BESTETTI *et al.*, 1998).

É interessante salientar que em alguns países da África e do Mediterrâneo, altas taxas de infecção pelo HHV-8 foram detectadas em crianças (ZIEGLER & KATONGOLE-MBIDDE, 1996; JAFFE & FRANKEL, 1997; BOURBOULIA *et al.*, 1998; HE *et al.*, 1998; LA DUCA *et al.*, 1998; OLSEN *et al.*, 1998; ANDREONI *et al.*, 1999; GESSAIN *et al.*, 1999; WHITBY *et al.*, 2000). O mesmo foi encontrado no Brasil em população indígena da Amazônia, onde 41% das crianças com menos de 10 anos de idade resultaram soropositivas para o HHV-8 (BIGGAR *et al.*, 2000).

Estes dados falam a favor de transmissão vertical e/ou horizontal deste vírus. De fato, vários trabalhos demonstraram a presença deste vírus na saliva e na orofaringe das pessoas pesquisadas (DI ALBERTI *et al.*, 1997; KOELLE *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 1997; CATTANI *et al.*, 1999).

Outro estudo conduzido em Uganda mostrou associação entre a presença de HHV-8 e o vírus da hepatite B (MAYAMA *et al.*, 1998) levantando a hipótese de outras vias de transmissão viral, além da oral e sexual.

Assim, populações promíscuas e outras expostas a risco epidemiológico de adquirir viroses e em condições precárias de higiene e saúde, parecem estar relacionadas a taxas elevadas de infecção HHV-8 (KEDES *et al.*, 1997; REGAMEY *et al.*, 1998; SCHULZ, 1998; VERBEEK *et al.*, 1998).

A seguir são apresentados alguns dados relacionados à prevalência de infecção HHV-8 nos vários países, com destaque para a Itália e países do continente Africano.

Na Itália, vários estudos foram realizados e confirmaram a associação entre altas taxas de soropositividade para HHV-8 e alta incidência do SK (GAO *et al.*, 1996b; REZZA *et al.*, 1998; WHITBY *et al.*, 1998; CATTANI *et al.*, 1999; REZZA *et al.*, 1999; CATTANI *et al.*, 2000; MASINI *et al.*, 2000; PERNA *et al.*, 2000; REZZA *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2001).

WHITBY *et al.*, 2000, determinaram soroprevalência de infecção HHV-8 em crianças e a associaram com faixa etária. Em 57 crianças com menos de 12 meses de idade a prevalência foi de 3,5%, enquanto nos adolescentes com 11 a 15 anos, a prevalência foi de 7,8%. Estes resultados permitiram demonstrar que a infecção HHV-8 ocorre em crianças italianas, mesmo antes da puberdade.

Outro estudo conduzido por ANGELONI *et al.*, 1998, detectou a presença de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em esposas, filhos e irmãos de pacientes com SK clássico, na Sardenha, sugerindo transmissão vertical ou horizontal intra-familiar.

A prevalência dessa infecção entre doadores de sangue da Itália variou de acordo com a região estudada: 7% na região norte e central e 25% na região sul. As maiores prevalências foram detectadas em regiões de maior incidência de SK clássico (WHITBY *et al.*, 1998).

Mapa A - Distribuição de casos de infecção HHV-8 pelo ensaio de IFI-LANA em doadores de sangue de várias regiões da Itália. (dados obtidos de estudos relacionados no **ANEXO A**, p. 117).

Outra região geográfica com alta incidência de SK é o Continente Africano e vários estudos têm demonstrado alta prevalência de infecção HHV-8 em Uganda (GAO *et al.*, 1996b; SIMPSON *et al.*, 1996; ABLASHI *et al.*, 1999), Zâmbia (HE *et al.*, 1998 e OLSEN *et al.*, 1998), Camarões (REZZA *et al.*, 2000) e África do Sul (SITAS *et al.*, 1999).

É interessante salientar que em certos países da África, como por exemplo no Egito, anticorpos dirigidos ao HHV-8 foram detectados em grande número de indivíduos, sem com isto terem sido documentados muitos casos de SK neste país (ANDREONI *et al.*, 1999).

Mapa B - Distribuição de casos de infecção HHV-8 por IFI-LANA e IFI-Lítico no continente Africano (dados obtidos de estudos relacionados no **ANEXO A**, p. 117).

No Oriente Médio, a prevalência de infecção HHV-8 em doadores de sangue com idade superior aos 55 anos foi de 25% (DAVIDOVICI *et al.*, 2001) e na Arábia Saudita, em população masculina submetida à hemodiálise, foi de 71% (ALMUNEEF *et al.*, 2001). Estes dados corroboram as descrições de SK iatrogênico nessa região geográfica.

Estudos de soroprevalência HHV-8 passaram também a ser realizados em países de baixa incidência de SK clássico, endêmico e iatrogênico.

ABLASHI *et al.*, 1999, estudaram a prevalência da infecção HHV-8 no Sudeste Asiático usando os ensaios de ELISA lisado viral e IFI-Lítico. Verificaram prevalência abaixo de 5% na população sadia. Na população infectada pelo HIV na Índia e Tailândia obtiveram resultados de 2,4% e 11,2% respectivamente, sendo esses valores bem menores do que os relatados nas mesmas categorias de risco dos EUA e África. Esses dados sugerem que o HHV-8 tenha sido recentemente introduzido no sudeste Asiático.

ENBOM *et al.*, 2000, analisaram amostras de doadores de sangue na Suécia e detectaram 0,6% de positividade ao HHV-8 pela IFI-LANA e 20% pela IFI-Lítico.

Nos Estados Unidos foram realizados estudos com doadores de sangue utilizando a IFI-LANA: em São Francisco foi detectado 1% de soros positivos e no Texas 7% (KEDES *et al.*, 1996 e HUDNALL *et al.*, 1998). Em população infectada pelo HIV de Nova York foram detectados 11% de indivíduos HHV-8 soropositivos e em Los Angeles 56%, quando utilizada a IFI-Lítico (MILLER *et al.*, 1996 e VERBEEK *et al.*, 1998).

Foram realizados estudos em população com baixo risco de desenvolver SK do Japão (hemofílicos infectados pelo HIV) e os resultados obtidos mostraram ausência de infecção HHV-8 nessa população (SHIMIZU *et al.*, 2001).

Nos vários continentes, uma série de trabalhos foram conduzidos com populações expostas a diferentes categorias de risco para adquirir a infecção HHV-8 e os resultados obtidos com a IFI-LANA e IFI-Lítico são apresentados no **(Anexo A)**.

No Brasil, praticamente não existem estudos sobre prevalência de infecção HHV-8 em população sadia e poucos são os trabalhos a respeito de soroprevalência em população sob risco epidemiológico para adquirir esta infecção, resumindo-se em alguns trabalhos publicados, dissertações defendidas e trabalhos comunicados em congressos. Alguns deles são descritos a seguir:

ZHANG *et al.*, 1997, realizaram estudo de soroprevalência HHV-8 em diferentes populações de risco das cidades do Rio de Janeiro e Salvador e compararam os resultados obtidos com os de população semelhante de Denver, Colorado-USA. Mostraram que os resultados obtidos foram concordantes com maior taxa de infecção HHV-8 nos HSH infectados pelo HIV e com SK. Estes pesquisadores utilizaram os ensaios de IFI-LANA com núcleos de células HBL-6 infectadas pelo HHV-8 e EBV, e células BC-3. A sensibilidade dos dois ensaios foi baixa; sendo respectivamente de 64% e 71%.

No ano seguinte, os mesmos pesquisadores iniciaram a padronização de ELISA lisado total utilizando as mesmas linhagens da IFI-LANA, porém não obtiveram bons resultados (ZHANG *et al.*, 1998)

SOUZA *et al.*, 1998, iniciaram estudos de soroprevalência de infecção HHV-8 em São Paulo usando os ensaios de ELISA ORF 65 e IFI-LANA BCBL-1 em várias populações expostas a diferentes categorias de risco. Detectaram prevalência de 88% nos casos de SK, de 18% na população infectada pelo HIV, de 2,2% no grupo de DSTs e finalmente de 1,8% nos doadores de sangue. Houve maior positividade quando utilizado o ensaio ELISA ORF 65.

Em estudo piloto conduzido em São Paulo com 81 amostras de soro de Banco de Sangue e 81 soros de indivíduos infectados pelo HIV no ensaio IFI-LANA com células BCP-1 latentemente infectadas, CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, confirmaram maior exposição ao HHV-8 no grupo de HSH infectados pelo HIV (30,4%) em relação a outros grupos e detectaram 7% de soros reagentes na população masculina de Banco de Sangue (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1999).

ZAGO em 1999, em sua Dissertação de Mestrado, avaliou e comparou três ensaios utilizados no diagnóstico de infecção HHV-8: PCR, IFI-LANA e IFI-lítico, os últimos usando células BCP-1. Verificou que cada um destes ensaios isoladamente não apresentava valor diagnóstico. A soropositividade HHV-8 foi comparada com a gravidade do SK, número de células T CD4+ e título de anticorpos anti-LANA. Não houve associação entre soropositividade HHV-8 e estes parâmetros, mas houve com risco sexual: HSH, história de uretrite gonocócica e infecção pelo HIV e HBV. Posteriormente, a autora junto a outros pesquisadores publicaram os resultados desta pesquisa ressaltando a menor sensibilidade da PCR (75%) em relação ao emprego de dois testes: IFI-LANA e IFI-lítico (79,5%) para detectar esta infecção em casos de SK-AIDS (KELLER *et al.*, 2001).

PIERROTTI, em 2000, usando IFI-LANA com células BCBL-1 e ELISA ORF 65 concluiu em sua Dissertação de Mestrado, que a prevalência da infecção HHV-8 em pacientes infectados pelo HIV no município de Santos foi de 13,9%, sendo significativamente maior no sexo masculino e entre HSH.

Finalmente, BIGGAR *et al.*, 2000 utilizando os ensaios de IFI-LANA (BCP-1) e ELISA lisado total da ABI, detectaram altos percentuais de soros positivos para o HHV-8 em algumas tribos do estado do Pará, mostrando que em ameríndios brasileiros o HHV-8 é endêmico sem causar a doença. Estes resultados ressaltam a necessidade de co-fator(es) para o desencadeamento de doença relacionada ao HHV-8, como relatado por outros pesquisadores (ANDREONI *et al.*, 1999).

Mapa C – Distribuição de prevalência de infecção HHV-8 nos vários continentes, utilizando os ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico, em populações sadias, não infectadas pelo HIV. (Detalhes sobre autoria, linhagem celular, fixador, diluição do soro, ensaio e casuística analisada com os respectivos resultados e local de origem das amostras são apresentados no **ANEXO A**, p. 117).

Mapa D – Distribuição de prevalência de infecção HHV-8 nos vários continentes, utilizando os ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico, em populações infectadas pelo HIV. (Detalhes sobre autoria, linhagem celular, fixador, diluição do soro, ensaio e casuística analisada com os respectivos resultados e local de origem das amostras são apresentados no **ANEXO A**, p.117).

Além de auxiliar no mapeamento de regiões endêmicas de HHV-8 e em identificar populações expostas a risco de transmissão ou aquisição do vírus, os ensaios sorológicos permitiram no início, prever o surgimento de SK em 1/3 da população infectada pelo HIV, em período de 10 anos após a soroconversão HHV-8, (MOORE *et al.*, 1996). Possibilitou, ainda, relacionar altos títulos de anticorpos com progressão rápida do SK (GAO *et al.*, 1996a).

Tomando como base todas estas informações e pensando nos comentários feitos por PARRAVICINI *et al.*, 1997 que colocam“devido à gravidade das doenças causadas pelo HHV-8, principalmente em indivíduos imunodeprimidos pela infecção HIV ou pela introdução de terapia imunossupressora, torna-se importante implantar uma sorologia adequada para dar suporte ao seu diagnóstico na Rede Pública de Saúde”....., a Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo buscou a partir do ano de 1997 estudar e avaliar possíveis testes para serem utilizados no diagnóstico desta infecção e doenças associadas (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1997; CATERINO-DE-ARAUJO, 1998; CATERINO-DE-ARAUJO, 1999; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1999; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2000a,b; CARBONE *et al.*, 2001; CARBONE *et al.*, 2002; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2001; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2002a,b, CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2003; CATERINO & CIBELLA, 2003; SANTOS-FORTUNA *et al.*, 2002).

Pela boa sensibilidade e especificidade mostrada pelos testes de IFI e WB aliados à disponibilidade de equipamentos, de pessoal altamente qualificado e treinado nestas metodologias, estas foram escolhidas para serem implantadas e utilizadas na Seção de Imunologia do IAL com vistas a auxiliar a Rede Pública de Saúde na detecção de populações expostas a risco para adquirir, transmitir e/ou desenvolver doença associada ao HHV-8 em São Paulo.

Objetivos

- ✓ Pesquisar, analisar, avaliar e implantar os ensaios sorológicos para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica da infecção HHV-8 (herpesvírus humano tipo 8), úteis para serem empregados em levantamentos epidemiológicos na Rede Pública de Saúde,
- ✓ Determinar a prevalência de infecção HHV-8 em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em São Paulo e relacionar com categoria de risco epidemiológico para adquirir a infecção,
- ✓ Determinar a prevalência de infecção HHV-8 em profissionais da área da saúde e em população exposta a risco de transmissão horizontal de doenças infecciosas em São Paulo,
- ✓ Verificar o valor prognóstico da detecção de anticorpos dirigidos ao HHV-8 quanto ao desenvolvimento de SK ou outra doença relacionada ao HHV-8 em população infectada pelo HIV/AIDS de São Paulo.

Casuística

Foram analisadas quanto a presença de anticorpos dirigidos ao HHV-8 um total de 1961 amostras de soro assim distribuídas:

- ✓ 21 de indivíduos aparentemente saudáveis e normais;
- ✓ 736 de profissionais da área da saúde, aparentemente saudáveis e normais;
- ✓ 683 de indivíduos institucionalizados com deficiência mental e/ou física;
- ✓ 477 de pacientes HIV positivos e /ou AIDS, sem SK;
- ✓ 44 de pacientes com SK (42 com SK-AIDS e 2 com SK, HIV negativo).

Indivíduos saudáveis normais

Amostras de soro de 21 indivíduos saudáveis da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) coletadas no ano de 2002, sendo 9 do sexo masculino e 12 do sexo feminino, idade variando entre 23 e 62 anos, média 43 anos, sem história de doenças relacionadas à infecção HHV-8. Casuística usada para o cálculo da especificidade dos ensaios sorológicos.

Estudo retrospectivo de 736 amostras de soro provenientes de funcionários do Centro Espírita Nosso Lar - Casas André Luiz (C.E.N.L.C.A.L.), Guarulhos, S. P., coletadas no ano de 1998 e utilizadas em investigação epidemiológica intra-institucional, para conhecimento do perfil sorológico e posterior tratamento ou vacinação para hepatite B, e que se encontram estocadas na Seção de Imunologia do IAL.

A população era composta por 630 mulheres e 106 homens com idade média de 39,8 anos (variando de 19,4 a 74,4 anos), sendo 440 brancos, 72 negros e 224 pardos. O tempo de trabalho na Instituição variava de 1,4 meses a 38,9 anos (média 7,3 anos).

O Projeto foi aprovado em 2000 pelas Comissões Científica e de Ética do C.E.N.L. Casas André Luiz.

Os soros foram utilizados no cálculo de prevalência de infecção HHV-8 em profissionais da área da saúde, considerada população sadia normal de São Paulo.

Indivíduos com deficiência mental e/ou física

Estudo retrospectivo de 683 amostras de soro provenientes de indivíduos com deficiência mental e/ou física do C.E.N.L. Casas André Luiz, Guarulhos, S. P., coletadas no ano de 1998, que foram analisadas quanto à presença de antígenos e anticorpos dirigidos ao vírus da hepatite B e que se encontram na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Este material foi utilizado em investigação epidemiológica intra-institucional, para conhecimento do perfil sorológico e posterior tratamento ou vacinação para hepatite B.

A população era composta por pacientes de idade variando entre 4,9 a 52 anos (média 27,6 anos), sendo 499 brancos, 154 pardos, 28 negros e 2 amarelos. O tempo médio de internação na Instituição foi de 20,3 anos, variando de 9,5 meses a 40 anos.

Os pacientes foram agrupados segundo o Pavilhão a que pertencem:

Pavilhão 1 (P1) (158 homens, a maioria adultos que deambulam)

Pavilhão 2 (P2) (152 mulheres, adultas e acamadas)

Pavilhão 3 (P3) (189 homens, adolescentes e adultos, a maioria acamado)

Pavilhão 4 (P4) (184 homens e mulheres, de todas as faixas etárias, deambulantes e acamados)

O Projeto foi aprovado em 2000 pelas Comissões Científica e de Ética do C.E.N.L. Casas André Luiz

Os soros foram utilizados no cálculo de prevalência de infecção HHV-8 em população considerada de risco para adquirir infecções por transmissão horizontal.

Pacientes HIV positivos e/ou AIDS

Estudo transversal de 477 amostras de soro estocadas na Seção de Imunologia do IAL, provenientes de pacientes infectados pelo HIV em acompanhamento clínico-ambulatorial no Instituto de Infectologia Emílio Ribas

(IIER), que fizeram parte do projeto de Pós-Doutoramento no Exterior (Itália) da Dra. Adele Caterino-de-Araujo para pesquisa de co-infecção HIV/HTLV. Resumidamente, os soros pertenciam a 477 pacientes (314 homens e 163 mulheres), divididos em grupos de acordo com a situação de risco epidemiológico para adquirir retrovírus, sendo 120 do grupo de homossexuais e/ou bissexuais, 225 heterossexuais, 75 usuários de drogas endovenosas, 6 politransfundidos e 51 de fator de risco desconhecido. Todos os grupos representados por homens e mulheres.

Os dados clínicos e epidemiológicos (incluindo desenvolvimento de SK ou PEL) foram obtidos do prontuário dos pacientes em levantamento de 5 anos.

O Projeto foi aprovado em 1994 pelas Comissões Científica e de Ética do IIER e IAL, incluindo o consentimento informado e esclarecido dos participantes quanto à utilização deste material biológico para futuras pesquisas de novas viroses associadas à infecção HIV.

Os soros foram utilizados no cálculo da prevalência de infecção HHV-8 em indivíduos infectados pelo HIV e no seu valor prognóstico no desenvolvimento de SK ou PEL. A casuística foi utilizada no estudo da associação de infecção HHV-8 e categoria de risco epidemiológico para adquirir esta infecção.

Pacientes com sarcoma de Kaposi

As amostras de soro de 44 pacientes com SK e que apresentavam contagem de células CD4+ acima de 50/mm³, em acompanhamento clínico-laboratorial no IIER (42 com SK-AIDS e 2 com SK e sorologia negativa para a infecção HIV-1) foram utilizadas como padrão ouro na padronização dos ensaios sorológicos e no cálculo dos valores de sensibilidade.

Estas amostras já tinham resultados clínico, histológico e molecular realizados em trabalhos anteriores e se encontravam estocadas na Seção de Imunologia do IAL, sendo sua utilização aprovada para novas pesquisas, pelas Comissões Científica e de Ética do IIER e IAL.

Métodos

Ensaio imunoenzimático (ELISA-ABI)

Para estudo preliminar e determinação do valor preditivo da pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em população infectada pelo HIV, foi utilizado o conjunto de reagentes HHV-8 IgG Antibody ELISA da Advanced Biotechnologies Incorporated (ABI) - Maryland - USA, seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica e latente da infecção HHV-8 presentes no soro de indivíduos sob suspeita desta infecção foram detectados em placas de poliestireno de 96 cavidades, recobertas com antígeno bruto do HHV-8 obtido de cultura de células infectadas KS-1.

As amostras a serem analisadas juntamente aos soro controle positivo (duplicata) e soro controle negativo (triplicata) foram diluídos em tubos contendo 1000 µL de diluente da amostra e adicionando-se 10 µL de soro (diluição 1:101). Cem µL de cada diluição foram depositados nas cavidades da placa e incubados por 30 minutos a 37°C. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, em cada cavidade da placa, e após nova incubação por 30 minutos a 37 °C e 3 lavagens com tampão de lavagem a reação foi prosseguida pela adição de 100 µL de solução substrato TMB (tetrametilbenzidina). Nesta etapa da reação, as placas foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1N e a leitura feita em espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 450 nm.

O limiar de reatividade (*cut off*) da reação foi calculado pela média das densidades ópticas (D.O.) obtida de 3 controles negativos e multiplicada por 3.

Os resultados foram expressos pelo cálculo da razão: D.O. da amostra/ *cut off* da reação.

Quando esta relação foi menor ou igual a 0,75, o soro foi considerado não reagente; quando maior ou igual a 1,0, como soro reagente; e entre 0,76 e 0,99 como inconclusivo (soro "borderline").

Ainda, seguindo as recomendações do fabricante, as amostras que resultaram em relação abaixo de 3,5 foram submetidas a IFI-ABI para confirmação dos resultados.

Os reagentes componentes do ELISA-ABI encontram-se no **ANEXO B**.

Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI-ABI)

Outro método utilizado como ensaio preliminar e posterior estudo comparativo de pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 foi a imunofluorescência indireta (IFI) usando o conjunto de reagentes HHV-8 IgG Antibody IFA da Advanced Biotechnologies Incorporated (ABI) - Maryland - USA. As etapas de reação seguiram as instruções do fabricante.

Resumidamente, lâminas recobertas com células infectadas pelo HHV-8 da linhagem KS-1 foram utilizadas como antígeno para pesquisa de anticorpos específicos. O primeiro anel de cada lâmina foi reservado para o controle positivo, o segundo para o negativo, o terceiro para o tampão de lavagem e os demais para as amostras. Todos os soros foram diluídos na razão 1:40 em diluente da amostra e 20 µL dessa diluição depositada sobre os anéis da lâmina. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C e após lavagem de 10 minutos por 3 vezes com tampão, sob agitação, foram secas com auxílio de papel absorvente próprio. Posteriormente, 20 µL de anti-IgG humana conjugada à fluoresceína foram adicionados em cada anel da lâmina e incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C. Após lavagem, as lâminas foram secas e montadas com solução de montagem (glicerina alcalina) e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio com luz ultra-violeta, com aumento de 160x. Os critérios de reatividade (1+ a 4+) tiveram como base a fluorescência verde maçã difusa presente em 30% das células. Foi considerada reatividade 4+ a fluorescência

detectada no soro controle positivo na diluição 1:40. Foi considerado soro negativo a presença de coloração vermelha/alaranjada em 100% das células.

Os reagentes componentes da IFI-ABI encontram-se no **ANEXO C**.

Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI) “in house”

Para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 dirigidos a antígenos de fase latente da infecção viral, foram utilizadas células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8, soro de pacientes, conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína e contracoloração com azul de Evans, segundo técnica empregada no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (PIERROTTI, 2000) e padronizada por EDELMAN *et al.*, 2000. As mesmas células estimuladas com forbol éster foram usadas para a detecção de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica, segundo técnica descrita por SMITH *et al.*, 1997. Ambas as técnicas foram adaptadas às condições do Laboratório e otimizadas na Seção de Imunologia do IAL conforme descrito a seguir:

Manutenção e cultivo de linhagem BCBL-1

Para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 dirigidos a antígenos de fase latente da infecção viral, foram utilizadas células BCBL-1 provenientes de paciente com linfoma de células B com efusão em cavidades (BCBL), latentemente infectadas pelo HHV-8 (linhagem gentilmente doada pela Dra. Vanda Akiko Ueda Sick de Souza, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo).

Como primeira etapa do trabalho foi necessária a adaptação dessas células às condições do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Seção de Imunologia do IAL, o que levou cerca de três meses. Houve necessidade de se testarem diferentes concentrações e marcas de soro fetal bovino, antibióticos e tempo de alimentação das células (troca de meio de cultura). No início houve problemas de contaminação por fungos, que foi posteriormente solucionado com a

adição de fungicida ao meio de cultura e ao ambiente úmido da incubadora de CO₂.

As células BCBL-1 foram cultivadas em garrafas, em suspensão, usando meio RPMI 1640 acrescido de L-Glutamina e bicarbonato de sódio (GIBCO/BRL) e 10% de soro fetal bovino inativado a 56 °C por 30 min. (GIBCO/BRL). Foi também utilizado 2,5 µg /mL de anfotericina B (GIBCO/BRL) e 100 U/mL de penicilina e 100 µg /mL de estreptomicina (GIBCO/BRL). As culturas celulares foram mantidas a 37 °C em incubadora com 5% CO₂ e 93 % de umidade.

Os repiques foram feitos semanalmente, inoculando-se 2 mL da suspensão celular em 8 mL de meio de cultura fresco. Após 3 dias de incubação, as culturas foram alimentadas com mais 10 mL de meio fresco. A cada 8 dias foi feito novo repique e as células restantes (18 mL por garrafa) foram utilizadas no preparo de lâminas para a IFI.

Preparo das lâminas

A suspensão celular (18 mL por garrafa) cultivada por uma semana, foi centrifugada em tubos de 50 mL (Costar, Cambridge - MA) a 1.300 g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular lavado duas vezes com tampão salina fosfato (PBS) estéril gelado (centrifugação a 1.300 g por 10 minutos cada). O sedimento celular foi ressuspenso e a concentração de células foi acertada em microscópio óptico comum (concentração ideal aproximadamente 100 células por campo, 100X).

Aproximadamente 10 µL da suspensão celular foi aplicado em cadaanel da lâmina de IFI, e estas foram secas a temperatura ambiente.

Posteriormente, as células aderidas às lâminas foram fixadas em acetona PA gelada e mantidas em freezer – 20 °C por 20 minutos. Depois as lâminas foram secas a temperatura ambiente e embrulhadas em papel manteiga e depois em papel alumínio. As lâminas foram estocadas a -20 °C em recipiente fechado, por no máximo 3 meses.

Ensaio de IFI-LANA

Após a utilização de vários protocolos de reação, desde a fixação celular com paraformaldeído, permeabilização inicial das células pelo uso de soluções detergentes como o Triton X-100, álcool-acetona até o uso de soro fetal bovino e gelatina para bloquear sítios de ligação inespecíficos, o ensaio de IFI-LANA foi finalmente padronizado. Os melhores resultados foram obtidos com o bloqueio das lâminas por 10 minutos a 37 °C com PBS estéril contendo 1% de leite desnatado. Após a retirada do PBS-leite, foi adicionado soro diluído a partir de 1:50 em PBS-leite 1% em diluição seriada na razão 2. As lâminas incubadas por 30 minutos a 37°C (câmara úmida) e em seguida lavadas 3 vezes com PBS. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com conjugado anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma) diluído em PBS com azul de Evans e 1% de leite, por 30 minutos a 37 °C (câmara úmida). Após 3 lavagens em PBS, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada.

A diluição inicial escolhida para triagem dos soros foi de 1:50. Nos casos positivos foi feita diluição seriada até 1:25.600.

As lâminas foram lidas por no mínimo duas pessoas tecnicamente treinadas, usando-se microscópio de fluorescência da marca Zeiss (Axiolab MC80, Carl Zeiss, Alemanha) com equipamento fotográfico e aumento de 400 X.

O critério de positividade para a IFI-LANA foi a presença de fluorescência verde intensa com padrão nuclear pontilhado em mais de 90 % das células BCBL-1 (**Figura 1A**). Padrão de fluorescência pontilhado ou difuso em todas as células foi considerado indeterminado e negativo quando todas as células mostraram coloração vermelha (**Figura 1B**). Nos casos positivos, o título de anticorpos foi determinado como o inverso da maior diluição do soro que resultou em padrão positivo.

Figuras 1A e 1B. Padrão de fluorescência observado no ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente do HHV-8 (IFI-LANA) utilizando células BCBL-1 latentemente infectadas e soro de paciente com sarcoma de Kaposi e controle negativo, respectivamente.

Manutenção e cultivo de linhagem de células Ramos

As células Ramos (linhagem de células provenientes de paciente com linfoma de Burkitt, EBV negativo) foram utilizadas para descartar reações falso positivas na IFI-LANA. Estas células foram gentilmente doadas pelo Dr. Chong-Gee Teo do Public Health Laboratory Service (PHLS) de Londres e foram cultivadas na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, em suspensão, usando-se meio RPMI 1640 acrescido de L-glutamina 0,29g/L, bicarbonato de sódio 2g/L, glicose 3g/L, 10% de soro fetal bovino (inativado a 56 °C por 30 min), anfotericina B 2,5 µg /mL e 100 U/mL de penicilina e 100 µg /mL de estreptomicina. As culturas celulares foram mantidas a 37 °C em incubadora com 5% CO₂ e 93 % de umidade.

Os repiques foram feitos semanalmente, com a inoculação de 2 mL da suspensão celular em 4 mL de meio de cultura fresco. Após 3 dias de incubação, as culturas foram alimentadas com mais 4 mL de meio fresco. A cada 8 dias foi feito um novo repique e as células restantes (8 mL por garrafa) foram utilizadas no preparo de lâminas para a IFI.

Ao microscópio óptico comum, o aspecto desta linhagem celular diferiu muito do observado para as células BCBL-1. As células Ramos eram menores, cresceram em "clusters" e numa velocidade mais lenta em relação às BCBL-1. Ainda, apresentaram padrão pontilhado no citoplasma, diferentemente do que foi observado com as BCBL-1. As BCBL-1 eram grandes, refringentes e cresciam rapidamente, primeiro como "clusters" e posteriormente soltas ocupando todo o meio de cultura.

O preparo das lâminas e o ensaio de IFI para células Ramos seguiram as mesmas condições descritas para a IFI-LANA.

Foi considerada reação inespecífica na IFI-LANA os soros que resultaram positivos na IFI-Ramos em 100% das células (**Figuras 2A e 2B**).

Figuras 2A e 2B. Padrão de fluorescência observado no ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de células Ramos, utilizando soros de dois pacientes com resultado positivo na IFI-LANA e negativo no WB-LANA.

Absorção dos soros com células HEp2

As células HEp2 (linhagem de célula epitelial proveniente de carcinoma hepatocelular, da Seção de Culturas Celulares do IAL) foram descongeladas e deixadas crescer aderidas em tubo por 24 h a 37 °C em meio essencial Eagle acrescido de 2,0 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, na proporção de 1:11. Após observação em microscópio invertido (Zeiss) e retirado o meio de cultura sobrenadante, os soros que apresentaram IFI-Ramos positivos foram depositados sobre as células e deixados reagir por 15 a 18 horas a 4 °C. No dia seguinte, os soros foram colhidos com auxílio de pipeta Pasteur, centrifugados a 650 g por 10 minutos a temperatura ambiente e testados novamente quanto à presença de anticorpos anti-HHV-8 no ensaio de IFI-LANA com células BCBL-1.

Todos os meios de cultura utilizados nos repiques e manutenção das linhagens celulares encontram-se no **ANEXO D**.

Padronização do ensaio de IFI para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica de replicação do HHV-8 (IFI-Lítico)

Para o preparo de lâminas de IFI-Lítico foram utilizadas células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 estimuladas com forbol éster (PMA-phorbol myristate acetate). Este potente mitógeno possibilita que as partículas virais presentes nas células BCBL-1 passem do estado de latência para a fase lítica de replicação viral, expressando assim, diferentes antígenos.

Resumidamente, quando as células BCBL-1 se mostraram em boa concentração para preparo de lâminas de IFI-LANA, foi adicionado PMA na concentração final de 20 ng/mL no meio e mantidas por mais 72 a 96 h em incubadora de CO₂, para a expressão de antígenos de fase lítica viral.

O preparo das lâminas e o ensaio de IFI-Lítico seguiram as mesmas condições descritas para a IFI-LANA.

O critério de positividade adotado para a IFI-Lítico foi a presença de padrão de fluorescência verde maçã intenso de membrana (nuclear e externa) e difuso em toda a célula em aproximadamente 5 % das BCBL-1 (**Figura 3A**) e o de negatividade, a coloração vermelha em 100% das células (**Figura 3B**).

Figuras 3A e 3B. Padrão de fluorescência observado no ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica do HHV-8 (IFI-Lítico) utilizando células BCBL-1 infectadas e estimuladas com forbol éster (PMA), soro de paciente com sarcoma de Kaposi e controle negativo, respectivamente.

Para o teste de reprodutibilidade e estabilidade das lâminas de IFI-LANA e IFI-Lítico, foram separadas 12 unidades de cada lote e com elas foram testados soros padrões a cada 2 semanas por período de 6 meses.

Todos os reagentes utilizados na padronização dos ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico encontram-se no **ANEXO E**.

Para a confirmação dos resultados obtidos com os ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico foi otimizado o ensaio de “Western blotting” (WB), de acordo com técnica anteriormente padronizada na Seção de Imunologia do IAL, conforme descrição a seguir.

Ensaio de Western Blot (WB-LANA, WB-Lítico)

Padronização e Otimização do Ensaio de Western Blot (WB-LANA, WB-Lítico)

Preparo do antígeno LANA

Para a obtenção do antígeno a ser utilizado no WB partiu-se de garrafas de cultura de células BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 de 8 dias. Após duas lavagens em PBS estéril foram feitas várias tentativas para se acertar a concentração ideal de células e o melhor tampão de lise.

Foram testadas concentrações celulares que variaram de 0,5 a $2,5 \times 10^5$ por mL e dois tampões de lise: um contendo SDS e 2-mercaptoetanol e outro SDS e proteinase K. Foram ainda analisados o lisado celular total e o sobrenadante do lisado celular obtido por centrifugação a 55.000 g por 60 minutos a 4 °C (centrífuga Sorvall Super T-21, refrigerada de mesa, Sorvall, Inc., Newton, USA).

Os melhores resultados foram obtidos com sedimento celular ressuspensão a $2,5 \times 10^5$ por mL de água destilada [4 partes], com rompimento subsequente por congelamento e descongelamento, adição de 1 parte de tampão de lise 5 vezes concentrado contendo SDS e 2-mercaptoetanol e ultracentrifugação do produto.

Este material foi estocado em alíquotas e conservado a -70 °C (Freezer Scientemp, Michigan, USA) para análise posterior por “Western blotting” recebendo a denominação de antígeno LANA.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (SDS-PAGE) foi conduzida segundo método de Laemmli, utilizando um gel de empilhamento a 5% e gel de separação a 12,5%. O antígeno LANA foi solubilizado por aquecimento a 100 °C (banho-maria Haake B3, Germany) por 5 minutos em tampão de ruptura (6 mM Tris-HCl, pH 6,8 contendo

glicerol 25% (v/v), SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 0,5% (v/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v), em água deionizada) (LAEMMLI, 1970). Foram aplicados 30 µL de antígeno em cada orifício do gel; e para a transferência e o “Western blotting”, 100 µL de antígeno em cada mini-gel (sistema Mini Protean II Electrophoresis Cell, Bio-Rad, Hercules, USA e fonte modelo 200, 2.0 da Bio-Rad, Hercules, USA).

A corrida eletroforética foi realizada com uma diferença de potencial de 100 V para percorrer o gel de empilhamento e 120 V para percorrer o gel de separação.

Proteínas de PM variando entre 221 a 11 KDa foram utilizadas como marcadores de PM (Bench Mark TM Prestained Protein Ladder, GIBCO/BRL) (PM: 221, 133, 93, 67, 56, 42, 28, 23, 17, 11).

Ao término da corrida, para controle da reação, um dos géis foi fixado por 30 minutos a temperatura ambiente em solução contendo metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v); corado por 10 minutos a 56 °C com solução azul brilhante-R 0,1% (p/v) e descorado com solução de ácido acético glacial 7%, a 56 °C (incubadora Fanen, São Paulo, Br), 4 vezes, 20 minutos cada, até a visualização de bandas.

Após a corrida eletroforética dos antígenos em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% foi observada composição protéica semelhante quando fracionados os antígenos bruto e sobrenadante obtidos por lise com SDS e 2-mercaptoetanol (**Figura 4A**, colunas 1,2 e 5,6, respectivamente).

Já para o antígeno obtido por lise com SDS e proteinase K, houve degradação total das proteínas, com ausência de bandas no SDS-PAGE (**Figura 4A**, colunas 3 e 4).

Após definição do antígeno procedeu-se a escolha da melhor concentração do gel de poliacrilamida. Foram testadas concentrações de acrilamida variando entre 7,5 e 12,5%, sendo estabelecido 10% a concentração ideal que resultou em melhor definição de bandas (**Figura 4B**).

As soluções tampões e corantes empregados no SDS-PAGE encontram-se no **ANEXO F**.

Figura 4A. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12,5%) de antígenos brutos de HHV-8 obtidos a partir de lisado viral total e sobrenadante de lisado de células BCBL-1 latentemente infectadas. Colunas 1, 2: lisado viral total e colunas 5 e 6 antígeno sobrenadante obtidos por lise com SDS e 2 mercaptoetanol. Colunas 3 e 4 lisado viral total e antígeno sobrenadante obtidos por lise com SDS e proteinase K. **Figura 4B.** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%) de antígeno sobrenadante obtido por lise com SDS e 2-mercaptoetanol.

“Western Blotting”

O gel onde foi corrido 100 µL de antígeno sobrenadante foi submetido ao processo de transferência padrão para membranas de nitrocelulose de 0,22 µm da Bio-Rad, segundo técnica descrita por TOWBIN *et al.* (1979). Foram usados para transferência uma diferença de potencial constante de 30 V para 2 mini-géis e tampão constituído por 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e metanol 20% (v/v), pH 8,3. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram submetidas à coloração de Ponceau (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) por 60

segundos e descoradas em água destilada. Esta etapa foi utilizada como controle de transferência das proteínas (sistema de transferência artesanal segundo modelo de Transblot Transfer Cell da Bio-Rad, Hercules, USA).

As membranas de nitrocelulose com as proteínas transferidas do SDS-PAGE foram cortadas em tiras, tratadas com tampão Tris-Salina contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Br) por 2 h a temperatura ambiente sob agitação visando saturar os sítios inespecíficos (Shaker Aros 160 TM, Thermolyne, Iowa, USA).

Posteriormente, foram depositados sobre as membranas o soro controle positivo de paciente com sarcoma de Kaposi, soros controle negativos e soros suspeitos de infecção HHV-8.

Os soros foram utilizados no volume final de 1 mL na diluição 1:100 em tampão Tris-Salina contendo 1% de leite desnatado. Esta etapa de incubação das tiras com os soros foi conduzida a temperatura ambiente sob agitação por 18 h, seguida de cinco lavagens de 5 minutos com solução Tris-Salina, pH 7,5.

Após este período, as membranas foram expostas ao soro anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), diluído a 1:2.000 e mantidas por 2 h sob agitação a temperatura ambiente, protegidas da luz. Posteriormente, foram lavadas 4 vezes por 5 minutos cada em tampão Tris-Salina pH 7,5.

Para a revelação da reação foi utilizada solução contendo 4-cloro 1-naftol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) e água oxigenada (peridrol, Merck S.A., Rio de Janeiro, Br). O bloqueio da reação foi feito por lavagens com água destilada.

Na padronização do WB-Lítico basicamente foram seguidas as mesmas etapas descritas para o WB-LANA, diferindo no preparo do antígeno que partiu de cultura de células BCBL-1 estimuladas por 96 h com PMA.

As soluções, tampões e corantes utilizados nos ensaios de WB-LANA e WB-Lítico se encontram no **ANEXO G** e os conjugados empregados nos ensaios de IFI e WB no **ANEXO H**.

Determinação do Peso Molecular (PM)

Os Pesos Moleculares (PM) das bandas foram calculados colocando seus Rf(s) (Referent front) na curva de calibração construída com os padrões de PM. A curva foi traçada em papel monolog, colocando-se os valores dos padrões de PM no eixo das ordenadas e os valores calculados no eixo das abscissas.

$$Rf = \frac{\text{distância em mm da migração de cada padrão ou amostra}}{\text{distância em mm da migração do corante azul brilhante} - R}$$

Foram considerados positivos no WB-LANA os soros que reconheceram bandas na altura de 234 e 226 KDa e no WB-Lítico os soros com reatividade para antígeno de 60 KDa.

Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para utilizar amostras de soro como padrão ouro nas reações sorológicas procedeu-se a pesquisa de segmento ORF 26 do genoma HHV-8 em material de biópsia obtido de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de sarcoma de Kaposi. Para tanto foi usada a técnica de PCR “nested” segundo as condições descritas por CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1997 e casuística da Tese de Doutorado de Eliana Rodrigues (RODRIGUES, 2000).

Figuras 5A e 5B. Amostras representativas do padrão eletroforético de extratos de DNA (A) e produtos de PCR “nested” ORF 26 (B) do genoma HHV-8 (banda de 233 pb) obtidos de material de biópsia de casos com SK. Marcador de fragmentos de DNA (DNA Ladder 1 Kb, GIBCO-BRL).

Apresentação e análise dos resultados

Optou-se pela apresentação em forma de Quadros dos resultados individuais de sorologia positiva e globais (sorologia positiva e negativa) de cada grupo analisado. Tabelas também foram usadas no sentido de apresentar as distribuições dos totais de casos e de controles. Isto permitiu um estudo comparativo dos resultados entre ensaios, intra grupo e entre grupos de indivíduos testados.

Para o cálculo da sensibilidade dos ensaios otimizados “in house” (IFI-LANA, IFI-Lítico e WB-LANA) foram utilizados soros controle-positivos obtidos de pacientes com infecção confirmada pelo HHV-8, por análise histológica e PCR positiva para segmento ORF 26 do genoma viral na lesão SK (44 casos do IIER). Já para o cálculo da especificidade foram usados soros controle-negativos obtidos de indivíduos aparentemente sadios e normais, sem lesão SK aparente (21 profissionais do laboratório da Seção de Imunologia do IAL).

Para o cálculo da prevalência de infecção HHV-8 nos vários grupos de indivíduos analisados neste trabalho, foi usado o número total de casos que resultaram em sorologia positiva em pelo menos um dos ensaios de IFI-LANA confirmado pelo WB-LANA e IFI-Lítico.

Por não ser possível o acesso aos dados epidemiológicos dos pacientes com deficiência física e/ou mental e dos funcionários sadios do CENLICAL que resultaram em sorologia negativa para a infecção HHV-8 e por não se dispor de dados clínicos relacionados à infecção HHV-8 nestes grupos de indivíduos, foi apenas feita uma análise descritiva dos resultados, não tendo sido aplicado nenhum teste estatístico para análise e comparação dos dados. O único grupo onde foi possível obter estas informações foi o de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK do IIER, no qual um estudo longitudinal de 5 anos possibilitou utilizar os dados de sorologia HHV-8 e comparar com evolução para doença SK (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2000a).

Os resultados sorológicos de infecção HHV-8 obtidos com este grupo de pacientes foram analisados pelo método estatístico do quiquadrado e inseridos no programa Epi Info versão 6,04, produzido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC-Atlanta-GA-USA).

Os dados dos ensaios de IFI-LANA, IFI-Lítico, WB-LANA e da sorologia HHV-8 foram consideradas variáveis dependentes, enquanto os dados epidemiológicos relacionados a idade, sexo e categoria de risco dos pacientes, como variáveis independentes.

A associação destas variáveis foi verificada por análise univariada, pelo cálculo da “*odds ratio*” com o respectivo intervalo de confiança. Foi considerado que houve associação significativa entre as variáveis quando $p < 0,05$ (Yates).

Resultados

Primeiramente são apresentados e discutidos os resultados obtidos com a padronização e utilização dos ensaios “in house” de IFI-LANA e IFI-Lítico e nos casos em que foi possível realizar a triagem sorológica pelos “kits” de reagentes comerciais da ABI, comparados os resultados obtidos e calculada a sensibilidade dos ensaios.

O **Quadro 1** mostra as características epidemiológicas do grupo controle positivo (44 pacientes com SK confirmados por exames clínicos, histológicos e de biologia molecular) e apresenta os resultados individuais da pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 expressos em título de anticorpos nos ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico. Foi verificada a diversidade de títulos que variaram de 50 a 25.600. Curiosamente, 3 casos não demonstraram sorologia positiva nestes ensaios (pt. 24, pt. 26 e pt. 81).

A **Tabela 1A** apresenta os resultados globais desta pesquisa e ressalta o maior número de casos de infecção/doença HHV-8 entre a população de homossexuais/bissexuais masculinos. Com este grupo de pacientes foi possível calcular a sensibilidade dos ensaios “in house” que foi de 75,0 % para a IFI-LANA e 90,9% para a IFI-Lítico.

Um estudo comparativo com parte desta casuística usando o “kit” de IFI-ABI mostrou maior sensibilidade em detectar indivíduos HHV-8-soropositivos (100% dos casos) em relação aos 93,2% dos casos detectados pelos ensaios de IFI-LANA e/ou IFI-Lítico (**Quadro 1**).

Quando foi testado o grupo controle negativo (21 indivíduos sadios do laboratório do IAL, sem lesão SK) os resultados obtidos nos ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico mostraram alta especificidade dos mesmos: 95,24 % para a IFI-LANA e 100% para a IFI-Lítico. Apenas um soro apresentou sorologia positiva pela IFI-LANA (soro n. 6, **Quadro 2**).

O **Quadro 3A** apresentado no **ANEXO I** mostra as características epidemiológicas e os resultados individuais dos 477 pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK do IIER e o **Quadro 3B** destaca as amostras que demonstraram em pelo menos um dos ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico positivos (95 pacientes).

A **Tabela 2A** resume os resultados globais dos 477 pacientes e mostra que 4,8% apresentaram anticorpos para antígenos LANA e 17,0% para antígenos líticos. Houve maior prevalência de infecção HHV-8 no grupo de homossexuais /bissexuais masculinos, com valores de soropositividade de 15,0% para a IFI-LANA e 31,6% para a IFI-Lítico.

As **Tabelas 3 e 4** mostram estes mesmos resultados quando submetidos à análise estatística pelo método do quiquadrado para verificar associação de variáveis e para calcular “*odds ratio*” com os respectivos intervalos de confiança. Os resultados obtidos nesta análise confirmaram associação estatisticamente significativa entre sorologia HHV-8 positiva e as variáveis sexo masculino e prática de risco homossexual ou bissexual, independentemente do ensaio utilizado: IFI-LANA e/ou IFI-Lítico.

Um dado curioso foi o fato de, nesta população de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK do IIER, os anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica viral terem sido detectados em altos títulos e em maior número de amostras que dos anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente viral. Sessenta e oito amostras demonstraram somente IFI-Lítico positivo (**Quadro 3B**). Seria de se esperar que nesta população de indivíduos, as manifestações clínicas da infecção HHV-8 fossem detectadas. No entanto, dos 477 pacientes apenas 10 desenvolveram SK durante seguimento de 5 anos (casos que aparecem em negrito no **Quadro 3A**; 7 dos quais haviam resultado sorologia positiva para o HHV-8: um só para IFI-LANA (pt. 549) e 6 para IFI-Lítico, (pt. 83, pt. 106, pt. 190, pt. 267, pt. 413 e pt. 496), (casos em negrito no **Quadro 3B**).

Novamente, as **Tabelas 3 e 4** ressaltam a maior percentagem de soropositividade conseguida com a IFI-Lítico em relação à IFI-LANA, para as três variáveis analisadas (sexo, idade e categoria de risco).

Nesta fase da pesquisa foram empregados, em grande parte desta casuística, os “kits” comerciais ELISA-ABI e IFI-ABI para a pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica e latente da infecção HHV-8. Os resultados obtidos com o ensaio de ELISA-ABI mais os dados de levantamento de 5 anos dos prontuários desses pacientes permitiu mostrar que a introdução de terapia antiretroviral em São Paulo a partir do ano de 1994, foi capaz de diminuir os casos de SK, que passaram de 20% para 2%, mesmo não havendo alteração dos resultados sorológicos, ou seja, a prevalência de infecção HHV-8 nesta casuística detectada pelo “kit” ELISA-ABI foi de 17,2% (CATERINO-DE-ARAUJO *et al*, 2000a, **ANEXO J**).

Novamente, deve-se ressaltar a maior sensibilidade do “kit” IFI-ABI em relação ao ELISA-ABI, IFI-LANA e IFI-Lítico em detectar casos de infecção HHV-8, neste grupo de pacientes (**Quadros 3A e 3B**).

Os **Quadros 4 e 5** mostram as características epidemiológicas e os resultados de sorologia positiva para o HHV-8 no grupo de pacientes e de funcionários do CENLICAL, respectivamente, e a **Tabela 5** apresenta os resultados globais desta pesquisa.

Houve maior número de amostras positivas para a presença de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica viral no grupo de pacientes (**Quadro 4 e Tabela 5**), enquanto os anticorpos dirigidos para antígenos de fase latente viral foram detectados predominantemente no grupo de funcionários do CENLICAL, todos do sexo feminino (**Quadro 5 e Tabela 5**).

Quando foi testada a qualidade das lâminas de IFI para pesquisa de anticorpos dirigidos aos antígenos LANA e Lítico, houve reprodutibilidade de resultados obtidos com os soros padrões (três soros reagentes com título

conhecido e um soro controle negativo), com lâminas estocadas por período de até 3 meses. Vários lotes foram avaliados com mais de 100 reações executadas.

Com a padronização do WB-LANA onde foram considerados positivos os soros que reconheceram bandas de 234 e 226 KDa (**Figura 1**), foram testados todos os soros dos grupos controle positivo e negativo (pacientes com SK e indivíduos sadios normais) e todos os soros do grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS e do CENLCAL.

Vários lotes de antígenos analisados com os soros padrões, mostraram sempre o mesmo perfil de bandas no WB-LANA. Trinta e cinco dos 44 pacientes com SK que apresentaram IFI-LANA positivos, três não confirmaram positividade no WB-LANA, mesmo aumentando a concentração do soro (diluição 1:20) (**Quadro 1**, pacientes em destaque). Uma amostra do grupo controle negativo para SK, resultou em IFI-LANA positiva e WB negativo em várias análises (**Quadro 2**).

Houve também menor número de amostras positivas para o WB-LANA em relação a IFI-LANA no grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS, sem SK. Foram detectadas 26 amostras IFI-LANA positiva e apenas 22 confirmaram WB-LANA positivo. Curiosamente, uma amostra (Pt. 373) apresentou positividade apenas no WB-LANA. (**Quadros 3A e 3B, Tabela 2A**).

Mais intrigante ainda foram os resultados obtidos com o grupo de funcionários do CENLCAL. Das 16 amostras que apresentaram IFI-LANA positiva, apenas 7 resultaram em WB-LANA positivo, enquanto no grupo de pacientes do CENLCAL, as 4 amostras IFI-LANA positivas, todas confirmaram reatividade no WB-LANA. (**Quadros 4 e 5**).

Estranhamente, o grupo de pessoas sadias do CENLCAL, considerado supostamente normal, foi o que mostrou maior número de resultados discordantes entre a IFI-LANA e WB-LANA.

Para se descartar a reação falso-positiva na IFI-LANA para o HHV-8, foram utilizadas células Ramos (linhagem de células B provenientes de paciente com linfoma de Burkitt, EBV negativa) na reação de IFI.

Foram testados todos os soros com resultados discordantes entre a IFI-LANA e o WB-LANA. Os resultados obtidos mostraram que havia reação positiva na IFI com células Ramos em 4 grupos: 3 amostras no grupo SK, 1 amostra no grupo controle negativo, 5 nos casos de infecção HIV/AIDS sem SK e 9 no grupo de funcionários do CENLICAL. (Resultados sombreados nos **Quadros 1, 2, 3A, 3B e 5**).

Estes achados mostraram que poderia ter havido reatividade cruzada de anticorpos dirigidos a componentes de células B (Ramos) com componentes de células BCBL-1 infectadas pelo HHV-8. Para se descartar reações falso positivas na IFI-LANA, os soros foram absorvidos com células HEp2.

Após absorção, houve alteração dos resultados da IFI-LANA para o HHV-8 em 5 amostras: 2 do grupo SK e 3 do grupo HIV/AIDS sem SK (casos em destaque no **Quadro 1**: pt 22 e pt 92 e **Quadro 3B**: pt 63, pt 213 e pt 216). Estas amostras foram excluídas do cálculo de sensibilidade do ensaio IFI-LANA, por se tratarem de resultados falso-positivos.

Os soros que continuaram resultando positivos na IFI-LANA e negativos no WB-LANA foram novamente absorvidos com células HEp2 e não houve alteração de resultados; portanto, foram considerados IFI-LANA positivos.

Porém, para se descartar reatividade cruzada com outro vírus do grupo herpes (EBV), foram escolhidos dois soros do grupo de funcionários do CENLICAL que resultaram em IFI-LANA positivo, um com título 800 e outro com título 1.600, para serem testados quanto à presença de anticorpos heterófilos na reação de Paul-Bunnell-Davidson e hemolisina de hemácias de boi, utilizadas na rotina diagnóstica de mononucleose infecciosa na Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz. Ambos apresentaram resultados negativos descartando-se assim reação falso-positiva na IFI-LANA por reatividade cruzada com EBV (**Quadro 5**, casos 805/4198F e 1161/2794F em evidência).

No entanto, por falta de material biológico, não foi possível pesquisar nestes soros a presença de auto-anticorpos relacionados a doenças auto-imunes. Isto fez com que o ensaio de WB-LANA fosse no final considerado como confirmatório para a presença de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente do HHV-8.

As **Tabelas 1B e 2B** resumem os resultados obtidos nos ensaios de WB-LANA e IFI-Lítico nos grupos de pacientes com sarcoma de Kaposi e com HIV/AIDS sem sarcoma de Kaposi, respectivamente, ressaltando mais uma vez a maior reatividade de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica da infecção HHV-8, nesses grupos de pacientes.

Utilizando este critério de maior estringência na análise estatística dos resultados do grupo infectado pelo HIV/AIDS sem SK, foi confirmada a associação estatisticamente significativa entre os resultados do WB-LANA e a prática de risco homossexual ou bissexual em indivíduos do sexo masculino (**Tabela 6**).

Usando amostras representativas dos vários grupos de indivíduos que apresentaram IFI-LANA ou IFI-Lítico positivos e soros controle negativos nesses ensaios na padronização do WB-lítico, foi observada multiplicidade de bandas na faixa que compreende os componentes protéicos de 40 a 90 KDa em quase todos os soros analisados (**Figura 2**). Isto dificultou a interpretação dos resultados e até mesmo impossibilitou a utilização deste teste como confirmatório e/ou complementar ao ensaio IFI-Lítico, pois a banda que se esperava (60 KDa) não pôde ser diferenciada dentre as inúmeras bandas presentes tanto nos casos positivos, quanto nos negativos. Mesmo usando concentrações mais elevadas de gel de poliacrilamida e até mesmo gel gradiente (7,0 a 20,0%) visando melhorar a separação e visibilização desta banda, não foi possível se chegar a uma conclusão e, portanto, esta técnica foi descartada como confirmatória. O cálculo do Rf a partir do marcador de PM não foi capaz de discriminar e elucidar os resultados obtidos.

Apesar destas dificuldades, para se confirmarem os resultados positivos obtidos no ensaio de IFI-Lítico e se descartar possível reatividade cruzada com outros vírus do grupo herpes, foi utilizada uma estratégia indireta de pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em soro de casos confirmados de infecção aguda e/ou ativação de infecção latente pelos vírus Epstein-Barr e citomegalovírus (soros gentilmente cedidos pela Seção de Sorologia e Virologia do Instituto Adolfo Lutz). Todos os 10 soros analisados com títulos altos para esses vírus, resultaram IFI-Lítico negativos.

Não foi necessário recorrer ao uso de absorção de soros IFI-Lítico positivos com células HEp2, pois não foi detectada reação fluorescente inespecífica em 100% das células BCBL-1 estimuladas com TPA, em todos os soros analisados.

Finalmente, considerando o fato que um indivíduo pode apresentar infecção latente ou ativa pelo HHV-8, para o cálculo da sensibilidade dos testes sorológicos para pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica de replicação viral, foram considerados os resultados globais do WB-LANA e da IFI-Lítico que revelaram presença de anticorpos em 93,2% dos casos com sarcoma de Kaposi (**Tabela 1B**).

Assim sendo, tomando como base os parâmetros anteriores, para a população de indivíduos infectados pelo HIV/AIDS sem SK, a prevalência de infecção HHV-8 foi de 19,3 % (92 casos), enquanto para os pacientes com deficiência mental e/ou física foi de 1,6 % (11 casos) e para a população sadia de funcionários do CENLICAL foi de 1,1% (8 casos) (**Tabela 2B e Quadros 4 e 5**).

Os resultados globais da sorologia HHV-8 no grupo de pacientes infectados pelo HIV/AIDS sem SK, confirmaram associação estatisticamente significativa entre sorologia HHV-8 positiva e as variáveis sexo masculino e prática de risco homossexual ou bissexual (**Tabela 7**).

Quadro 1. Resultados individuais obtidos com os ensaios de IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 44 amostras de soro de pacientes com sarcoma de Kaposi

PACIENTE N. NOME		DATA	IDADE/SEXO/RISCO	IFI-ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI-LÍTICO*
02	VVL	18/11/98	48/M/Bis	++++	25.600/+	3.200
03	FEFOF	18/11/98	27/M/Homo	+++	25.600/+	3.200
04	ORS	18/11/98	41/M/Homo	++++	1.600/+	800
05	LAS	25/11/98	31/M/Homo	+++	200/+	800
06	MS	25/11/98	Desc/M/Desc	+	100/+	100
07	EJCS	25/11/98	44/M/Homo	+++	200/+	800
09	NAC	01/12/98	44/M/Homo	++++	200/+	6.400
11	ECN	02/12/98	31/M/Bis/UDEV	++++	200/+	800
12	COS	09/12/98	33/M/Hetero	++++	800/+	3.200
13	JFC	16/12/98	40/M/Bis	+++	200/+	-
15§	AM	12/03/99	37/M/Homo	+++	800/+	1.600
16	JPS	16/03/99	52/M/Homo	++	400/+	400
17	SAB	16/03/99	31/M/Homo	+++	-/-	50
18	WRF	23/03/99	48/M/Hetero/UDEV	++++	1.600/+	25.600
20§	LCOD	23/03/99	56/M/Homo	++++	200/+	3.200
21	EMS	29/03/99	27/M/Bis	++++	12.800/+	3.200
22	AMJ	30/03/99	31/M/Bis	+++	200/-	400
23	ABS	30/03/99	32/M/Bis	+++	-/-	50
24	MBT	30/03/99	27/M/Desc	+++	-/-	-
25	MR	31/03/99	43/M/Hetero	++++	800/+	25.600
26	JMS	31/03/99	33/M/Hetero	++++	-/-	-
27	MB	06/04/99	29/M/Bis	++	-/-	3.200
28	GWC	06/04/99	36/M/Homo/UDEV	++++	800/+	800
30	ECG	13/04/99	35/M/Homo/UDEV	++++	200/+	400
31	AGL	20/04/99	43/M/Homo/UDEV	++++	25.600/+	3.200
32	CLS	27/04/99	40/M/Bis	+++	100/-	400
33	ESS	30/04/99	24/M/Homo	+++	3.200/+	800
35	MRB	19/05/99	21/M/Homo	++++	6.400/+	1.600
38	ASM	10/06/99	22/M/Bis	++++	1.600/+	3.200
39	JG	06/07/99	34/M/Bis	++++	25.600/+	3.200
41	NMS	10/08/99	50/M/Hetero	++++	-/-	50
42	JSS	12/08/99	30/M/Hetero	++++	1.600/+	800
52	CRS	06/10/99	31/F/Hetero	++++	3.200/+	200
53	KRP	01/12/99	25/F/Hetero	++++	-/-	100
61	AAM	02/08/00	38/F/Desc	NR	800/+	100
70	AAB	20/11/00	32/M/Desc	NR	50/+	100
73	GFSB	06/10/00	22/M/Hetero	NR	50/+	6.400
76	VSS	24/10/00	46/M/Desc	NR	1.600/+	200
79	PGL	15/12/00	44/M/Desc	NR	-/-	100
80	MAS	15/12/00	34/M/Desc	NR	800/+	100
81	RABJ	22/03/01	41/M/Bis	NR	-/-	-
88	CSS	14/05/01	27/M/Homo	NR	1.600/+	1.600
92	FG	21/08/01	48/M/Bis	NR	100/-	1.600
99	FOL	04/10/01	60/M/Bis	NR	400/+	1.600

Idade em anos; Categoria de risco para adquirir a infecção HIV: Homossexual ou Bissexual, Heterossexual, Usuário de drogas endovenosas, Desconhecido.

* Resultados expressos segundo descrição em Material e Métodos

§ HIV negativo; NR não realizado; - negativo; + positivo

Soros reagentes na IFI-Ramos e absorvidos com células HEp 2

■ Soros que resultaram IFI-LANA negativa após absorção com células HEp 2

Tabela 1A. Distribuição de resultados obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 44 pacientes com sarcoma de Kaposi, de acordo com a categoria de risco e sexo

Grupo de Pacientes com SK	Risco	Sexo	n. de amostras testadas	IFI-LANA* N (%)	WB-LANA* N (%)	IFI-LÍTICO* N (%)
Homo/Bis		Masc	28	22	21	26
		Fem	-	-	-	-
Subtotal			28	22 (78,6%)	21 (75,0%)	26 (92,8%)
Hetero		Masc	6	4	4	5
		Fem	2	1	1	2
Subtotal			8	5 (62,5%)	5 (62,5%)	7 (87,5%)
UDEV		Masc	1	1	1	1
		Fem	-	-	-	-
Subtotal			1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Desc		Masc	6	4	4	5
		Fem	1	1	1	1
Subtotal			7	5 (71,4%)	5 (71,4%)	6 (85,7%)
TOTAL			44	33 (75,0%)	32 (72,7%)	40 (90,9%)

* Critérios de positividade descritos em Material e Métodos

Tabela 1B. Resultados obtidos nos ensaios de WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em pacientes com sarcoma de Kaposi.

IFI-Lítico	Positivo	Negativo	Total
WB-LANA			
Positivo	31	1	32
Negativo	9	3	12
Total	40	4	44

Quadro 2. Resultados individuais obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 21 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, sem sarcoma de Kaposi

CASO N. NOME	IDADE/SEXO/COR	IFI-LANA*	WB-LANA*	IFI-LÍTICO*
1- SELC	23/F/B	-	-	-
2- AAM	30/M/B	-	-	-
3- CAA	52/M/B	-	-	-
4- ACA	46/F/B	-	-	-
5- LAF	43/M/B	-	-	-
6- ESF	37/F/B	200	-	-
7- DM	25/M/B	-	-	-
8- MSM	42/F/B	-	-	-
9- RTK	53/F/A	-	-	-
10- CFT	37/F/B	-	-	-
11- EMS	55/F/P	-	-	-
12- VGS	35/M/B	-	-	-
13- TPA	55/F/B	-	-	-
14- AVC	61/F/N	-	-	-
15- MMS	34/F/B	-	-	-
16- DFS	26/M/B	-	-	-
17- APV	35/F/B	-	-	-
18- IMZ	62/F/B	-	-	-
19- HIR	55/M/B	-	-	-
20- PN	58/M/A	-	-	-
21- FCGC	41/M/P	-	-	-

Idade em anos; cor ou raça (B: branco, N: negro; P: pardo, A: amarelo).

- negativo; + positivo

Soro reagente na IFI-Ramos, absorvido com células HEp 2

Quadro 3B. Resultados positivos individuais obtidos em pelo menos um dos ensaios de ELISA-ABI, IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 95 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi

PACIENTE N.- NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI-ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
1-HHS	08/06/94	33/F/Hetero	-	+	-/-	200
3-CRR	08/06/94	21/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
10-IRC	13/06/94	24/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
11-JPN	13/06/94	29/M/Homo	+	+	-/-	200
13-HBA	13/06/94	30/M/IVDA	-	-	-/-	200
19-MOC	14/06/94	28/M/Bis	-	+++	-/-	100
35-AGL	15/06/94	32/M/Bis	+	++++	3.200/+	800
41-MFGO	16/06/94	30/F/Hetero	+	++++	800/+	800
43-RLA	16/06/94	27/M/Homo	-	+	100/-	200
60-CJL	20/06/94	33/M/Homo	+	+++	800/+	200
63-IMF	20/06/94	47/M/Homo	+	+++	50/-	-
83-JGCN	23/06/94	26/M/Bis	+	++++	400/+	200
84-MAC	24/06/94	25/M/Hetero	-	++	-/-	100
86-RCV	24/06/94	29/M/Homo	+	+++	200/+	400
89-RMS	27/06/94	22/F/Hetero		+++	-/-	400
90-DPL	27/06/94	31/M/Homo	+	++++	-/-	200
93-COS	27/06/94	26/M/Homo	+	+++	-/-	200
97-WB	28/06/94	34/M/Homo	+	++	400/+	-
106-RVS	30/06/94	30/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
108-LGCL	30/06/94	27/M/Desc	+	+++	200/+	400
114-GSS	04/07/94	43/M/Bis	+	+++	200/+	-
118-LMO	04/07/94	28/M/Homo	+	+++	100/+	200
123-FPC	05/07/94	49/M/Hetero	+	++++	-/-	1.600
137-SOE	06/07/94	36/M/Hetero	+	++	-/-	800
140-JOM	07/07/94	34/M/Homo	+	++++	-/-	3.200
141-VOC	07/07/94	36/M/Homo	-	++	50/+	-
149-CR	08/07/94	35/F/Hetero	+	++	-/-	200
157-AM	12/07/94	33/M/Homo	-	+++	-/-	200
160-ASL	13/07/94	17/M/IVDA	-	++++	-/-	200
163-RF	13/07/94	31/M/IVDA	-	-	-/-	200
165-JMS	13/07/94	51/M/Bis	+	++++	-/-	400
166-YA	14/07/94	33/M/Hetero	-	+++	-/-	200
168-BSR	14/07/94	38/M/Homo	+	+++	800/+	200
169-ELS	14/07/94	31/M/Hetero	+	++++	-/-	200
185-JAS	15/07/94	19/M/Homo	+	+++	800/+	-
190-ERS	18/07/94	22/M/Homo	-	+	-/-	1.600
191-JAS	18/07/94	41/M/Hetero	+	++++	-/-	3.200
203-CIS	19/07/94	36/M/Homo	+	+++	-/-	100
210-SKL	20/07/94	36/M/ Desc	+	++++	-/-	800
213-MLA	21/07/94	29/F/Hetero	-	+++	400/-	-
214-JLTM	21/07/94	46/M/Desc	+	++++	-/-	400
216-ICL	21/07/94	33/M/Homo	-	++	50/-	-
222-PLLL	22/07/94	28/M/Hetero	+	++++	-/-	400
249-JVT	27/07/94	25/M/Homo	+	+++	-/-	400
259-LPS	28/07/94	27/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
267-IF	01/08/94	43/M/Bis	+	++++	-/-	3.200
276- JRM	02/08/94	25/M/Homo	+	NR	1.600/+	-
283-JAP	03/08/94	29/F/Hetero	-	NR	-/-	400
284-ATN	03/08/94	37/M/Hetero	-	NR	-/-	3.200
285-EJR	03/08/94	44/F/Hetero	-	NR	-/-	1.600

Cont. Quadro 3B

PACIENTE N.- NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI-ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
286-RD	03/08/94	29/M/Homo	-	NR	-/-	1.600
288-DS	03/08/94	28/M/Bis	-	NR	-/-	200
291-JAS	04/08/94	20/M/Homo	-	NR	-/-	200
302-MFTR	05/08/94	49/M/Homo	+	NR	-/-	100
303-LCA	05/08/94	39/M/Bis	+	NR	100/+	25.600
304-CHC	05/08/94	37/M/Bis	+	NR	-/-	800
310-MPM	05/08/94	44/M/Hetero	+	NR	50/-	1.600
311-GSA	05/08/94	27/M/Hetero	+	NR	-/-	200
318-DPS	09/08/94	23/F/Hetero	+	NR	-/-	100
323-LMO	10/08/94	28/M/Homo	+	NR	100/+	-
331-ZIS	10/08/94	32/M/Homo	-	NR	-/-	12.800
336-JAA	11/08/94	51/M/Hetero	-	NR	-/-	100
353-ECS	15/08/94	24/F/IVDA	-	+	-/-	100
373-EBB	18/08/94	55/M/Homo	+	+++	-/+	100
374-JLTMV	18/08/94	46/M/Desc	+	+++	-/-	200
376-JRSN	18/08/94	22/M/Homo	+	+++	-/-	200
387-VAM	18/08/94	36/M/Homo	+	++++	400/+	-
389-RM	19/08/94	33/F/Hetero	+	++	-/-	200
393-MJF	19/08/94	34/F/Hetero	-	+++	-/-	100
413-JVS	22/08/94	51/M/Homo	+	++++	-/-	400
421-VO	23/08/94	36/M/Bis	+	+++	800/+	-
426-RF	23/08/94	35/M/Homo	+	+++	800/+	1600
435-EPS	24/08/94	25/F/Hetero	+	++	-/-	3.200
436-OMB	24/08/94	36/M/Hetero	-	+	-/-	1.600
444-FCN	25/08/94	42/M/Homo	+	++	-/-	100
448-MRWD	25/08/94	36/F/Hetero	-	NR	100/+	-
452-WJR	25/08/94	18/M/Homo	+	NR	-/-	400
453-ANS	25/08/94	64/M/Hetero	+	NR	-/-	1.600
461-ACA	25/08/94	35/M/Homo	+	NR	-/-	25.600
468-CLS	30/08/94	28/M/Desc	-	NR	-/-	3.200
470-LGF	31/08/94	41/M/Homo	+	NR	100/+	-
479-PSS	01/09/94	43/M/Hetero	+	NR	-/-	6.400
487-SC	01/09/94	47/M/Homo	+	NR	-/-	200
496-EHA	02/09/94	30/M/IVDA	+	NR	-/-	800
508-JTS	06/09/94	37/M/Desc	+	NR	-/-	1.600
510-LGRC	09/09/94	26/M/IVDA	+	NR	-/-	100
515-MVS	09/09/94	63/M/Homo	-	NR	-/-	3.200
529-ABL	13/09/94	34/M/Desc	+	NR	-/-	1.600
530-MCS	13/09/94	29/F/Hetero	-	NR	-/-	100
538-OFSF	14/08/94	52/M/Hetero	+	NR	-/-	25.600
545-HP	14/09/94	30/M/Hetero	-	NR	-/-	400
546-WTF	14/09/94	31/M/Hetero	-	NR	-/-	100
547-MCF	14/09/94	34/F/Hetero	-	NR	-/-	100
549-WS	14/09/94	34/M/Homo	-	NR	100/+	-
551-EB	15/09/94	45/M/Hetero	+	NR	-/-	100

Idade em anos; Grupo de risco para adquirir a infecção HIV: homo e/ou bissexual, heterossexual, usuário de drogas endovenosas, Desconhecido Casos em negrito desenvolveram KS durante estudo longitudinal de 5 anos. * Resultados expressos segundo descrição em Material e Métodos ; NR não realizado; - negativo; + positivo

Soros reagentes na IFI-Ramos, absorvidos com células HEp 2 e excluídos do cálculo de prevalência.

■ Soros que resultaram IFI-LANA negativa após absorção com células HEp 2

Tabela 2A. Distribuição de resultados obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi, de acordo com a categoria de risco e sexo

Grupo de Risco (HIV +)		n de amostras testadas	IFI-LANA*	WB-LANA*	IFI-LÍTICO*
Risco	Sexo		N (%)	N (%)	N (%)
Homo/Bis	Masc	119	18	19	38
	Fem	1	-	-	-
Subtotal		120	18 (15%)	19 (15,8%)	38 (31,6%)
Hetero	Masc	103	1	-	18
	Fem	122	3	2	12
Subtotal		225	4 (1,8%)	2 (0,9%)	30 (13,3%)
UDEV	Masc	53	-	-	5
	Fem	22	-	-	1
Subtotal		75	-	-	6 (8,0%)
Desc	Masc	37	1	1	7
	Fem	14	-	-	-
Subtotal		51	1 (2,0%)	1 (2,0%)	7 (13,7%)
T. Sangue	Masc	2	-	-	-
	Fem	4	-	-	-
Subtotal		6	-	-	-
TOTAL		477	23 (4,8%)	22 (4,6%)	81 (17,0%)

* Critérios de positividade descritos em Material e Métodos

Tabela 2B. Resultados obtidos nos ensaios de WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em pacientes com HIV/AIDS, sem SK

IFI-Lítico \ WB-LANA	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	11	22
Negativo	70	3	73
Total	81	14	95

Tabela 3. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade na IFI-LANA para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi

Variável	N	% de positividade	Odds ratio	Intervalo de Confiança	Valor de p (Yates)
Sexo					
Masculino	314	6,37	3,63	1,00-15,58	0,049*
Feminino	163	1,84			
Idade					
≤ 35 anos	330	4,24	0,68	0,27-1,75	0,5
> 35 anos	147	6,12			
Risco					
Homo/Bis	120	15,00	12,42	4,21-39,27	<0,000001*
Outro	357	1,40			

* Associação estatisticamente significativa

Tabela 4. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade na IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi

Variável	N	% de positividade	Odds ratio	Intervalo de Confiança	Valor de p (Yates)
Sexo					
Masculino	314	21,66	3,19	1,65-6,29	0,0003*
Feminino	163	7,98			
Idade					
≤ 35 anos	330	15,76	0,76	0,45-1,30	0,350
> 35 anos	147	19,73			
Risco					
Homo/Bis	120	31,67	3,38	1,99-5,75	0,000015*
Outro	357	12,04			

* Associação estatisticamente significativa

Quadro 4. Resultados positivos individuais obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 683 amostras de soro de pacientes com deficiência mental e/ou física do CENLICAL (N=11).

Código do Paciente	Idade/Sexo/Cor	Tempo Internação	Local Internação	IFI-LANA WB-LANA*	IFI-LÍTICO*
30/2213P	34/M/P	27	1	-	200
35/3230P	24/F/N	10	2	1.600/+	-
117/2786P	26/M/B	17	1	800/+	-
213/3266P	18/M/B	08	1	-	200
329/3279P	17/M/B	06	3	-	200
507/1804P	33/M/B	29	1	-	400
531/158P	51/M/B	38	3	-	200
536/1923P	34/F/P	28	4	-	200
561/3026P	18/M/N	14	1	-	200
624/2747P	25/M/B	17	3	200/+	-
836/3036P	25/F/B	14	4	50/+	-

Idade em anos; Cor: B (branco), N (negro), P (pardo); Tempo de internação em anos; Local de Internação: Pavilhão 1, 2, 3 e 4.

* Resultados expressos segundo descrição em Material e Métodos

Quadro 5. Resultados positivos individuais obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 736 amostras de soro de funcionários da CENLICAL (n=17).

Código do Funcionário	Idade/Sexo/Cor	Tempo Trabalho	IFI-LANA WB-LANA*	IFI-LÍTICO*
256/10023F	30/F/P	05	100/+	800
753/1110F	53/F/B	26	800/-	-
805/4198F	55/F/N	16	800/-	-
851/12127F	21/F/B	01	50/+	-
853/7289F	48/F/B	03	200/-	-
986/8125F	42/F/B	07	100/+	-
1068/7124F	40/F/P	12	200/+	-
1089/12188F	28/F/B	01	3.200/-	-
1109/10850F	35/F/B	03	800/+	-
1119/3279F	47/F/P	19	1.600/-	-
1146/82F	52/F/B	28	3.200/-	-
1161/2794F	55/F/B	20	1.600/-	-
1169/11094F	37/F/B	03	50/+	-
1177/11792F	36/F/B	01	800/-	-
1226/7123F	36/F/P	08	3.200/-	-
1290/1661F	52/F/B	23	-	800
1308/397F	64/F/B	31	50/+	-

Idade em anos; Cor: B (branco), N (negro), P (pardo); Tempo de trabalho em anos.

* Resultados expressos segundo descrição em Material e Métodos

Soros reagentes na IFI-Ramos, absorvidos com células Hep 2 e que foram excluídos do cálculo de prevalência

Soros testados quanto à presença de anticorpos heterófilos associados a EBV pelas reações de Paul-Bunnell-Davidson e hemolisina com hemácias de boi

Tabela 5. Frequência de resultados positivos obtidos com os ensaios de IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em amostras de soro de 683 pacientes e 736 funcionários da CENLICAL

Grupo do CENLICAL	N. de amostras testadas	IFI-LANA* N (%)	WB-LANA* N (%)	IFI-LÍTICO* N (%)
Pacientes	683	4 (0,59%)	4 (0,59%)	7 (1,02%)
Funcionários	736	16 (2,2%)	7 (0,95%)	2 (0,3%)

* Critérios de positividade descritos em Material e Métodos

Tabela 6. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade no WB-LANA para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi.

Variável	N	% de positividade	Odds ratio	Intervalo de Confiança	Valor de p (Yates)
Sexo					
Masculino	314	6,37	5,48	1,22-34,34	0,021*
Feminino	163	1,23			
Idade					
≤ 35 anos	330	3,94	0,63	0,24-1,64	0,471
> 35 anos	147	6,12			
Risco					
Homo/Bis	120	15,83	22,20	0,06-96,29	<0,0001*
Outro	357	0,84			

* Associação estatisticamente significativa

Tabela 7. Análise univariada para associação de dados epidemiológicos com positividade em pelo menos um dos testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de indivíduos com HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi.

Variável	N	% de positividade	Odds ratio	Intervalo de Confiança	Valor de p (Yates)
Sexo					
Masculino	314	24,84	3,52	1,86-6,76	0,00003*
Feminino	163	8,59			
Idade					
≤ 35 anos	330	17,58	4,72	0,43-1,17	1,97
> 35 anos	147	23,13			
Risco					
Homo/Bis	120	40,00	4,72	2,85-7,91	<0,000001*
Outro	357	12,32			

* Associação estatisticamente significativa

Figura 1. Amostras representativas do perfil de bandas obtido no WB-LANA de casos positivos e negativos, usando soros de pacientes com SK (tiras 1-9, 11-13; pt. 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32), de indivíduos HIV/AIDS sem SK (tiras 14-17; pt. 35, 41, 43, 63) e de controles negativos (tiras 10 e 18). Os traços à direita se referem ao marcador de PM: proteínas de 221, 133, 93, 67, 56, 42, 28, 23, 17, 11 KDa. A seta à esquerda indica posição dos antígenos LANA de 236-224 KDa.

Figura 2. Amostras representativas do perfil de bandas obtido no WB-Lítico usando soros de casos de SK (tiras 1 e 18-19; pt. 3 e 79, 92), de indivíduos HIV/AIDS sem SK (tiras 2-3, pt. 83, 86) e de pacientes e controles sadios do CENLCAL (tiras 4-17 pt. 624, 753, 805, 836, 851, 853, 883, 1089, 1119, 1146, 1161, 1177, 1226, 1435). Os traços à direita se referem ao marcador de PM: proteínas de 221, 133, 93, 67, 56, 42, 28, 23, 17, 11 KDa e a seta a proteínas de 40 a 90 KDa.

Discussão

O SK é diagnosticado laboratorialmente utilizando técnicas histológicas, onde são pesquisadas células endoteliais fusiformes (“spindle cells”) na lesão (BOSHOFF *et al.*, 1995).

Embora o Brasil não seja considerado país com alta incidência de SK nas suas formas clássica e endêmica, desde 1980 com o início da epidemia de AIDS, o número de casos dessa neoplasia aumentou assustadoramente, tendo como principal alvo os HSH (AZEVEDO *et al.*, 1996, BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A alta incidência de SK em HSH infectados pelo HIV, denominado SK epidêmico ou SK-AIDS, produziu indícios de que um agente infeccioso transmitido sexualmente pudesse estar envolvido na sua etiologia e patogênese (BERAL *et al.*, 1990). Vários estudos foram feitos visando identificar esse microrganismo e em 1994 CHANG *et al.*, utilizando técnicas de biologia molecular, identificaram o HHV-8 em material de biópsia de casos de SK-AIDS. A partir dessa identificação, outros estudos se seguiram e confirmaram a presença desse novo vírus em todos os tipos de SK: clássico do Mediterrâneo, endêmico-africano e iatrogênico pós-transplante (DUPIN *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1995; RADY *et al.*, 1995; SCHULZ & WEISS, 1995; SU *et al.*, 1995; ALUIGI *et al.*, 1996; KEDDA *et al.*, 1996; HUDNALL *et al.*, 1998).

O HHV-8 também foi identificado como o agente etiológico de um tipo raro de linfoma com efusão em cavidades (BCBL ou PEL, com efusão no pericárdio, pleura e peritônio) (CESARMAN *et al.*, 1995) e as linhagens celulares dele derivadas passaram a ser cultivadas e utilizadas como antígenos para o preparo de lâminas para IFI e de tiras para o RIPA ou WB (GAO *et al.*, 1996b; KEDES *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 1996).

As primeiras linhagens estabelecidas de doentes com BCBL eram infectadas pelo EBV e HHV-8 (BC-1, BC-2, HBL-6), tornando-se necessária a absorção prévia do soro para evitar reatividade cruzada entre anticorpos para os dois gamaherpesvírus.

Posteriormente, foram identificadas novas linhagens infectadas somente pelo HHV-8 (BCBL-1, KS-1, BC-3, BCP-1 e TY-1) e, assim, preparações antigênicas brutas passaram a ser utilizadas nos testes sorológicos. Esses testes foram empregados em estudos de soroprevalência em regiões com alta incidência de SK e na identificação de pessoas sob risco de desenvolverem o SK.

Com a introdução da sorologia HHV-8 para pesquisa de anticorpos específicos, alguns estudos foram conduzidos no Brasil em diferentes populações sob risco epidemiológico para adquirir esta infecção. Foi comprovada a associação entre infecção HHV-8 e grupo de risco sexual (ZHANG *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1998; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1999; PIERROTTI *et al.*, 2000; KELLER *et al.*, 2001). No entanto, todos estes estudos foram realizados com pequeno número de indivíduos, o que prejudica a interpretação dos resultados.

Com o objetivo de ampliar esses estudos e verificar a prevalência de anticorpos dirigidos ao HHV-8 e seu valor prognóstico no desenvolvimento do SK ou PEL em população infectada pelo HIV/AIDS de São Paulo, foi realizado no início deste trabalho, um estudo soro-epidemiológico utilizando o conjunto de reagentes HHV-8 IgG Antibody ELISA da Advanced Biotechnologies Incorporated (ABI) - Maryland – USA, (ELISA-ABI), que detecta anticorpos dirigidos à maioria dos componentes estruturais do HHV-8.

Quatrocentas e noventa e três amostras de soro foram avaliadas e a prevalência desta infecção estimada em 17,2% (**Quadro 3A, ANEXO I**). Analisando os resultados obtidos segundo a categoria de risco para adquirir viroses, foi observada maior positividade nos HSH (34,1% dos casos), seguida por

homens com fator de risco desconhecido (28,6%) e homens homossexuais (15,8%) (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2000a, **ANEXO J**).

Em estudo longitudinal de 5 anos buscando doença relacionada ao HHV-8 nos prontuários desses pacientes, foram detectados 10 casos de SK e um caso de provável PEL (**Quadro 3A, ANEXO I e Quadro 3B**, casos em negrito). Houve redução no número de casos de SK-AIDS no Hospital onde foram colhidas estas amostras de soro que passou de 20% no início da epidemia AIDS (década de 80) para 2% no presente estudo (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2000a, **ANEXO J**).

Dados semelhantes foram divulgados pelo Ministério da Saúde, que em seu Boletim Epidemiológico de AIDS de novembro de 2000, notificou uma redução no número de casos de SK-AIDS que passou de 17,8% (dados de 1980-1984) a 13,1% (1985-1987) e finalmente a 4,2% (dados de 1988-2000) (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Possivelmente a redução na incidência do SK no Brasil tenha sido consequência da introdução de terapia anti-retroviral no país; no início (1994), com inibidores da transcriptase reversa e a partir de 1996, com inibidores de proteases. Esses medicamentos conhecidos como “coquetel” inibem a replicação do HIV e consequentemente preservam o sistema imunológico (REZZA *et al.*, 2000; LEÃO *et al.*, 2000). Além disto, não pode ser descartada como causa da redução do número de casos, a maior conscientização das categoria tidas como de risco para adquirir o HIV (HSH, por exemplo) que passaram a adotar medidas de prevenção mais eficientes, para evitar a transmissão e aquisição de novos agentes infecciosos.

Vale salientar no entanto, que o HHV-8 continua circulando na população infectada pelo HIV/AIDS de São Paulo (confirmado pelo percentual de soros positivos para o HHV-8), porém a redução do número de casos de SK faz levantar a hipótese da necessidade de co-fatores para o desencadeamento de doença.

Vários fatores podem estar relacionados à progressão para o SK ou PEL em indivíduos infectados pelo HHV-8. São eles: • fatores ambientais, econômicos e

sociais como região geográfica, solo, pobreza, promiscuidade; • genéticos relacionados à origem étnica; • do parasita (subtipo e carga viral), e • do hospedeiro (integridade física, imunológica, gênero, presença de outras patologias), além do uso de drogas imunossupressoras e corticosteróides (ZIEGLER, 1993; LUNARDI-ISKANDAR *et al.*, 1995; KEDDA *et al.*, 1996; JAFFE & FRANKEL, 1997; COOK-MOZAFFARI *et al.*, 1998; ANDREONI *et al.*, 1999; ENBOM *et al.*, 1999; SITAS *et al.*, 1999; PLANCOULAIN *et al.*, 2000; AMIR *et al.*, 2001).

Populações de ameríndios brasileiros e da Australásia e populações africanas que vivem em determinadas regiões geográficas, como em Ghana, são exemplos de populações endêmicas de infecção HHV-8 onde não foram registrados casos de SK (BIGGAR *et al.*, 2000; REZZA *et al.*, 2001), ou com pequeno número de casos em relação a outras regiões endêmicas (ABLASHI *et al.*, 1999). Estes achados corroboram a necessidade de co-fatores para o desencadeamento de doença associada ao HHV-8.

O “kit” de reagentes ELISA-ABI utilizado no presente trabalho também foi empregado em outros estudos de prevalência de infecção HHV-8 e de comparação de técnicas sorodiagnósticas (CHATLYNNE *et al.*, 1998; MANNS *et al.*, 1998; RABKIN *et al.*, 1998; ABLASHI *et al.*, 1999; CATTANI *et al.*, 2000; ENGELS *et al.*, 2000 e SPIRA *et al.*, 2000). As vantagens deste “kit” em relação aos outros ensaios sorológicos diz respeito a facilidade na sua execução aliada à possibilidade de análise de grande número de amostras em curto período de tempo. Uma vez estabelecido o limiar de positividade da reação (“cut off”), a interpretação dos resultados torna-se objetiva, fácil e rápida. No entanto, o que torna seu uso inviável para estudos epidemiológicos é o seu alto custo.

CHATLYNNE & ABLASHI, 2000; ENGELS *et al.*, 2000 e SPIRA *et al.*, 2000 mostraram que certos ensaios imunoenzimáticos sozinhos não foram suficientemente sensíveis para detectar infecção em amostras de soro obtidas da

população geral e de banco de sangue, que apresentavam baixos títulos de anticorpos específicos. Os autores sugeriram que o ideal seria utilizar várias técnicas sorológicas, com princípios diferentes e que reconhecessem antígenos de diversas fases da infecção viral.

Com o objetivo de estabelecer um primeiro contacto com células infectadas pelo HHV-8 no ensaio de IFI, para depois implantá-lo na Seção de Imunologia do IAL, foram adquiridos “kits” comerciais designados IFI-ABI [IgG Antibody IFA da Advanced Biotechnologies Incorporated (ABI) - Maryland – USA] para serem utilizados na detecção de anticorpos em amostras de soro de indivíduos infectados pelo HIV/AIDS, sem SK.

Foram testados 340 soros que resultaram em 61% de positividade (**Quadro 3A, ANEXO I e Quadro 3B**). Esse resultado parece ter sido superestimado, uma vez que os soros positivos não puderam ser re-testados, diluídos ou sequer analisados em duplicata (devido ao alto custo dos “kits” – US\$ 800 cada 10 lâminas para 8 determinações, devendo incluir um controle positivo e dois controles negativos: soro e tampão da amostra). Outros fatores como a subjetividade da leitura e as possíveis reações cruzadas (reações inespecíficas de anticorpos e/ou contaminação por soros altamente reagentes), aliadas à inexperiência na leitura podem ter contribuído para a obtenção de resultados falso-positivos, principalmente os considerados 1+.

Quando comparados os vários resultados obtidos com a mesma amostra de soro testada por diferentes ensaios sorológicos (ELISA-ABI, IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA, IFI-Lítico) foi verificado que muitas delas apresentavam somente reatividade para IFI-ABI, corroborando a hipótese de reação falso-positiva. Oitenta e cinco amostras de soro mostraram reatividade somente na IFI-ABI, sendo esta de baixa intensidade (1+); 38 amostras mostraram reatividade fraca de 2+ e 13 amostras reatividade intermediária (3+) (**Quadro 3A, ANEXO I**). Se forem excluídos do resultado global desta pesquisa todos os soros considerados IFI-ABI 1+ e 2+ (não confirmados por outro teste sorológico), a percentagem de soros

positivos para o HHV-8 cai para 25% (valor mais próximo aos 17,2% detectados pelo ELISA-ABI).

Embora a IFI-ABI pareça ter sido mais sensível do que o ELISA-ABI, deve-se considerar que para o ELISA-ABI foi adotado um critério de alta estringência, ou seja, foram considerados soros positivos apenas aqueles que demonstraram uma relação entre a D.O da amostra/"cut off" da reação maior ou igual a 3,5 (conforme descrição em Casuística e Métodos).

Ainda, não pode ser descartada na IFI-ABI, a reação falso-positiva devido à infecção por outros vírus como apontado por GREENSILL *et al.*, 1998 apud CHATLYNNE & ABLASHI, 1999. Estes pesquisadores observaram reatividade cruzada de anticorpos presentes no soro de macacos verdes africanos infectados por Rhadinovirus com antígenos de fase lítica da infecção HHV-8. Isto foi observado tanto no ensaio de IFI como no ELISA ORF 65. No entanto, se este fosse o caso, a mesma reatividade cruzada deveria ter ocorrido no presente estudo com o ELISA-ABI.

Pode-se ainda especular que diferenças de sensibilidade entre os dois "kits", que utilizam as mesmas células como fonte de antígeno, seja devido à conformação das moléculas nos dois ensaios: na IFI-ABI o antígeno é apresentado na sua forma terciária, enquanto no ELISA-ABI, na forma primária de configuração.

Apesar dos resultados intrigantes obtidos, os "kits" comerciais da ABI serviram para estimar a prevalência de anticorpos HHV-8 na população infectada pelo HIV/AIDS de São Paulo e descartar seu valor prognóstico no desenvolvimento de SK em população tratada com anti-retroviral (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2000a). Esta experiência foi útil para uma reflexão crítica de métodos e para treinamento quanto a leitura e interpretação dos resultados.

Posteriormente teve início o processo de padronização dos ensaios "in house", primeiramente de IFI-LANA e IFI-Lítico que seguiram o protocolo descrito

por EDELMAN *et al.*, 2000, com algumas adaptações para as condições do Laboratório (ver Casuística e Métodos, CARBONE *et al.*, 2001).

Uma vez escolhidas as condições de realização destes ensaios, 44 amostras de soro de pacientes com SK foram testadas para estimar a taxa de sensibilidade dos testes. Foram detectados 33 e 40 soros reagentes nos ensaios de IFI-LANA e IFI-Lítico, o que representa valores de sensibilidade dos ensaios de 75% e 90,9%, respectivamente. Com o grupo controle negativo (21 soros de pessoas sadias do Laboratório) foi detectada especificidade de 95,24% para a IFI-LANA e 100% para a IFI-Lítico (**Quadro 2**).

A baixa sensibilidade da IFI-LANA pode estar relacionada com a fase da infecção/doença HHV-8. Provavelmente na fase de SK, são produzidas pequenas quantidades de antígenos LANA e isto pode dificultar a identificação dos anticorpos correspondentes. Outra possibilidade é a falta de resposta de anticorpos devido à imunodepressão característica da infecção HIV/AIDS, neste grupo de pacientes. É importante observar que nessa casuística, 2 amostras de soro de pacientes com SK, porém não infectados pelo HIV, resultarem IFI-LANA e IFI-Lítico positivos (**Quadro 1, pts. 15 e 20**).

Tomando como base os resultados obtidos com os dois ensaios, a sensibilidade aumentou para 93,2%, o que significa que ambos os testes devem ser usados na triagem sorológica de infecção HHV-8.

GAO *et al.*, 1996a, em um estudo longitudinal de soroconversão HHV-8 e usando a pesquisa de anticorpos anti-LANA, verificaram que cerca de 20% dos pacientes infectados pelo HIV não produziam esses anticorpos. Isto foi atribuído à depressão da imunidade humoral com o avanço da AIDS. Estes pacientes desenvolveram mais rapidamente o SK quando comparados aos pacientes com anti-LANA positivos.

Corroborando o fato que a imunodepressão presente nos casos de AIDS pode ser a responsável pelos resultados falso-negativos obtidos no ensaio de IFI-LANA, vários trabalhos têm mostrado a baixa sensibilidade desta técnica em detectar SK-AIDS. LENNETTE *et al.*, 1996 usando células BCBL-1 detectaram 52% de casos positivos, enquanto SIMPSON *et al.*, em 1996 empregando células BCP-1 encontraram valores de positividade de 82%. Percentuais mais altos de reatividade no ensaio de IFI-LANA foram encontrados por ZHU *et al.*, 1999 (82% usando células BCP-1) e PERNA *et al.*, 2000 (84% utilizando células BCBL-1). Estes resultados aparentemente discordantes podem estar relacionados ao grau de envolvimento do sistema imunológico do paciente (fase terminal ou não da infecção HIV), fase lítica ou latente de replicação do HHV-8, ou ambos.

Em consonância com esta hipótese, amostras de soro obtidas de pacientes com SK clássico, mostraram sensibilidade maior quando testadas pelo ensaio de IFI-LANA, com valores de até 100% de sororreatividade (GAO *et al.*, 1996b; MARCELIN *et al.*, 1998; PERNA *et al.*, 2000). (Vide **Quadro, ANEXO A**). Uma explicação plausível é que nesses pacientes a imunodepressão decorrente do envelhecimento compromete menos o sistema imunológico do que a infecção HIV.

Quanto ao ensaio IFI-Lítico, este se mostrou mais sensível para detectar casos de SK do que a IFI-LANA (**Quadro 1, Tabelas 1A e B**). O mesmo foi observado por outros pesquisadores que passaram a utilizá-lo inclusive como método único de triagem de soros para estudos de prevalência de infecção HHV-8 (HE *et al.*, 1998; REZZA *et al.*, 1998; SOSA *et al.*, 1998; ANDREONI *et al.*, 1999; BLACKBOURN *et al.*, 1999; PIERROTTI, 2000; REZZA *et al.*, 2000; SPIRA *et al.*, 2000; GREENBLATT *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2001; PARISI *et al.*, 2002).

Devido aos possíveis resultados falso-positivos obtidos nos testes sorológicos de triagem para a pesquisa de anticorpos específicos, foi decidido no presente trabalho implantar os testes confirmatórios de WB.

No início, pouco se sabia a respeito do perfil de bandas obtido no WB HHV-8 e os primeiros trabalhos foram conduzidos para caracterizar preparações antigênicas (GAO *et al.*, 1996a e MILLER *et al.*, 1996) e, posteriormente, para identificar genes relacionados a componentes imunogênicos do HHV-8. Foram utilizadas técnicas de transfecção de segmentos do genoma HHV-8 em células não infectadas, inserção de genes em plasmídio para clonagem e expressão gênica, produção de anticorpos monoclonais e, finalmente, visibilização e comparação dos produtos por IFI e WB (LENNETTE *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1997; O'NEIL *et al.*, 1997; RAINBOW *et al.*, 1997; DAVIS *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997; RAAB *et al.*, 1998).

O antígeno LANA codificado pelo gene ORF 73 é o responsável pela fluorescência nuclear pontilhada no ensaio IFI-LANA e esse mesmo antígeno aparece de tamanho diferente na análise pelo IB: linhagens BC-1 mostram proteínas de 234 e 226 KDa e de BCP-1 proteínas de 230 e 220 KDa (RAINBOW *et al.*, 1997). Esta variabilidade no tamanho da proteína pode comprometer os resultados obtidos no ensaio de IFI dependendo da linhagem celular que se utiliza e pode ser a responsável, em parte, pelos resultados discordantes obtidos na IFI-LANA, por vários pesquisadores.

GAO *et al.*, 1999 e ZHANG *et al.*, 2000 estudaram o gene ORF 73 de vários isolados de HHV-8 obtidos de linhagens estabelecidas e cepas selvagens isoladas de pacientes. Os autores verificaram diferenças de tamanho na região central deste gene, que podem estar relacionadas com diferentes padrões de reatividade nos ensaios sorológicos.

O WB-LANA, padronizado conforme descrito em Casuística e Métodos, confirmou três amostras falso-positivas na IFI-LANA que não se relacionaram com a presença de anticorpos dirigidos a antígenos de outros vírus do grupo herpes (**Quadros 1 e 2**, casos em destaque). A amostra 32 permaneceu falso-positiva mesmo após a absorção do soro com células HEp2.

Alguns trabalhos foram realizados para descartar resultados falso-positivos na IFI-LANA usando apenas núcleos de células BCBL-1 latentemente infectadas (KEDES *et al.*, 1996; KEDES *et al.*, 1997; REZZA *et al.*, 2000) ou de células HBL-6 (ZHANG *et al.*, 1998), mas nenhum deles compara os resultados do uso de células totais e apenas núcleos.

BESTETTI *et al.*, em 1998 para evitar reações falso-positivas na detecção de anticorpos dirigidos a antígenos LANA em casuística de país de clima tropical, utilizaram o ensaio de imunoperoxidase e soros diluídos a partir de 1:2.500.

Uma observação interessante que surgiu do levantamento bibliográfico deste estudo diz respeito à utilização preferencial de determinada linhagem celular, quando se deseja pesquisar anticorpos dirigidos a antígenos LANA e outra para antígenos líticos. A linhagem **BGP-1** foi utilizada na IFI-LANA por OLSEN *et al.*, 1998; MARCELIN *et al.*, 1998; SITAS *et al.*, 1999; BIGGAR *et al.*, 2000 e WHITBY *et al.*, 2000. Já a linhagem **BCBL-1** foi empregada no ensaio de IFI-Lítico por HE *et al.*, 1998; REZZA *et al.*, 1998; SOSA *et al.*, 1998 e REZZA *et al.*, 2000.

PARASI *et al.*, 2002, foram os únicos a ressaltarem maior sensibilidade e especificidade destas linhagens para os ensaios correspondentes.

No presente trabalho não foi possível utilizar as duas linhagens celulares, mas com a linhagem BCBL-1 foi confirmada maior sensibilidade e especificidade da IFI-Lítico em relação a IFI-LANA (**Quadro 1, Tabelas 1A e B e Quadro 2**), ressaltando que a IFI-LANA com células BCBL-1, necessita de teste confirmatório de WB-LANA.

Por outro lado, não foi possível estabelecer o ensaio de WB-Lítico como confirmatório da IFI-Lítico (**Figura 2**), isto porque durante a fase de replicação viral, existem várias etapas e, conseqüentemente, vários antígenos sendo produzidos. Atualmente estes antígenos são conhecidos como de fase precoce e

tardia de replicação viral (KATANO *et al.*, 2000; PARRAVICINI *et al.*, 2000). Até o momento não foi possível determinar com precisão quais anticorpos são produzidos com o tempo e em que intensidade, dificultando assim a utilização do ensaio de WB com finalidade diagnóstica.

CHANDRAN *et al.*, 1998b, usando linhagem BCBL-1 no ensaio RIPA e analisando reatividade de soros humanos de pacientes em diferentes fases de infecção/doença SK, identificaram vários perfis sorológicos de reatividade de anticorpos frente a antígenos e tentaram relacionar estes perfis com estadiamento da infecção HHV-8, infecção ativa ou passada. Utilizando células BCBL-1 estimuladas pelo TPA e soros de pacientes SK-AIDS, identificaram pelo menos 15 polipeptídeos (155, 145, 125, 116, 105, 90, 74, 60, 55, 50, 45, 41, 38, 34 e 29 KDa), ao passo que usando os mesmos soros com células BCBL-1 não estimuladas foram capazes de detectar 9 polipeptídeos (225, 145, 125, 116, 105, 74, 70, 55 e 29 KDa). Algumas proteínas foram identificadas por soros de indivíduos infectados pelo HIV sem SK (110, 80, 60-55, e 50 KDa). Concluíram que reatividade do soro com antígenos de 110 e 50 KDa, mas não com de 55, 38 e 34 KDa pode ser indicativo de infecção passada e reatividade com todas as glicoproteínas indica infecção recente ou processo de reativação viral.

Em 1998, CHANDRAN *et al.* produziram proteínas recombinantes a partir de segmentos das ORFs 73, 65 e K8.1 e as utilizaram como antígeno no IB. Foram identificados anticorpos dirigidos aos componentes de 185, 52-54 e 48-54 KDa, respectivamente. Mais uma vez foi detectada diversidade de tamanho do produto da ORF 73, e isto pode estar relacionado a produtos de proteólise gerados antes ou durante o processo de purificação das proteínas (ZHU *et al.*, 1999).

Não há maior número de estudos sobre o perfil de reatividade de anticorpos durante as diferentes fases de infecção/doença HHV-8. Isto se deve principalmente ao fato de não existirem bons painéis de soros, capazes de cobrirem todas as etapas de replicação viral, e todos os graus de imunodeficiência

em que pode se encontrar o indivíduo infectado. Assim, fica difícil reproduzir ou mesmo confirmar os resultados obtidos por CHANDRAN *et al*, 1998b. No entanto, um fato fica evidente, não é possível utilizar o WB-Lítico como teste confirmatório da reatividade obtida na IFI-Lítico.

Uma vez padronizados os ensaios “in house” IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico, estes foram empregados no estudo de prevalência de infecção HHV-8 em 3 grupos de indivíduos de São Paulo, representando pessoas com grau variável de risco para adquirir doenças infecciosas.

No grupo considerado de alto risco (pacientes infectados pelo HIV/AIDS, sem SK) foi detectada a prevalência de 19,3% de infecção HHV-8. Mais uma vez, o ensaio IFI-Lítico foi mais sensível em detectar infecção HHV-8 (17%) do que a IFI-LANA (4,8%). Dois soros apresentaram IFI-LANA falso-positiva (**Quadro 3A, ANEXO I e Quadro 3B**, casos em evidência) e um soro IFI-LANA falso-negativa (**Quadros 3A e 3B**, pt. 373). As explicações encontradas para os resultados discordantes são aquelas comentadas anteriormente, ressaltando que no caso do paciente 373 pode ter ocorrido infecção por variante HHV-8 diferente da que infectou as células BCBL-1, com um produto da ORF 73 (antígeno LANA) de tamanho e forma diferentes, cujo anticorpo correspondente reage apenas com estruturas primárias das proteínas, não reconhecendo estruturas terciárias.

Neste grupo de pacientes foi confirmada a associação estatisticamente significativa entre sorologia HHV-8 positiva, sexo masculino e categoria de risco homossexual, independente do teste sorológico utilizado (**Tabelas 2-4, 6-7**). Estes resultados estão de acordo com os anteriormente relatados por pesquisadores do Brasil e do exterior (ver **Quadro no ANEXO A**) e na Seção de Imunologia do IAL em projeto piloto com casuística de São Paulo (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1999).

Um fato curioso que emergiu do presente trabalho foi a confirmação de casos de infecção HHV-8 em mulheres, embora estas não pareçam constituir um

grupo de alta incidência de SK-AIDS. Analisando a modalidade de risco a que elas pertenciam, foi constatado serem da categoria heterossexual (**Tabela 2A**).

Embora alguns trabalhos realizados com mulheres no exterior tenham associado infecção HHV-8 com doenças sexualmente transmissíveis, infecção HIV e promiscuidade (todos ligados à transmissão sexual), outros sugeriram a transmissão HHV-8 pela via sanguínea (associação com uso de drogas endovenosas, HCV e HIV).

De fato, um estudo recentemente conduzido na Seção de Imunologia do IAL com mulheres infectadas pelo HIV de diferentes categorias de risco, mostrou infecção HHV-8 tanto nas mulheres que adquiriram o HIV preferencialmente por via sexual, assim como naquelas que o adquiriram por via sanguínea (uso de drogas endovenosas). Nas últimas, não pôde ser excluída a possibilidade de aquisição do HIV e do HHV-8 por via sexual, já que muitas delas se prostituíram para adquirir drogas ilícitas. De algum modo, foi evidente a detecção de prevalências semelhantes de anticorpos nas duas populações estudadas que foram em torno dos 8% (CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 2002c, submetido).

CANNON *et al.*, 2001, usando a pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica da infecção HHV-8 em uma coorte de mulheres norte-americanas infectadas pelo HIV, detectaram 16,1% de casos positivos, mostrando associação com o uso de drogas endovenosas, sífilis, HIV e HCV. Nos indivíduos HHV-8 soropositivos, mas que não referiram uso de drogas endovenosas, houve associação com prostituição e história de sífilis.

WHITBY *et al.*, 1999, em estudo conduzido com mulheres de uma clínica de DST/AIDS de Londres verificaram soropositividade para o HHV-8, que variou de 9,1% a 25,7% dependendo de dados epidemiológicos: valores mais elevados foram detectados em mulheres de origem africana e em mulheres infectadas pelo

HIV. Os autores apontaram para o local de origem do paciente e a infecção HIV como fatores importantes para resultar sorologia positiva para o HHV-8.

Ao contrário do que ocorre nas regiões onde o SK é epidêmico e a via sexual de transmissão é a mais importante, nas regiões de SK endêmico ou clássico outras vias de transmissão foram descritas como responsáveis pela disseminação do HHV-8. Mulheres e crianças foram apontadas como os principais veículos de transmissão horizontal, no convívio familiar, provavelmente através da saliva ou de outros fluidos biológicos. Os estudos conduzidos com mulheres de região endêmica ressaltam as altas taxas de infecção HHV-8 neste gênero, e a transmissão preferencial do HHV-8 de mãe para filho e entre irmãos (ANGELONI *et al.*, 1998; BOURBOULIA *et al.*, 1998; HE *et al.*, 1998; GESSAIN *et al.*, 1999; LYALL *et al.*, 1999).

VITALE *et al.*, 2000, confirmaram taxas semelhantes de soropositividade para HHV-8 em mulheres de região endêmica sem risco de transmissão sexual (freiras de um convento da região de Palermo) e população geral de idade pareada. Os percentuais de soros positivos encontrados foram de 27% e 25%, respectivamente.

Em regiões endêmicas de infecção HHV-8, este vírus é detectado em crianças de pouca idade. Os estudos sorológicos mostraram que a detecção de anticorpos se inicia logo após o nascimento (anticorpos maternos), depois eles desaparecem e tornam a aparecer nos primeiros 5 anos de vida da criança. Atingem um “plateau” na adolescência e depois tornam a subir durante a vida adulta (fase de maior atividade sexual). Em todos os estudos foi apontada a via de transmissão horizontal e não a vertical como a responsável pela contaminação das crianças (OLSEN *et al.*, 1998; ANDREONI *et al.*, 1999; GESSAIN *et al.*, 1999; BIGGAR *et al.*, 2000; PLANCOULAIN *et al.*, 2000; REZZA *et al.*, 2000; WHITBY *et al.*, 2000).

CATERINO-DE-ARAUJO & CIBELLA, 2002, realizaram o primeiro estudo no Brasil de transmissão vertical de anticorpos dirigidos ao HHV-8, em crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV/AIDS de São Paulo. Os autores mostraram que o HHV-8 estava presente em mulheres cuja categoria de risco para adquirir o HIV era o uso de drogas endovenosas e que estas não desenvolveram SK, provavelmente devido à proteção conferida pelos hormônios femininos produzidos durante o período de gestação.

Curiosamente, além das mulheres infectadas pelo HHV-8 não desenvolverem SK provavelmente pela ação protetora conferida pelos hormônios femininos durante as várias etapas do ciclo menstrual e na gestação (LUNARDI-ISKANDAR *et al.*, 1995), outras populações foram descritas como portadoras assintomáticas desta infecção. Trata-se de populações de ameríndios da Amazônia, onde foram detectadas altas prevalências de infecção HHV-8 e nas quais nenhum caso de doença relacionada ao HHV-8 foi encontrado. Fatores ambientais e/ou genéticos podem estar contribuindo para isto, no entanto, é importante que se preservem estas populações do convívio com o homem branco para se evitar a transmissão do HIV e de outros patógenos, que poderão servir de co-fatores para o desencadeamento de SK (BIGGAR *et al.*, 2000).

Uma observação curiosa e que merece reflexão feita por ZIEGLER *et al.* em 1993, diz respeito à maior incidência de SK em regiões de solo vulcânico (países do mediterrâneo e algumas regiões da África equatorial). Estes pesquisadores tentaram mostrar associação de trabalho no campo (contato dos homens de pés descalços com solo ferroso) e maior incidência de lesão SK em membros, principalmente os inferiores. Seria, neste caso, o SK uma doença ocupacional?

Outro estudo conduzido na África do Sul com doadores de sangue, mostrou maior prevalência de infecção HHV-8 na população negra (20%) do que na população branca (5%) (SITAS *et al.*, 1999). Este achado estaria relacionado a

fatores genéticos ou a diferenças sócio-econômicas existentes entre as duas raças?

MAYAMA *et al.*, 1998, mostraram associação entre soropositividade HHV-8 e hepatite B em Uganda. Estaria a infecção HHV-8 associada à promiscuidade, precariedade de condições de saúde e de saneamento básico?

Outros aspectos extremamente interessantes relacionados a variáveis geográficas foram abordados por COOK-MOZAFFARI *et al.*, 1998. Estes pesquisadores encontraram associação entre regiões com maior número de casos de SK e linfomas na África, nas regiões com altitude acima de 2000 pés, alta umidade do ar, solo ferroso e maior densidade demográfica. Observaram que a disseminação do HHV-8 seguiu as rotas de migração para as minas de cobre e ouro, além da peregrinação para a Meca. As relações de negócios entre o oeste da África e o sul da Europa podem ter favorecido a disseminação do SK da África para os países do mediterrâneo.

Portanto, dependendo da população em estudo, vários fatores podem contribuir para a transmissão e disseminação do HHV-8 e o desenvolvimento de doença a ele associada.

Retornando ao estudo dos três grupos com diferentes graus de risco para adquirir o HHV-8 em São Paulo, foi avaliado no presente trabalho um grupo considerado a princípio como de médio risco em adquirir doenças infecciosas. Trata-se do grupo de pacientes institucionalizados com deficiência mental e/ou física, cujos soros foram analisados primeiramente quanto à presença de anticorpos dirigidos ao HBV, e nos casos soronegativos, foi realizada a vacinação.

Em avaliação prévia dos resultados obtidos foi verificada alta taxa de infecção HBV nos pacientes que deambulavam, ou seja, possíveis portadores e transmissores de doenças infecciosas nesta Instituição. Foi levantada a hipótese

de disseminação deste vírus por mordeduras, arranhões e prática sexual; atitudes estas praticadas por alguns pacientes (KULIK, 1999).

Assim, os soros desta casuística foram avaliados no presente trabalho quanto à presença de anticorpos dirigidos ao HHV-8. Usando os ensaios sorológicos “in house” foram detectados 11 soros HHV-8 positivos (1,6% dos casos), sendo 0,59% pelos ensaios de IFI-LANA e WB-LANA e 1,02% pela IFI-Lítico (**Tabela 5**). Não houve associação entre soros HHV-8 positivos e pavilhão a que pertenciam os pacientes (**Quadro 4**).

Parece que estes resultados refletem mais os obtidos com a população geral do que com a população de risco; porém a presença de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica viral mostram a possibilidade desses pacientes desenvolverem doença relacionada ao HHV-8, principalmente nos indivíduos com síndrome de Down (KULIK, 1999). Felizmente, nenhum caso de SK foi diagnosticado nesta população (informação verbal dada pelo corpo médico da Instituição).

Por fim, para avaliar população de baixo risco em adquirir a infecção HHV-8 em São Paulo, foi analisado o grupo de funcionários do CENLICAL. A proposta era analisar um grupo composto por pessoas sadias de todas as raças e que representasse a população da cidade de São Paulo. No entanto, por ser constituído predominantemente por mulheres (85,6% dos casos), os resultados obtidos podem ter sofrido alguma distorção.

Diferentemente do que ocorreu com o grupo de pacientes, nesta população houve maior número de casos com reatividade de anticorpos para antígenos LANA [16 soros (2,2%)] (**Quadro 5, Tabela 5**). No entanto, houve 9 amostras IFI-LANA positiva que não foram confirmados no WB-LANA (**Quadro 5**, amostras em evidência). Nesses soros, não foi possível retirar reatividade cruzada pela absorção com células HEp2, nem tampouco associar com presença de anticorpos heterófilos.

Novamente, a causa dos resultados falso-positivos no ensaio de IFI-LANA não foi detectada, porém pode-se aventar as mesmas hipóteses anteriormente citadas sobre a ocorrência de doenças auto-imunes, além das múltiplas gestações, que são responsáveis pela produção de uma série de anticorpos.

Usando para a análise final os resultados obtidos no WB-LANA e IFI-Lítico foi detectada a prevalência de 1,1% de infecção HHV-8 na população de funcionários do CENLICAL (população sadia de São Paulo), sendo 0,95% para anticorpos dirigidos ao antígeno LANA e 0,3% ao lítico (**Tabela 5**). Não foram detectados casos de SK nesta população (informação verbal do corpo médico da Instituição).

Tomando como base os resultados obtidos com estes dois grupos de indivíduos fica demonstrado que o HHV-8 circula na cidade de São Paulo, porém não de forma endêmica. Todavia, uma sorologia adequada e eficiente deve ser implantada para auxiliar em casos de necessidade de introdução de terapia imunossupressora ou de transplante de órgão.

Ainda, os resultados globais desta pesquisa enfatizam que populações infectadas pelo HIV continuam infectadas pelo HHV-8 e nelas a maior concentração de casos se referem à categoria de HSH. Devido à ação das drogas anti-retrovirais, os indivíduos infectados pelo HIV não têm desenvolvido a doença SK. Torna-se importante conscientizar esses indivíduos e as autoridades competentes para que não se interrompa a terapia HIV específica, evitando-se assim o reaparecimento da epidemia SK-AIDS.

Os resultados deste trabalho na sua totalidade foram apresentados em Congresso por CARBONE *et al.*, em 2002.

Concluindo, alguns desafios se impõem para o futuro como:

- ✓ Determinar as causas de reações falso-positivas na IFI-LANA e comparar sensibilidade deste ensaio usando outras linhagens celulares;

- ✓ Montar painel de soros de pacientes em diferentes etapas da infecção/doença HHV-8, úteis para o diagnóstico de infecção aguda, latente ou processo de reativação de infecção latente;
- ✓ Auxiliar a Rede Pública de Saúde na detecção de portadores assintomáticos do HHV-8 que esperam nas filas de transplante (receptor e doador).

A Seção de Imunologia do IAL vem se empenhando para isto.

Conclusões

- ✓ Foi possível otimizar os ensaios sorológicos IFI-LANA, WB-LANA e IFI-Lítico para a detecção de anticorpos dirigidos ao HHV-8 e utilizá-los no estudo de prevalência desta infecção em diferentes populações de São Paulo.
- ✓ Os resultados obtidos com a padronização dos ensaios para a pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente da infecção HHV-8, mostraram que a IFI-LANA deve ser utilizada como teste de triagem, seguida obrigatoriamente, pelo teste confirmatório de WB-LANA.
- ✓ A pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica de replicação do HHV-8 usando o ensaio IFI-Lítico prescinde do teste confirmatório de WB-Lítico.
- ✓ Em São Paulo, a prevalência de infecção HHV-8 na população infectada pelo HIV/AIDS foi de 19,3% e variou de acordo com a categoria de risco em adquirir esta infecção. Houve associação estatisticamente significativa entre sorologia HHV-8 positiva, sexo masculino e prática homossexual.
- ✓ Baixas prevalências de anticorpos dirigidos ao HHV-8 foram detectadas nos profissionais sadios da área da saúde e na população exposta a risco de transmissão horizontal de doenças infecciosas em São Paulo (1,1% e 1,6% respectivamente). Isto mostra que São Paulo não é região endêmica de HHV-8 e que estas não são populações consideradas de alto risco em adquirir e/ou transmitir esta infecção.
- ✓ Não foi possível atribuir valor prognóstico à pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 no grupo de pacientes com HIV/AIDS de São Paulo devido à introdução de terapia anti-retroviral no Brasil, em 1994.
- ✓ Foi possível implantar ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica da infecção HHV-8, na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, úteis para serem empregados pela Rede Pública de Saúde em levantamentos epidemiológicos e na detecção de portadores assintomáticos em centros de hemodiálise e de transplante de órgãos.

Referências Bibliográficas¹

ABLASHI, D.; CHATLYNNE, L.; COOPER, H.; THOMAS, D.; YADAV, M.; NORHANOM, A. W.; CHANDANA, A. K.; CHURDBOONCHART, V.; KULPRADIST, S. A. R.; PATNAIK, M.; LIEGMANN, K.; MASOOD, R.; REITZ, M.; CLEGHORN, F.; MANNS, A.; LEVINE, P. H.; RABKIN, C.; BIGGAR, R.; JENSEN, F.; GILL, P.; JACK, N.; EDWARDS, J.; WHITMAN, J.; BOSHOFF, C. Seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa. **Br. J. Cancer**, Edinburg, v.81, n.5, p.893-897, 1999.

ALMUNEEF, M.; NIMJEE, S.; KHOSHNOOD, K.; MILLER, G.; RIGSBY, M. O. Prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 (HHV-8) in Saudi Arabian patients with and without renal failure. **Transplantation**, Baltimore, v.71, p.1120-1124, 2001.

ALUIGI, M. G.; ALBINI, A.; CARLONE, S.; REPETTO, L.; DEMARCHI, R.; ICARDI, A.; MORO, M.; NOONAN, D.; BENELLI, R. KSHV sequences in biopsies and cultured spindle cells of epidemic, iatrogenic and mediterranean forms of Kaposi's sarcoma. **Res. Virol.**, Paris, v.147, p.267-275, 1996.

AMBINDER, R. F.; NEWMAN, C.; HAYWARD, G. S.; BIGGAR, R.; MELBYE, M.; KESTENS, L.; MARCK, E. V.; PIOT, P.; GIGASE, P.; WRIGHT, P. B.; QUINN, T. C. Lack of association of cytomegalovirus with endemic African Kaposi's sarcoma. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.156, n.1, p.193-197, 1987.

¹ De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS (ABTN). As abreviações dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994

- AMIR, H.; KAAYA, E. E.; MANJI, K. P.; KWESIGABO, G.; BIBERFELD, P. Kaposi's sarcoma before and during a human immunodeficiency virus epidemic in Tanzanian children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.20, n.5, p.518-521, 2001.
- ANDREONI, M.; EL-SAWAF, G.; REZZA, G.; ENSOLI, B.; NICASTRI, E.; VENTURA, L.; ERCOLI, L.; SARMATI, L.; ROCCHI, G. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in egyptian children: Evidence of nonsexual transmission. **J. Natl. Cancer. Inst.**, Washington – D.C., v.91, n.5, p. 465-469, 1999.
- ANGELONI, A.; HESTON, L.; UCCINI, S.; SIRIANNI, M. C.; COTTONI, F.; MASALA, M. V.; CERIMELE, D.; LIN, S-F.; SUN, R.; RIGSBY, M.; FAGGIONI, A.; MILLER, G. High prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in relatives of patients with classic Kaposi's sarcoma from Sardinia. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.177, p.1715-1718, 1998.
- ANTMAN, K. & CHANG, Y. Kaposi's sarcoma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.342, n.14, p.1027-1038, 2000.
- ARVANITAKIS, I.; MESRI, E. A.; NADOR, R. G.; SAID, J. W.; ASCH, A. S., KNOWLES, D. M.; CESARMAN, E. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. **Blood**, Washington - D.C., v.88, n.7, p.2648-2654, 1996.
- AZEVEDO, K. M. L.; GASPAR, A. P. A.; KALIL-GASPAR, N.; SILVA, J. J. P. Aspectos clínicos e epidemiológicos do sarcoma de Kaposi epidêmico – Estudo de 27 casos. **Arq. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 2, p. 85-90, 1996.

- BERAL, V.; PETERMAN, T. A.; BERKELMAN, R. L.; JAFFE, H. W. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: A sexually transmitted infection? **Lancet.**, London, v.335, p.123-128, 1990.
- BESTETTI, G.; RENON, G.; MAUCLÉRE, P.; RUFFIÉ, A.; MBOPI, F-X.; EME, D.; PARRAVICINI, C.; CORBELLINO, M.; DE THÉ, G.; GESSAIN, A. High seroprevalence of human herpesvirus-8 in pregnant women and prostitutes from Cameroon. **AIDS**, New York, v.12, n.5, p.541-543, 1998.
- BIGGAR, R. J.; HORM, J.; FRAUMENI, J. F.; GREENE, M. H.; GOEDERT, J. J. Incidence of Kaposi's sarcoma and mycosis fungoides in the United States including Puerto Rico, 1973-81. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington - D.C, v.73, n.1, p.89-94, 1984.
- BIGGAR, R. J.; WHITBY, D.; MARSHALL, V.; LINHARES, A. C.; BLACK, F. Human herpesvirus 8 in Brazilian amerindians: A hyperendemic population with a new subtype. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.181, p.1562-1568, 2000.
- BLACKBOURN, D. J.; OSMOND, D.; LEVY, J. A.; LENNETTE, E. T. Increased human herpesvirus 8 seroprevalence in young homosexual men who have multiple sex contacts with different partners. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.237-239, 1999.
- BOSHOFF, C.; SCHULZ, T. F.; KENNEDY, M. M.; GRAHAM, A. K.; FISHER, C.; THOMAS, A.; MCGEE, J. O'D.; WEISS, R. A.; O'LEARY, J. J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. **Nature Medicine**, New York, v.1, n.12, p.1274-1278, 1995.
- BOSHOFF, C.; GAO, S-J.; HEALY, L. E.; MATTHEWS, S.; THOMAS, A. J.; COIGNET, L.; WARNKE, R. A.; STRAUCHEN, J. A.; MATUTES, E.; KAMEL, O. W.; MOORE, P. S.; WEISS, R. A.; CHANG, Y. Establishing a KSHV + cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterization its

- growth in nod/SCID mice. **Blood**, Washington - D.C., v.91, n.5, p.1671-1679, 1998.
- BOURBOULIA, D.; WHITBY, D.; BOSHOF, C.; NEWTON, R.; BERAL, V.; CARRARA, H.; LANE, A.; SITAS, F. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. **JAMA**, Chicago, v.280, n.1, p.31-32, 1998.
- BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS. **AIDS: Bol. Epidemiol.** Nov, 2000.
- CANNON, M. J.; DOLLARD, S. C.; SMITH, D. K.; KLEIN, R. S.; SCHUMAN, P.; RICH, J. D.; VLAHOV, D.; PELLET, P. E.; FOR THE HIV EPIDEMIOLOGY RESEARCH STUDY GROUP. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, n.9, p.637-643, 2001.
- CARBONE, P. H. L.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; MOREIRA, A. A.; CIBELLA, S. E. L.; MARTINELLI, F. L. B.; BARRA, L. A. C., SULEIMAN, J. Exploring groups at risk for HHV-8 infection in São Paulo, Brazil. **In: FeSBE 2002**, Salvador, BA, 2002. Resumos 40.001.
- CARBONE, P. H. L.; SANTOS-FORTUNA, E.; MOREIRA, A. A.; CIBELLA, S. E. L.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Padronização da técnica de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica na infecção pelo herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8). **In: IV Encontro do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, 2001. Resumos, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, (Supl. 1), IMU-33, p.163, 2001.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.177, n.4, p.1136-1137, 1998.

CATERINO-DE-ARAUJO A. Herpes vírus humano tipo 8 (HHV-8) e o sarcoma de Kaposi. **LAES/HAES**, São Paulo, v.119, p.72-84, 1999.

CATERINO-DE-ARAUJO, A., CALABRÒ, M. L., FAVERO, A., SANTOS-FORTUNA, E.; DEL MISTRO, A., ALVES, V. A. F., CHIECO-BIANCHI, L. Detection of herpesvirus (KSHV) DNA sequences in Brazilian patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Braz J. Infect. Dis.**, Salvador, BA, v.1, n.5, p.256-259, 1997.

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; CALABRÒ, M. L., SANTOS-FORTUNA, E., SULEIMAN, J., CHIECO-BIANCHI, L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.1591-1592, 1999.

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; CARBONE, P. H. L.; MARTINELLI, F. L. B.; SANTOS-FORTUNA, E.; MOREIRA, A. A., SULEIMAN, J., BARRA, L. A. C. Absence of an association between the presence of human herpesvirus 8 antibodies and the development of Kaposi's sarcoma in HIV-1 infected patients receiving anti-retroviral therapy. **AIDS**, New York, v.14, n.10, p.1455-1457, 2000a.

CATERINO-DE-ARAUJO, A. & CIBELLA, S. E. L. Searching for antibodies to HHV-8 in children born to HIV-1 infected mothers from São Paulo, Brazil. Relationship to maternal infection. **J. Trop. Pediatr.**, v.49, n 3. Oxford, 2003.

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; MOREIRA, A. A. Diversity of HHV-8 subtypes in KS-AIDS patients from São Paulo, Brazil: Presentation of a new HHV-8 subtyping method. **In:** XIV International Conference on AIDS, Barcelona, Espanha, 2002. Abstract Book Vol II, ThPeC7534, p. 469.

- CATERINO-DE-ARAUJO, A.; RODRIGUES, E.; ALVES, V. A. F.; BEZ, C.; OYAFUSO, L. K.; SANTOS-FORTUNA, E.; TEO, C-G. Subtipos de HHV-8 presentes em casos de sarcoma de Kaposi associados a infecção HIV em São Paulo. Relação com tratamento anti-retroviral e agressividade do tumor. **In:** IV Simpósio Brasileiro de Pesquisa Básica em HIV/AIDS, Costa do Sauípe, Bahia, 2001. Resumos, **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v.5 (Supl 1), S24, p.38, 2001.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; CARBONE, P. H. L.; CIBELLA, S. E. L.; MOREIRA, A. A. Searching for antibodies to HHV-8 and their association with Kaposi's sarcoma among HIV-1-infected and non-infected women and children born to HIV-infected mothers from São Paulo, Brazil. **In:** XIV International Conference on AIDS, Barcelona, Espanha, 2002a. Abstract Book Vol II, ThPeC7535, p. 469.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; CARBONE, P. H. L.; CIBELLA, S. E. L.; MOREIRA, A. A. Human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies among women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. **HIV Medicine**, London, 2003 (submitted).
- CATERINO-DE-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; CARBONE, P. H. L.; CIBELLA, S. E. L.; MOREIRA, A. A. Human Herpesvirus-8 (HHV-8) antibodies among women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. **In:** XXVII Meeting of the Brazilian Society of Immunology, V International Symposium on Allergy and Clinical Immunology, Salvador, BA, 2002c. Resumos.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; RODRIGUES, E.; OYAFUSO, L. K. Absence of human herpesvirus 8 DNA sequences in peripheral blood of AIDS-associated Kaposi's sarcoma patients receiving anti-herpesvirus and highly active anti-retroviral therapies. **In:** XIII

- International AIDS Conference, Durban, South Africa, 2000b. Abstract Book Volume II, WePeA4006, p.22.
- CATTANI, P.; CAPUANO, M.; CERIMELE, F.; LA PAROLA, I. L.; SANTANGELO, R.; MASINI, C.; CERIMELE, D.; FADDA, G. Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human immunodeficiency virus-seronegative patients from Central and Southern Italy, with and without Kaposi's sarcoma. **J. Clin. Microbiol.**, Washington – D.C., v.37, n.4, p.1150-1153, 1999.
- CATTANI, P.; NANNI, G.; GRAFFEO, R.; CAPUANO, M.; CERIMELE, F.; LA PAROLA, I. L.; DIOCIAIUTI, A.; POZZETTO, U.; CERIMELE, D.; FADDA, G.; CASTAGNETO, M. Pretransplantation human herpesvirus 8 seropositivity as a risk factor for Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients. **Transplant. Proc.**, New York, v.32, n.3, p.526-527, 2000.
- CESARMAN, E.; CHANG, Y.; MOORE, P. S.; SAID, J. W.; KNOWLES, D. M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.332, n.18, p.1186-1191, 1995.
- CHANDRAN, B.; BLOOMER, C.; CHAN, S. R.; ZHU, L.; GOLDSTEIN, E.; HORVAT, R. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. **Virology**, Orlando, v.249, p. 140-149, 1998.
- CHANDRAN, B.; SMITH, M. S.; KOELLE, D. M.; COREY, L.; HORVAT, R.; GOLDSTEIN, E. Reactivities of human sera with human herpesvirus-8-infected BCBL-1 cells and identification of HHV-8-specific proteins and glycoproteins and encoding cDNAs. **Virology**, Orlando, v. 243, p.208-217, 1998.

- CHANG, Y.; CESARMAN, E.; PESSIN, M. S.; LEE, F.; CULPEPPER, J.; KNOWLES, D. M.; MOORE, P. S. Identification of herpesvirus like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science**, Washington – D.C., v.266, p.1865-1869, 1994.
- CHATLYNNE, L. G. & ABLASHI, D. V. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). **Semin. Cancer Biol.**, London, v.9, p.175-185, 1999.
- CHATLYNNE, L. G.; LAPPS, W.; HANDY, M.; HUANG, Y. Q.; MASOOD, R.; HAMILTON, A. S.; SAID, J. W.; KOEFFLER, H. P.; KAPLAN, M. H.; FRIEDMAN-KIEN, A.; GILL, P. S.; WHITMAN, J. E.; ABLASHI, D. V. Detection and titration of human herpesvirus 8-specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. **Blood**, Washington – D.C, v.92, n.1, p.53-58, 1998.
- COOK-MOZAFFARI; NEWTON, R.; BERAL, R.; BURKITT, D. P. The geographical distribution of Kaposi's sarcoma and of lymphoma in Africa before the AIDS epidemic. **Br. J. Cancer**, Edinburg, v.78, n. 11, p.1521-1528, 1998.
- CORBELLINO, M.; PAULLI, M.; BESTETTI, G.; AUBIN, J. T.; CAPRA, M.; BIFULCO, C.; BERTI, E.; AGUT, H.; MORONI, M.; GALLI, M.; MAGRINI, U.; PARRAVICINI, C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences (KSHV) and EBV in giant lymph node hyperplasia (Castleman's disease). **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, New York, 11 (Suppl. 1): S97, 1995.
- DAVIDOVICI, B.; KARAKIS, I.; BOURBOULIA, D.; ARIAD, S.; ZONG, J-C.; BENHARROCH, D.; DUPIN, N.; WEISS, R.; HAYWARD, G.; SAROV, B.; BOSHOF, C. Seroepidemiology and molecular epidemiology of Kaposi's

- sarcoma-associated herpesvirus among jewish population groups in Israel. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington - D.C, v.93, n.3, p.194-202, 2001.
- DAVIS, D. A.; HUMPHREY, R. W.; NEWCOMB, F. M.; O'BRIEN, T. R.; GOEDERT, J. J.; STRAUS, S. E.; YARCHOAN, R. Detection of serum antibodies to a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific peptide. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.175, p.1071-1079, 1997.
- DECKER, L. L.; SHANKAR, P.; KHAN, G.; FREEMAN, R. B.; DEZUBE, B. J.; LIEBERMAN, J.; THORLEY-LAWSON, D. A. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. **J. Exp. Med.**, New York, v.184, p.283-288, 1996.
- DE-THÉ, G.; BESTETTI, G.; VAN BEVEREN, M.; GESSAIN, A. Prevalence of human herpesvirus 8 infection before acquired immunodeficiency disease syndrome-related epidemic of Kaposi's sarcoma in East Africa. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington - D.C, v.91, n.21, p.1888-1889, 1999.
- DI ALBERTI, L.; NGUI, S. L.; PORTER, S. R.; SPEIGHT, P. M.; SCULLY, C. M.; ZAKREWSKA, J. M.; WILLIAMS, I. G.; ARTESE, L.; PIATTELLI, A.; TEO, C. G. Presence of human herpesvirus 8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.175, p.703-707, 1997.
- DIAMOND, C.; THIEDE, H.; PERDUE, T.; MAC KELLAR, D.; VALLEROY, L. A.; COREY, L. Seroepidemiology of human herpesvirus 8 among young men who have sex with men. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v.28, n.3, p.176-183, 2000.
- DUPIN, N.; GRANDADAM, M.; CALVEZ, V.; GORIN, I.; AUBIN, J. T.; HAVARD, S.; LAMY, F.; LEIBOWITCH, M.; HURAUX, J. M.; ESCANDE, J. P.; AGUT,

- H. Herpesvirus-like DNA sequences in patients with mediterranean Kaposi's sarcoma. **Lancet**, London, v.345, p.761-762, 1995
- DUPIN, N.; MARCELIN, A-G.; GORIN, I.; BOSSI, P.; FRANCK, N.; WEILL, B.; HURAUX, J. M.; ESCANDE, J-P.; CALVEZ, V. Prevalence of human herpesvirus 8 infection measured by antibodies to a latent nuclear antigen in patients with various dermatologic diseases. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.134, p.700-702, 1998.
- EDELMAN, D. C.; KETEMA, F.; SAVILLE, R. D.; HERMAN, J.; SILL, A. M.; GILL, P. S.; BLATTNER, W. A.; CONSTANTINE, N. T. Specifics on the refinement and application of two serological assays for the detection of antibodies to HHV-8. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.16, p.225-237, 2000.
- EKMAN, M.; KAAYA, E. E.; SCHALLING, M.; COLOMBINI, S.; ENSOLI, B.; GALLO, R. C.; BIBERFELD, P. Herpesvirus like (KSHV) DNA in various forms of Kaposi's sarcoma (KS) and malignant lymphoma (ML). **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, New York, 11 (Supl. 1): S74, 1995.
- ENBOM, M.; TOLFVENSTAM, T.; GHEBREKIDAN, H.; RUDÉN, U.; GRANDIEN, M.; WAHREN, B.; LINDE, A. Seroprevalence of human herpes virus 8 in different Eritrean population groups. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.14, p. 167-172, 1999.
- ENBOM, M.; SHELDON, J.; LENNETTE, E.; SCHULZ, T.; ABLASHI, D. V.; NEIPEL, F.; BIBERFELD, P.; CARLBERG, H.; LJUNGMAN, P.; NILSSON, A.; SÖDERSTRÖM, T.; WADSTRÖM, J.; LINDE, A. Antibodies to human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in blood donors and potential high-risk groups in Sweden: Variable frequencies found in a multicenter serological study. **J. Med. Virol.**, New York, v.62, p.498-504, 2000.
- ENGELS, E. A.; WHITBY, D.; GOEBEL, B.; STOSSEL, A.; WATERS, D.; PINTUS, A.; CONTU, L.; BIGGAR, R. J.; GOEBERT, J. J. Identifying

- human herpesvirus 8 infection: Performance characteristics of serologic assays. **J. Acquired Immune Defic. Syndr.**, Hagerstown, v.23, n.4, p.346-354, 2000.
- FOREMAN, K. E. Kaposi's sarcoma: the role of HHV-8 and HIV-1 in pathogenesis. **In: Reviews in molecular medicine**. Ed. Cambridge, 2001.
- FRIEDMAN-KIEN, A. E. Detection of a new herpesvirus like virus DNA sequence in AIDS-KS and AIDS-lymphomas. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, New York, 11 (Supl. 1): S96-S97, 1995.
- FUJII, T.; TAGUCHI, H.; KATANO, H.; MORI, S.; NAKAMURA, T.; NOJIRI, N.; NAKAJIMA, K.; TADOKORO, K.; JUJI, T.; IWAMOTO, A. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. **J. Med. Virol.**, New York, v.57, p.159-162, 1999.
- GAO, S-J.; ALSINA, M.; DENG, J-H.; HARRISON, C. R.; MONTALVO, E. A.; LEACH, C. T.; ROODMAN, G. D.; JENSON, H. B. Antibodies to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in patients with multiple myeloma. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.846-849, 1998.
- GAO, S-J.; KINGSLEY, L.; HOOVER, D. R.; SPIRA, T. J.; RINALDO, C. R.; SAAH, A.; PHAIR, J.; DETELS, R.; PARRY, P.; CHANG, Y.; MOORE, P. S. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.335, n.4, p.233-241, 1996a.
- GAO, S-J.; KINGSLEY, L.; LI, M.; ZHENG, W.; PARRAVICINI, C.; ZIEGLER, J.; NEWTON, R.; RINALDO, C. R.; SAAH, A.; PHAIR, J.; DETELS, R.; CHANG, Y.; MOORE, P. S. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. **Nature Medicine**, New York, v.2, n.8, p.925-928, 1996b.

- GAO, S-J.; ZHANG, Y.J.; DENG, J.H.; RABKIN, C.S.; FLORE, O; JENSON, H.B. Molecular polymorphism of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV-8) latent nuclear antigen: Evidence for a large repertoire of viral genotypes and dual infection with different viral genotypes. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, p.1466-1476, 1999.
- GESSAIN, A.; MAUCLÈRE, P.; VAN BEVEREN, M.; PLANCOULAIN, S.; AYOUBA, A.; ESSAME-OYONO, J-L, MARTIN, P. M. V.; DE THÉ, G. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. **Int. J. Cancer**, New York, v.81, p.189-192, 1999.
- GIRALDO, G.; BETH, E.; HAGUENAU, F. Herpes-type virus particles in tissue culture of Kaposi's sarcoma from different geographic regions. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington.-D.C, v.49, p.1509-1526, 1972b.
- GIRALDO, G.; BETH, E.; HUANG, E-S. Kaposi's sarcoma and its relationship to cytomegalovirus (CMV). **Int. J. Cancer**, New York, v.26, p.23-29, 1980.
- GOEDERT, J. J.; KEDES, D. H.; GANEM, D. Antibodies to human herpesvirus 8 in women and infants born in Haiti and the USA. **Lancet**, London, v.349, p.1368, 1997.
- GOUDSMIT, J.; RENWICH, N.; DUKERS, N. H. T. M.; COUTINHO, R. A.; HEISTERKAMP, S.; BAKKER, M.; SCHULZ, T. F.; CORNELISSEN, M.; WEVERLING, G. J. Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam cohort studies (1984-1997): Analysis of seroconversions to ORF 65 and ORF 73. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington - D.C, v.97, n.9, p.4838-4843, 2000.
- GREENBLATT, R. M.; JACOBSON, L. P.; LEVINE, A. M.; MELNICK, S.; ANASTOS, K.; COHEN, M.; DEHOVITZ, J.; YOUNG, M. A.; BURNS, D.;

- MIOTTI, P.; KOELLE, D. M. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma among human immunodeficiency virus-infected and-uninfected women. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.183, p.1130-1134, 2001.
- HARRINGTON, W.; SIECZKOWSKI, L.; SOSA, C.; CHAN-A-SUE, S.; CAI, J. P.; CABRAL, L.; WOOD, C. Activation of HHV-8 by HIV-1 tat. **Lancet**, London, v.349, p.774-775, 1997.
- HAVERKOS, H. W. & CURRAN, J. W. C. The current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. **Ca-Cancer J. Clin.**, Hagerstown, v.32, n.6, p.330-339, 1982.
- HE, J.; BHAT, G.; KANKASA, C.; CHINTU, C.; MITCHELL, C.; DUAN, W.; WOOD, C. Seroprevalence of human herpesvirus 8 among Zambian women of childbearing age without Kaposi's sarcoma (KS) and mother-child pairs with KS. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.1787-1790, 1998.
- HONG, A. & LEE, C. S. Timely topic. The emerging role of the human herpesvirus 8 (HHV-8) in human neoplasia. **Pathology**, Basingstoke, v.33, p.461-468, 2001.
- HUANG, Y. Q.; LI, J. J.; KAPLAN, M. H.; POIESZ, B.; KATABIRA, E.; ZHANG, W. C.; FEINER, D.; FRIEDMAN-KIEN, A. E. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. **Lancet**, London, v.345, p.759-761, 1995.
- HUDNALL, S. D.; RADY, P. L.; TYRING, S. K.; FISH, J. C. Serologic and molecular evidence of human herpesvirus 8 activation in renal transplant recipients. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.1791-1794, 1998.
- INOUE, N.; MAR, E.-C.; DOLLARD, S. C.; PAU, C.-P.; ZHENG, Q.; PELLETT, P. E. New immunofluorescence assays for detection of human herpesvirus 8-

- specifics antibodies. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, Washington.- D.C., v.73, n.3, p.427-435, 2000.
- JAFFE, H. W. & FRANKEL, S. S. Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8. **In: Pathology of Emerging Infections**, HORSBURG & NELSON Ed. Washington - D.C, 1997. p.107-117.
- KAPOSI, M. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der haut. **Arch. Dermatol. Syphilis.** 4:265-273, 1872. apud HAVERKOS, H. W. & CURRAN, J. W. Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin **Cancer J. Clin.**, Hagerstown, v.32, n.6, p.330-346, 1982
- KATANO, H.; IWASAKI, T.; BABA, N.; TERA, M.; MORI, S.; IWAMOTO, A.; KURATA, T.; SATA, T. Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population among patients with and without Kaposi's sarcoma. **J. Virol.**, Washington - D.C, v.74, p.3478-3485, 2000.
- KATANO, H.; SATA, T.; SUDA, T.; NAKAMURA, T.; TACHIKAWA, N.; NISHIZUMI, H.; SAKURADA, S.; HAYASHI, Y.; KOIKE, M.; IWAMOTO, A.; KURATA, T.; MORI, S. Expression and antigenicity of human herpesvirus 8 encoded ORF59 protein in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **J. Med. Virol.**, New York, v.59, p.346-355, 1999.
- KATANO, H.; SATO, Y.; KURATA, T.; MORI, S.; SATA, T. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. **Virology**, Orlando, v.269, p.335-344, 2000.
- KEDDA, M-A.; MARGOLIUS, L.; KEW, M. C.; SWANEPOEL, C.; PEARSON, D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Kaposi's sarcoma occurring in immunosuppressed renal transplant recipients. **Clin. Transplant.**, Philadelphia, v.10, p.429-431, 1996.

- KEDES, D. H.; GANEM, D.; AMELI, N.; BACCHETTI, P.; GREENBLATT, R. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. **JAMA**, Chicago, v.277, n.6, p.478-481, 1997.
- KEDES, D. H.; OPERSKALSKI, E.; BUSCH, M.; KOHN, R.; FLOOD, J.; GANEM, D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): Distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. **Nature Medicine**, New York, v.2, n.8, p.918-924, 1996.
- KELLER, R.; ZAGO, A.; VIANA, M. C.; BOURBOULIA, D.; DESGRANGES, C.; CASSEB, J.; MOURA, W. V.; DIETZE, R.; COLLANDRE, H. HHV-8 infection in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.34, n.7, p.879-886, 2001.
- KOELLE, D. M.; HUANG, M-L.; CHANDRAN, B.; VIEIRA, J.; PIEPKORN, M.; COREY, L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV-8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: Clinical and immunologic correlates. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.176, p.94-102, 1997.
- KULIK, S. M. Estudo descritivo para hepatite B em portadores de deficiência mental e profissionais de saúde, em uma instituição fechada no Brasil. São Paulo, 1999. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]. p. 112.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LA DUCA, J. R.; LOVE, J. L.; ABBOTT, L. Z.; DUBE, S; FRIEDMAN-KIEN, A. E.; POIESZ, B. J. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in

- tissues and bodily fluids. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.1610-1615, 1998.
- LAM, L. L.; PAU, C-P.; DOLLARD, S. C.; PELLETT, P. E.; SPIRA, T. J. Highly sensitive assay for human herpesvirus 8 antibodies that uses a multiple antigenic peptide derived from open reading frame K8.1. **J. Clin. Microbiol.** - Washington, D.C, v.40, n.2, p.325-329, 2002.
- LEÃO, J. C.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; PORTER, S. R.; SCULLY, C. Human Herpesvirus 8 (HHV-8) and the etiopathogenesis of Kaposi's sarcoma. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, São Paulo, v.57, n.4, p.175-186, 2002.
- LEÃO, J. C.; KUMAR, N. P.; MCLEAN, K. A.; PORTER, S. R.; SCULLY, C. M.; SWAN, A. V.; TEO, C. G. Effect of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors on the clearance of human herpesvirus-8 from blood of human immunodeficiency virus-infected patients. **J. Med.Virol.**, New York, v.62, n.4, p.416-420, 2000.
- LENNETTE, E. T.; BLACKBOURN, D. J.; LEVY, J. A. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. **Lancet**, London, v.348, p.858-861, 1996.
- LEVY, J. A. Three new human herpesvirus (HHV-6, 7 and 8). **Lancet**, London, v.349, p.558-563, 1997.
- LIN, S. F.; SUN, R.; HESTON, L.; GRADOVILLE, L.; SHEDD, D.; HAGLUND, K.; RIGSBY, M.; MILLER, G. Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small capsid antigen. **J. Virol.**, Washington - D.C, v.71, n.4, p.3069-3076, 1997.
- LUNARDI-ISKANDAR, Y.; BRYANT, J. L.; ZEMAN, R. A., LAM, V. H., SAMANIEGO, F.; BESNIER, J. M.; HERMANS, P.; THIERRY, A. R.; GILL,

- P.; GALLO, R. C. Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a human pregnancy hormone. **Nature**, London, v.375, p.64-68, 1995.
- LYALL, E. G. H.; PATTON, G. S.; SHELDON, J.; STAINSBY, C.; MULLEN, J.; O'SHEA, S.; SMITH, N. A.; DE RUITER, A.; MCCLURE, M. O.; SCHULZ, T. F. Evidence for horizontal and not vertical transmission of human herpesvirus 8 in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. **Pediatric. Infec. Dis. J.**, Baltimore, v.18, n.9, p.795-799, 1999.
- MANN, A.; STRICKLER, H. D.; HANCHARD, B.; MANASSARAM, D. M.; WATERS, D.; ABLASHI, D. V. Age and Sex-specific seroprevalence of human herpesvirus 8 in Jamaica. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington - D.C, v.90, n.14, p.1102-1103, 1998.
- MARCELIN, A-G.; DUPIN, N.; BOSSI, P.; CALVEZ, V. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in healthy subjects and patients with AIDS-associated and classical Kaposi's sarcoma in France. **AIDS**, New York, v.12, n.5, p.539-540, 1998.
- MARTIN, J. N.; AMAD, Z.; COSSEN, C.; LAM, P. K.; KEDES, D. H.; PAGE-SHAFER, K. A.; OSMOND, D. H.; FORGHANI, B. Use of epidemiologically well-defined subjects and existing immunofluorescence assays to calibrate a new enzyme immunoassay for human herpesvirus 8 antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, Washington - D.C, v.38, n.2, p.696-701, 2000.
- MARTIN, J. N.; GANEM, D. E.; OSMOND, D. H.; PAGE-SHAFER, K. A.; MACRAE, D.; KEDES, D. H. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.338, n.14, p.948-954, 1998.
- MASINI, C.; ABENI, D. D.; CATTARUZZA, M. S.; CAPUANO, M.; PEDICELLI, C.; CERIMELE, F.; PASQUINI, P.; CERIMELE, D.; FADDA, G.; CATTANI,

- P. Antibodies against human herpesvirus 8 in subjects with non-venereal dermatological conditions. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.143, p.484-490, 2000.
- MAYAMA, S.; CUEVAS, L. E.; SHELDON, J.; OMAR, O. H.; SMITH, D. H.; OKONG, P.; SILVEL, B.; HART, C. A.; SCHULZ, T. F. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. **Int. J. Cancer**, New York, v.77, n.817-820, 1998.
- MELBYE, M.; COOK, P. M.; HJALGRIM, H.; BEGTRUP, K.; SIMPSON, G. R.; BIGGAR, R. J.; EBBESEN, P.; SCHULZ, T. F. Risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. **Int. J. Cancer**, New York, v.77, p.543-548, 1998.
- MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; ARVANITAKIS, L.; RAFII, S.; MOORE, M. A. S.; POSNETT, D. N.; KNOWLES, D. M.; ASCH, A. S. Human herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. **J. Exp. Med.**, New York, v.183, p.2385-2390, 1996.
- MILLER, G.; HESTON, L.; GROGAN, E.; GRADOVILLE, L.; RIGSBY, M.; SUN, R.; SHEDD, D.; KUSHNARYOV, V. M.; GROSSBERG, S.; CHANG, Y. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. **J. Virol.**, Washington - D.C, v.71, n.1, p.314-324, 1997.
- MILLER, G.; RIGSBY, M. O.; HESTON, L.; GROGAN, E.; SUN, R.; METROKA, G.; LEVY, J. A.; GAO, S.-J.; CHANG, Y.; MOORE, P. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.334, n.20, p.1292-1297, 1996.

- MOORE, P. S.; KINGSLEY, L. A.; HOLMBERG, S. D.; SPIRA, T.; GUPTA, P.; HOOVER, D. R.; PARRY, J. P.; CONLEY, L. J.; JAFFE, H. W.; CHANG, Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. **AIDS**, New York, v.10, n.2, p.175-180, 1996.
- NADOR, R. G.; CESARMAN, E.; CHADBURN, A.; DAWSON, D. B.; ANSARI, M. Q.; SAID, J.; KNOWLES, D. M. Primary effusion lymphoma: A distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Blood.**, Washington – D.C, v.88, n.2, p.645-656, 1996.
- NEIPEL, F.; ALBRECHT, J. C.; FLECKENSTEIN, B. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: Determinants of its pathogenicity? **J. Virol.**, Washington – D.C., v.71, p.4187-4192, 1997.
- NEIPEL, F. & FLECKENSTEIN, B. The role of HHV 8 in Kaposi's sarcoma. **Semin. cancer Biol.**, London, v. 9, p.151-164, 1999.
- OLSEN, S. J., CHANG, Y., MOORE, P. S., BIGGAR, R. J.; MELBYE, M. Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985. **AIDS**, New York, v.12, n.14, p.1921-1925, 1998.
- O'NEIL, E.; DOUGLAS, J. L.; CHIEN, M. L.; GARCIA, J. V. Open reading frame 26 of human herpesvirus 8 encodes a tetradecanoyl phorbol acetate-and butyrate-inducible 32-kilodalton protein expressed in a body cavity-based lymphoma cell line. **J. Virol.**, Washington – D.C., v.71, n.6, p.4791-4797, 1997.
- PARISI, G. P.; SARMATI, L.; PAPPAGALLO, M.; MAZZI, R.; CAROLO, G.; FARCHI, F.; NICASTRI, E.; CONCIA, E.; REZZA, G.; ANDREONI, M. Prevalence trend and correlates of HHV-8 infection in HIV-infected patients. **J. Acquired Immune Defic. Syndr.**, Hagerstown, v.29, p.295-299, 2002.

- PARRAVICINI, C.; CHANDRAN, B.; CORBELLINO, M.; BERTI, E.; PAULLI, M.; MOORE, P. S.; CHANG, Y. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases. Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. **Am. J. Pathol.**, Chicago, v.156, p.743-749, 2000.
- PARRAVICINI, C.; OLSEN, S. J.; CAPRA, M.; POLI, F.; SIRCHIA, G.; GAO, S-J.; BERTI, E.; NOCERA, A.; ROSSI, E.; BESTETTI, G.; PIZZUTO, M.; GALLI, M.; MORONI, M.; MOORE, P. S.; CORBELLINO, M. Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. **Blood**, Washington – D.C., v.90, n.7, p.2826-2829, 1997.
- PAU, C-P.; LAM, L. L.; SPIRA, T. J.; BLACK, J. B.; STEWART, J. A.; PELLETT, P. E.; RESPESS, R. A. Mapping and serodiagnostic application of a dominant epitope within the human herpesvirus 8 ORF 65-encoded protein. **J. Clin. Microbiol.**, Arbor, v.36, n.6, p.1574-1577, 1998.
- PERNA, A. M.; BONURA, F.; VITALE, F.; VIVIANO, E.; DI BENEDETTO, M. A.; AJELLO, F.; VILAFRATE, M. R.; PRESTILEO, T.; MANCUSO, S.; GOEDERT, J. J.; ROMANO, N. Antibodies to human herpesvirus type 8 (HHV-8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. **Int. J. Epidemiol.**, London, v.29, p.175-179, 2000.
- PIERROTTI, L. C.; SUMITA, L. M.; FREIRE, W. S.; CAIAFFA, H. H. F.; SOUZA, V. A. U. F. Detection of human herpesvirus 8 DNA and antibodies to latent nuclear and lytic-phase antigens in serial samples from AIDS patients with Kaposi's sarcoma. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.16, p.247-251, 2000.
- PIERROTTI, L. C. Estudo da prevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus humano 8 (HHV-8) em pacientes com HIV/AIDS do

- Município de Santos, Estado de São Paulo. São Paulo 2000. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]. p. 150.
- PLANCOULAIN, S.; ABEL, L.; VAN BEVEREN, M.; TRÉGOUËT, D-A.; JOUBERT, M.; TORTEVOYE, P.; DE THÉ, G.; GESSAIN, A. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. **Lancet**, London, v.356, p.1062-1065, 2000.
- RAAB, M-S.; ALBRECHT, J-C.; BIRKMANN, A.; YAGUBOGLU, S.; LANG, D.; FLECKENSTEIN, B.; NEIPEL, F. The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. **J Virol.**, Washington - D.C, v.72, n.8, p.6725-6731, 1998.
- RABKIN, C. S.; SCHULZ, T. F.; WHITBY, D.; LENNETTE, E. T.; MAGPANTAY, L. I.; CHATLYNNE, L.; BIGGAR, R. J. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.304-309, 1998.
- RAINBOW, L.; PLATT, G. M.; SIMPSON, G. R.; SARID, R.; GAO, S-J., STOIBER, H.; HERRINGTON, C. S.; MOORE, P. S.; SCHULZ, T. F. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by ORF73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. **J Virol.**, Washington - D.C, v.71, n.8, p.5915-5921, 1997.
- RADY, P. L.; YEN, A.; ROLLEFSON, J. L.; ORENGO, I.; BRUCE, S.; HUGHES, T. K.; TYRING, S. K. Herpesvirus-like DNA sequences in non-Kaposi's sarcoma skin lesions of transplant patients. **Lancet**, London, v.345, p.1339-1340, 1995.
- REGAMEY, N.; CATHOMAS, G.; SCHWAGER, M.; WERNLI, M.; HARR, T.; ERB, P. High human herpesvirus 8 seroprevalence in the homosexual

- population in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, Arbor, v.36, n.6, p.1784-1786, 1998.
- RENNE, R.; ZHONG, W.; HERNDIER, B.; McGRATH, M.; ABBEY, N.; KEDES, D.; GANEM, D. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. **Nature Medicine**, New York, v.2, n.3, p.342-347, 1996.
- REZZA, G.; ANDREONI, M.; DORRUCCI, M.; PEZZOTTI, P.; MONINI, P.; ZERBONI, R.; SALASSA, B.; COLANGELI, V.; SARMATI, L.; NICASTRI, E.; BARBANERA, M.; PRISTERÀ, R.; AIUTI, F.; ORTONA, L.; ENSOLI, B. Human herpesvirus 8 seropositivity and risk of Kaposi's sarcoma and other acquired immunodeficiency syndrome-related diseases. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington - D.C., v.91, n.17, p.1468-1474, 1999.
- REZZA, G.; DANAYA, R. T.; WAGNER, T. M.; SARMATI, L.; OWEN, I. L.; MONINI, P.; ANDREONI, M.; SULIGOI, B.; ENSOLI, B.; POZIO, E. Human herpesvirus-8 and other viral infections, Papua New Guinea. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.7, n.5, p.893-895, 2001.
- REZZA, G.; DORRUCCI, M.; SERRAINO, D.; ANDREONI, M.; GIULIANI, M.; ZERBONI, R.; SARMATI, L.; COLANGELI, V.; SALASSA, B.; MONINI, P.; ENSOLI, B.; PEZZOTTI, P. Incidence of Kaposi's sarcoma and HHV-8 seroprevalence among homosexual men with known dates of HIV seroconversion. **AIDS**, New York, v.14, n.11, p.1647-1653, 2000.
- REZZA, G.; LENNETTE, E. T.; GIULIANI, M.; PEZZOTTI, P.; CAPRILLI, F.; MONINI, P.; BUTTÒ, S.; LODI, G.; DI CARLO, A.; LEVY, J. A.; ENSOLI, B. Prevalence and determinants of anti-lytic and anti-latent antibodies to human herpesvirus 8 among Italian individuals at risk of sexually and parenterally transmitted infections. **Int. J. Cancer**, New York, v.77, p.361-365, 1998.

- RODRIGUES, E. Sarcoma de Kaposi em mucosa oral de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida: Aspectos clínicos, morfológicos e virológicos. São Paulo, 2000. [Tese Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]. p. 161.
- ROIZMAN, B. Herpesviridae. **In:** Fields Virology, 3º Ed., FIELDS, KNIPE, HOWLEY. Ed. Philadelphia, 1996. p.2221-2230.
- RUSO, J. J.; BOHENZKY, R. A.; CHIEN, M-C.; CHEN, J.; YAN, M.; MADDALENA, D.; PARRY, J. P.; PERUZZI, D.; EDELMAN, I. S.; CHANG, Y.; MOORE, P. S. Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV-8). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington - D.C., v.93, p.14862-14867, 1996.
- SAID, J. W.; CHIEN, K.; TASAKA, T.; KOEFFLER, H. P. Ultrastructural characterization of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Kaposi's sarcoma lesions: Electron microscopy permits distinction from cytomegalovirus (CMV). **J. Pathol.**, Edinburgh, v.182, p.273-281, 1997.
- SAID, J. W.; TASAKA, T.; TAKEUSHI, S.; ASOU, H.; DE VOS, S.; CESARMAN, E.; KNOWLES, D. M.; KOEFFLER, H. P. Primary effusion lymphoma in women: Report of two cases of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women. **Blood**, Washington – D.C., v.88, n.8, p.3124-3128, 1996.
- SANTOS-FORTUNA, E.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; BEZ, C.; RODRIGUES, E.; OYAFUSO, L. K.; BARRA, L. A. C.; SULEIMAN, J.; TEO, C-G. Saliva as a vehicle of human herpesvirus type 8 (HHV-8) transmission. **In:** X International Congress on Infectious Diseases, Singapore, 2002. Abstract 15.017, p. 40.

- SANTARELLI, R.; DE MARCO, R.; MASALA, M. V.; ANGELONI, A.; UCCINI, S.; PACCHIAROTTI, R.; MONTESU, M. A.; SATTA, R.; CERIMELE, D.; FAGGIONI, A.; COTTONI, F. Direct correlation between human herpesvirus 8 seroprevalence and classic Kaposi's sarcoma incidence in Northern Sardinia. **J. Med.Virol.**, New York, v.65, p.368-372, 2001.
- SARMATI, L. Serological testing for human herpesvirus 8. **HERPES**, Worting West Sussex, v.8, n.3, p.76-79, 2001.
- SCHATZ, O.; MONINI, P.; BUGARINI, R.; NEIPEL, F.; SCHULZ, T. F.; ANDREONI, M.; ERB, P.; EGGERS, M.; HAAS, J.; BUTTÒ, S.; LUKWIYA, M.; BOGNER, J. R.; YAGUBOGLU, S.; SHELDON, J.; SARMATI, L.; GOEBEL, F. D.; HINTERMAIER, R.; ENDERS, G.; REGAMEY, N.; WERNLI, M.; STÜRZL, M.; REZZA, G.; ENSOLI, B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serology in Europe and Uganda: Multicentre study with multiple and novel assays. **J. Med. Virol.**, New York, v.65, p.123-132, 2001.
- SCHULZ, T. F. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). **J. Gen. Virol.**, Spencers Wood, v.79, p.1573-1591, 1998.
- SCHULZ, T. F. & MOORE, P. S. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: A new human tumor virus, but how? **Trends Microbiol.**, Oxford, v.7, n.5, p.196-200, 1999.
- SCHULZ, T. F & WEISS, R. A. Kaposi's sarcoma. A finger on the culprit. **Nature**, London, v.373, p.17-18, 1995.
- SHARP, T. V. & BOSHOF, C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: From cell biology to pathogenesis. **IUBMB Life**, London, v.49, p.97-104, 2000.

- SHIMIZU, S.; KATANO, H.; SATA, T.; CHEN, K-R.; TAGAMI, H.; HANABUSA, H.; SHIMIZU, H. Absence of anti-human herpesvirus 8 antibody in 32 Japanese hemophiliacs with advanced HIV infection. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v.293, p.380-381, 2001.
- SIMPSON, G. R.; SCHULZ, T. F.; WHITBY, D.; COOK, P. M.; BOSHOF, C.; RAINBOW, L.; HOWARD, M. R.; GAO, S-J.; BOHENZKY, R. A.; SIMMONDS, P.; LEE, C.; DE RUITER, A.; HATZAKIS, A.; TEDDER, R. S.; WELLER, I. V. D.; WEISS, R. A.; MOORE, P. S. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. **Lancet.**, London, v.348, p.1133-1138, 1996.
- SITAS, F.; CARRARA, H.; BERAL, V.; NEWTON, R.; PHIL, D.; REEVES, G.; BULL, D.; JENTSCH, U.; PACELLA-NORMAN, R.; BOURBOULIA, D.; WHITBY, D.; BOSHOF, C.; WEISS, R. Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.340, n.24, p.1863-1871, 1999.
- SMITH, M. S.; BLOOMER, C.; HOWAT, R.; GOLDSTEIN, E.; CASPARIAN, J. M.; CHANDRAN, B. Detection of human herpesvirus 8 DNA in Kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.176, p.84-93, 1997.
- SMITH, N. A.; SABIN, C. A.; GOPAL, R.; BOURBOULIA, D.; LABBET, W.; BOSHOF, C.; BARLOW, D.; BAND, B.; PETERS, B. S.; DE RUITER, A.; BROWN, D. W. G.; WEISS, R. A.; BEST, J. M.; WHITBY, D. Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, p.600-606, 1999.
- SOSA, C.; KLASKALA, W.; CHANDRAN, B.; SOTO, R.; SIECZKOWSKI, L.; WU, M. H.; BAUM, M.; WOOD, C. Human herpesvirus 8 as a potential

- sexually transmitted agent in Honduras. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.547-551, 1998.
- SOUZA, V. A. U. F.; CONSTANTINE, N.; NASCIMENTO, M. C.; EDELMAN, D.; PANNUTI, C. S.; KETEMA, F.; SAVILLE, R.; BLATTNER, W. Prevalence of antibodies to human herpesvirus type 8 (HHV-8) in high risk populations. **In:** IX th National Meeting of Virology, São Lourenço, MG, 1998. Abstracts H-86. p.115.
- SPIRA, T. J. & JAFFE, H. W. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma. **In:** Emerging Infections 2. SCHELD, CRAIG, HUGHES. Ed. Washington – D.C., 1998, p.81-104.
- SPIRA, T. J.; LAM, L.; DOLLARD, S. C.; MENG, Y-X.; PAU, C. P.; BLACK, J. B.; BURNS, D.; COOPER, B.; HAMID, M.; HUONG, J.; KITE-POWELL, K.; PELLETT, P. E. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. **J. Clin. Microbiol.**, Arbor., v.38, n.6, p.2174-2180, 2000.
- SU, I-J.; HSU, Y-S.; CHANG, Y-C.; WANG, I-W. Herpesvirus-like DNA sequence in Kaposi's sarcoma from AIDS and non-AIDS patients in Taiwan. **Lancet.**, London, v.345, p.722-723, 1995.
- TEDESCHI, R.; DE PAOLI, P.; SCHULZ, T. F.; DILLNER, J. Human serum antibodies to a major defined epitope of human herpesvirus 8 small viral capsid antigen. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.1016-1020, 1999.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington - D.C., v.76, p.4350-4354, 1979.

- VERBEEK, W.; FRANKEL, M.; MILES, S.; SAID, J.; KOEFFLER, H. P. Seroprevalence of HHV-8 antibodies in HIV-positive homosexual men without Kaposi's sarcoma and their clinical follow-up. **Microbiol. Infect. Dis.** v.109, n.6, p.778-783, 1998.
- VIEIRA, J.; HUANG, M-L.; KOELLE, D. M.; COREY, L. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. **J. Virol.**, Washington - D.C., v.71, n.9, p.7083-7087, 1997.
- VITALE, F.; VIVIANO, E.; PERNA, A. M.; BONURA, F.; MAZZOLA, G.; AJELLO, F.; ROMANO, N. Serological and virological evidence of non-sexual transmission of human herpesvirus type 8 (HHV-8). **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.125, p.671-675, 2000.
- WHITBY, D.; LUPPI, M.; BAROZZI, P.; BOSHOF, C.; WEISS, R. A.; TORELLI, G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington - D.C., v.90, n.5, p.395-397, 1998.
- WHITBY, D.; LUPPI, M.; SABIN, C.; BAROZZI, P.; DI BIASE, A. R.; BALLI, F.; CUCCI, F.; WEISS, R. A.; BOSHOF, C.; TORELLI, G. Detection of antibodies to human herpesvirus 8 in Italian children: Evidence for horizontal transmission. **Br. J. Cancer**, Edinburg, v.82, n.3, p.702-704, 2000.
- WHITBY, D.; SMITH, N. A.; MATTHEWS, S.; O'SHEA, S.; SABIN, C. A.; KULASEGARAM, R.; BOSHOF, C.; WEISS, R. A.; DE RUITER, A.; BEST, J. M. Human herpesvirus 8: Seroepidemiology among women and detection in the genital tract of seropositive women. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.234-236, 1999.

- ZAGO, A. M. Identificação do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em pacientes HIV positivos e negativos: Associação com o sarcoma de Kaposi, prevalência e fatores de risco. Vitória, 1999. [Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo]. p.124.
- ZHANG, X-Q.; FITZPATRICK, L.; BADARÓ, R.; BRITES, C.; SAMPAIO, D. P.; SCHOOLEY, R. T. Seroprevalence of HHV 8 in patients with and at risk for Kaposi's sarcoma in the United States and Brazil. **Braz J. Infect. Dis.**, Salvador, v.1 (Supl. 1): S16, 1997.
- ZHANG, X-Q.; FITZPATRICK, L.; CAMPBELL, T. B.; BADARÓ, R.; SCHECHTER, M.; MELO, M. F.; BRITES, C.; SAMPAIO, D. P.; SCHOOLEY, R. T. Comparison of the prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Brazil and Colorado. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.1488-1491, 1998.
- ZHANG, Y-J.; DENG, J.H.; RABKIN, C.S.; GAO, S-J. Hot-spot variations of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent nuclear antigen and application in genotyping by PCR-RFLP. **J. Gen. Virol.**, Spencers Wood, v.81, p. 2049-2058, 2000.
- ZHU, L.; WANG, R.; SWEAT, A.; GOLDSTEIN, E.; HORVAT, R.; CHANDRAN, B. Comparison of human sera reactivities in immunoblots with recombinant human herpesvirus 8 (HHV-8) proteins associated with the latent (ORF 73) and lytic (ORFs 65, K8.1A, and K8.1B) replicative cycles and in immunofluorescence assays with HHV-8-infected BCBL-1 cells. **Virology**, Orlando, v.256, p.381-392, 1999.
- ZIEGLER, J. L. Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. **Lancet**, London, v.342, p.1348-1351, 1993.

ZIEGLER, J. L. & KATONGOLE-MBIDDE, E. Kaposi's sarcoma in childhood: An analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. **Int. J. Cancer**, New York, v.65, p.200-203, 1996.

ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
Lancet, v.348, p.858-861,1996.	LENNETTE <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/10	LANA	HIV+/SK+	47/91(52%)	São Francisco - EUA
					Lítico	HIV+/SK+	87/91(96%)	São Francisco - EUA
					LANA	HIV-/SK+	28/28(100%)	Uganda - África
					Lítico	HIV-/SK+	28/28(100%)	Uganda - África
					LANA	HIV+/SK- HSH	16/71(23%)	São Francisco - EUA
					Lítico	HIV+/SK- HSH	64/71(90%)	São Francisco - EUA
					LANA	HIV+/SK- UDI	0/13	São Francisco - EUA
					Lítico	HIV+/SK- UDI	3/13(23%)	São Francisco - EUA
					LANA	HIV-/SK- DS	0/44	São Francisco - EUA
					Lítico	HIV-/SK- DS	9/44(20%)	São Francisco - EUA
					LANA	HIV-/SK- Mulheres	0/54	São Francisco - EUA
					Lítico	HIV-/SK- Mulheres	15/54(28%)	São Francisco - EUA
					LANA	HIV-/SK- Crianças	0/263	São Francisco - EUA
					Lítico	HIV-/SK- Crianças	10/263(4%)	São Francisco - EUA
					LANA	HIV-/SK-	4/37(11%)	Zimbabue
					Lítico	HIV-/SK-	12/37(32%)	Zimbabue
					LANA	HIV-/SK-	3/52(6%)	Nigéria
					Lítico	HIV-/SK-	29/52(56%)	Nigéria
					LANA	HIV-/SK-	4/16(25%)	Zaire
					Lítico	HIV-/SK-	13/16(81%)	Zaire
					LANA	HIV-/SK-	9/82(11%)	Uganda
					Lítico	HIV-/SK-	63/82(77%)	Uganda
					LANA	HIV-/SK-	11/45(24%)	Gâmbia
					Lítico	HIV-/SK-	38/45(84%)	Gâmbia
					LANA	HIV-/SK-	4/7(57%)	Costa Marfim
					Lítico	HIV-/SK-	7/7(100%)	Costa Marfim
					LANA	HIV-/SK-	0/52	Haiti
					Lítico	HIV-/SK-	15/52(29%)	Haiti

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
Lancet , v.348, p.1133-1138, 1996.	SIMPSON <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/150	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV+/SK+ HIV-/SK+ HIV+/SK- HSH HIV+/SK- Hemof. HIV-/SK- DST-HSH HIV-/SK- DST-Hetero HIV-/SK-DST- Mulheres HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV+/SK- HIV-/SK-	84/103(82%) 17/18(94%) 10/33(30%) 0/26 8/65(12%) 4/75(5%) 2/26(8%) 4/150(3%) 0/117 18/34(53%) 9/17(53%)	Londres - Inglaterra Atenas - Grécia Londres - Inglaterra Londres - Inglaterra Londres - Inglaterra Londres - Inglaterra Londres - Inglaterra Londres - Inglaterra EUA Uganda Uganda
Nature Medicine , v.2, n.8, p.918-924, 1996.	KEDES <i>et al.</i>	BCBL-1 (núcleo)	acetona metanol	1/40	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV-/SK- DS HIV+/SK- DS HIV-/SK- DST HIV+/SK- DST HIV+/SK- Transf. HIV+/SK- Hemof. HIV-/SK- DST Het HIV+/SK- DST Het HIV-/SK- DST HSH HIV+/SK- DST HSH	2/141(1%) 41/138(30%) 10/130(8%) 13/46(28%) 2/44(5%) 9/300(3%) 7/107(7%) 0/9 3/23(13%) 13/37(35%)	São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA São Francisco - EUA
Nature Medicine , v.2, n.8, p.925-928;1996b	GAO <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/20	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV+/SK+ HSH HIV+/SK+ HIV+/SK+ HIV-/SK+ HIV-/SK+ HIV+/SK- Hemof HIV+/SK- HIV-/SK- HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS	35/40(88%) 10/14(71%) 14/18(78%) 11/11(100%) 1/1(100%) 0/20 18/35(51%) 24/47(51%) 0/122 4/107(4%)	EUA Milão - Itália Kampala - Uganda Milão - Itália Kampala - Uganda EUA Kampala - Uganda Kampala - Uganda áveis. HIV-/SK-

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
N. Engl.J.Med. , v.334, n.20, p.1292-1297, 1996.	MILLER <i>et al.</i>	BC-1	acetona-metanol	1/10	Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV+/SK+ HIV+/SK- HIV+/SK+ HIV+/SK- HIV+/SK+ HIV+/SK- HIV+/SK+ HIV+/SK-	31/48(65%) 7/54(13%) 10/14(71%) 0/13 15/23(65%) 3/28(11%) 6/11(55%) 4/13(31%)	Total - EUA Total - EUA Connecticut - EUA Connecticut - EUA Nova York - EUA Nova York - EUA Califórnia - EUA Califórnia - EUA
JAMA , v.277, n.6, p.478-481, 1997.	KEDES <i>et al.</i>	BCBL-1 (núcleo)	acetona metanol	1/40	LANA LANA	HIV+/SK- Mulheres HIV-/SK- Mulheres	12/302(4%) 1/84(1%)	São Francisco - EUA São Francisco - EUA
J. Infect. Dis. , v.176, p.94-102, 1997	KOELLE <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/10	Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV+/SK+ HIV-/SK+ HIV+/SK- HIV-/SK- DS	22/25(88%) 1/1(100%) 11/20(55%) 0/10	Washington - EUA Washington - EUA Washington - EUA Washington - EUA
Lancet , v.349, p.1368, 1997.	GOEDERT <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona metanol	1/40	LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV+/SK- Mulheres HIV-/SK- Mulheres HIV+/SK- Mulheres HIV-/SK- Mulheres HIV+/SK- Crianças HIV-/SK- Crianças	2/118(2%) 1/80(1%) 1/28(4%) 8/63(13%) 0/26 0/158	Nova York - EUA Nova York - EUA Haiti Haiti Nova York - EUA Nova York - EUA
AIDS , v.12, n.5, p.539-540, 1998.	MARCELIN <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA LANA LANA	HIV-/SK+ HIV+/SK+ HIV-/SK-	10/10(100%) 11/14(79%) 2/100(2%)	Paris - França Paris - França Paris - França
AIDS , v.12, n.14, p.1921-1925, 1998.	OLSEN <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/160	LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV+/-/SK- Clín. dermatol HIV+/-/SK- Clín DST HIV+/-/SK- Cuid médicos HIV+/-/SK- Cir ortopédica HIV+/-/SK-total de pac HIV+/-/SK-Equipe méd	13/18(72%) 18/40(45%) 31/62(50%) 23/33(70%) 105/184(57%) 17/27(63%)	Lusaka - Zâmbia Lusaka - Zâmbia Lusaka - Zâmbia Lusaka - Zâmbia Lusaka - Zâmbia Lusaka - Zâmbia

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
Am J. Clin. Pathol , v.109, p.778-783, 1998.	VERBEEK <i>et al.</i>	KS-1	acetona metanol	1/10	Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV+/SK- Total HIV+/SK- Homens HIV+/SK- Mulheres HIV+/SK- HSH HIV+/SK- Bissexuais	42/75(56%) 42/73(58%) 0/2 39/68(57%) 2/4(50%)	Los Angeles - EUA Los Angeles - EUA Los Angeles - EUA Los Angeles - EUA Los Angeles - EUA
Int. J. Cancer , v.77, p.361-365, 1998.	REZZA <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/10	LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico	HIV+/SK- Total HIV+/SK- Total HIV+/SK- HSH HIV+/SK- HSH HIV-/SK- HSH HIV-/SK- HSH HIV-/SK- HSH HIV+/SK- UDI HIV+/SK- UDI HIV-/SK- UDI HIV-/SK- UDI HIV-/SK- UDI	10/69 (15%) 42/69 (61%) 7/18 (39%) 15/18 (83%) 29/112(26%) 72/112(64%) 3/47 (6%) 26/47 (55%) 6/65(9%) 29/65(45%)	Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália
Int. J. Cancer , v.77, p.543-548, 1998.	MELBYE <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/150	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV-/SK-< 25a-HSH HIV-/SK- 25-29a-HSH HIV-/SK- 30-34a-HSH HIV-/SK- 35-39a-HSH HIV-/SK- 40-44a-HSH HIV-/SK- > 45a-HSH HIV+/SK- HSH	10/56(18%) 16/68(24%) 10/45(22%) 8/38(21%) 6/18(33%) 2/21(10%) 6/20(30%)	Dinamarca Dinamarca Dinamarca Dinamarca Dinamarca Dinamarca Dinamarca
Int. J. Cancer , v.77, p.817-820, 1998.	MAYAMA <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/150	LANA	HIV-/SK- Crianças e adolescentes	71/215(33%)	Uganda
J. Clin. Microbiol. , v.36, n.6, p.1784-1786, 1998.	REGAMEY <i>et al.</i>	BC-3	acetona	1/40	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV+/SK+ HIV+/SK- HSH HIV-/SK- HSH HIV+/SK- Hetero HIV-/SK- Hetero HIV+/SK- UDI HIV-/SK- DS HIV-/SK- Total	24/26(92%) 19/63(30%) 11/54(20%) 2/8(25%) 5/68(7%) 0/12 9/178(5%) 25/300(8%)	Suíça Suíça Suíça Suíça Suíça Suíça Suíça Suíça

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
J. Infect. Dis. , v.178, p.547-551, 1998.	SOSA <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/10	Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV+/SK- Mulheres HIV-/SK- Mulheres HIV+/SK- Prostitutas HIV-/SK- Prostitutas HIV+/SK- HSH HIV-/SK- HSH HIV+/SK- Hetero HIV-/SK- Hetero	25/110(23%) 16/141(11%) 9/25(36%) 9/70(13%) 7/20(35%) 0/2 7/30(23%) 3/23(13%)	Honduras Honduras Honduras Honduras Honduras Honduras Honduras Honduras
J. Infect. Dis. , v.178, p.1787-1790, 1998.	HE <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/40	Lítico Lítico	HIV+/SK- Mulheres HIV-/SK- Mulheres	53/103(51%) 130/275(47%)	Zâmbia Zâmbia
J. Infect. Dis. , v.178, p.1791-1794, 1998.	HUDNALL <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/20	Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV-/SK+ HIV+/SK- HIV-/SK- Transp.renal HIV-/SK- saudáveis HIV-/SK- Crianças	6/6(100%) 29/40(73%) 29/58(50%) 2/29(7%) 0/14	Texas - EUA Texas - EUA Texas - EUA Texas - EUA Texas - EUA
J. Natl. Cancer Inst. , v.90, n.5, p.395-397, 1998.	WHITBY <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS	4/107(4%) 6/158(4%) 9/68(13%) 9/71(13%) 6/63(10%) 44/182(24%) 4/38(11%) 21/60(35%) 34/467(7%) 69/280(25%)	Milão - Itália Trieste - Itália E. Romagna - Itália Modena - Itália Perugia - Itália Brindisi - Itália Calabria - Itália Palermo - Itália Norte/Centro - Itália Sul da Itália
Virology , v.249, p.140-149, 1998.	CHANDRAN <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/10	Lítico Lítico Lítico	HIV+/SK+ HIV+/SK- HSH HIV-/SK-	60/62(97%) 23/38(61%) 9/120(8%)	Kansas - EUA Kansas - EUA Kansas - EUA

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
N. Engl. J. Med., v.338, n.14, p.948-954, 1998	MARTIN <i>et al</i>	BCBL-1 (núcleo)	acetona metanol	1/40	LANA	HIV+/-/SK- 25-29 an	47/188(25%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- 30-34 an	73/244(30%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- 35-39 an	49/186(26%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- 40-44 an	32/98(33%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- 45-49 an	14/44(32%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- 50-54 an	7/28(25%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- Brancos	187/672(28%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- Hispânicos	16/42(38%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- Amer afric	10/43(23%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- Outros	8/26(31%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- HSH	188/475(40%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/-/SK- Hetero	0/195	São Francisco – EUA
					LANA	HIV-/SK-	34/393(9%)	São Francisco – EUA
					LANA	HIV+/SK-	189/396(48%)	São Francisco – EUA
Br. J. Cancer, v.81, n.5, p.893-897, 1999.	ABLASHI <i>et al</i>	KS-1	acetona metanol	1/40	Lítico	HIV-/SK+	20/20 (100%)	N. York – EUA
					Lítico	HIV+/SK+	9/10 (90%)	N. York – EUA
					Lítico	HIV-/SK- DS	7/135 (5%)	E.U.A.
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis.	4/108 (4%)	Índia
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis	3/75 (4%)	Tailândia
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis	7/159 (4%)	Malásia
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis	3/80 (4%)	Sri Lanka
					Lítico	HIV-/SK- DS	9/250 (4%)	Jamaica
					Lítico	HIV-/SK- DS	2/160 (1%)	Trindade
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis	24/62 (39%)	Uganda
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis	15/40 (38%)	Zâmbia
					Lítico	HIV-/SK- Saudáveis	26/62 (42%)	Ghana
J. Clin. Microbiol., v.37, n.4, p.1150-1153, 1999.	CATANNI <i>et al</i> .	BC-3	acetona	1/20	LANA	HIV-/SK+	50/50 (100%)	Roma – Itália
					LANA	HIV-/SK-	32/50 (64%)	Roma – Itália
J. Infect. Dis., v.179, p.1591-1592, 1999.	CATERINO-DE-ARAUJO <i>et al</i> .	BCP-1	4% para formaldeído	1/200	LANA	HIV+/SK- HSH	7/23(30%)	S. Paulo – Brasil
					LANA	HIV+/SK- Hetero	3/13(23%)	S. Paulo – Brasil
					LANA	HIV+/SK- UDI	1/10(10%)	S. Paulo – Brasil
					LANA	HIV-/SK- DS	6/81(7%)	S. Paulo – Brasil

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
J. Natl. Cancer Inst. , v.91, n.5, p.465-469, 1999.	ANDREONI <i>et al.</i>	BCBL-1 (núcleo para LANA)	acetona metanol	1/10	LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico	HIV-/SK- <1a HIV-/SK- < 1a HIV-/SK- 1-3a HIV-/SK- 1-3a HIV-/SK- 4-6a HIV-/SK- 4-6a HIV-/SK- 7-9a HIV-/SK- 7-9a HIV-/SK- 10-12a HIV-/SK- 10-12a HIV-/SK- > 12a HIV-/SK- > 12a	3/42(7%) 7/42(17%) 4/40(10%) 15/40(38%) 3/40(8%) 18/40(45%) 4/38(11%) 22/38(58%) 2/36(6%) 19/36(53%) 5/50(10%) 29/50(58%)	Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito Alexandria - Egito
J. Med. Virol. , v.57, p.159-162, 1999	FUJII <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona metanol	1/40	LANA LANA LANA	HIV+/SK- HSH HIV+/SK- Hetero HIV+/SK- Hemof.	20/85(24%) 2/54(4%) 0/118	Japão Japão Japão
J. Natl. Cancer Inst. , v.91, n.17, p.1468-1474, 1999	REZZA <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona metanol	1/5	Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV+/SK- Homens HIV+/SK- Mulheres HIV+/SK- UDI HIV+/SK- HSH	124/279(44%) 16/87(18%) 20/133(15%) 105/171(61%)	Itália Itália Itália Itália
N. Engl. J. Med. , v.340, n.24, p.1863-1871, 1999	SITAS <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA	HIV-+/SK- pac. com diferentes tipos câncer	1196/3293 (36%)	África do Sul
Pediatr. Infect. Dis. J. , v.18, n.9, p.795-799, 1999.	LYALL <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA LANA	HIV+/SK- Crianças HIV-/SK- Crianças	5/70(7%) 1/30(3%)	África África
Virology , v.256, p.381-392, 1999.	ZHU <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/10	LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico	HIV+/SK+ HSH HIV+/SK+ HSH HIV+/SK- HSH HIV+/SK- HSH HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS	87/104(84%) 103/104(99%) 43/77(56%) 58/77(75%) 7/84(8%) 10/84(12%)	Kansas - EUA Kansas - EUA Kansas - EUA Kansas - EUA Kansas - EUA Kansas - EUA

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
Br. J. Dermatol., v.143, p.484-490, 2000.	MASINI <i>et al.</i>	BC-3	acetona	1/80	Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV-/SK- Melanoma HIV-/SK- Não Melanoma HIV-/SK- Naive Atípica HIV-/SK- Psoríase HIV-/SK- Outras HIV-/SK- Imun. latrogên HIV-/SK- Transfusão HIV-/SK- Diálise HIV-/SK- Hepatite	3/30 (10%) 6/14 (43%) 6/17 (35%) 7/46 (15%) 17/141(12%) 5/39(13%) 6/25(24%) 2/4(50%) 9/26(35%)	Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália Roma - Itália
Int. J. Epidemiol., v.29, p.175-179, 2000.	PERNA <i>et al</i>	BCBL-1	acetona	1/120	LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico	HIV+/SK+ DST HIV+/SK+ DST HIV-/SK+ HIV-/SK+ HIV-/SK- HIV-/SK-	15/16 (94%) 16/16 (100%) 14/14 (100%) 14/14 (100%) 6/70 (9%) 14/70 (20%)	Sicília - Itália Sicília - Itália Sicília - Itália Sicília - Itália Sicília - Itália Sicília - Itália
J. Med. Virol., v.62, p.498-504, 2000.	ENBOM <i>et al.</i>	BCP-1 BCBL-1 (núcleo para LANA)	acetona acetona	1/20 1/20	LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico	HIV+/SK+ HIV+/SK+ HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DST HIV-/SK- DST	7/8(88%) 7/8(88%) 1/162(0,6%) 33/162(20%) 4/114(4%) 34/114(30%)	Estocolmo - Suécia Estocolmo - Suécia Estocolmo - Suécia Estocolmo - Suécia Estocolmo - Suécia Estocolmo - Suécia
AIDS, v.14, n.11, p.1647-1653, 2000	REZZA <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona metanol	1/5	Lítico	HIV+/SK- HSH	200/387(52%)	Roma - Itália
Epidemiol. Infect. 125:671-675, 2000.	VITALE <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona	1/120	LANA LANA	HIV-/SK- Freiras catol HIV-/SK- Mulheres	14/51(27%) 15/60(25%)	Palermo - Itália Palermo - Itália
J. Infect. Dis., 181: 1562-1568, 2000.	BIGGAR <i>et al</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA	HIV-/SK- várias tribos indígenas	414/781(53%)	Belém - Brasil

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
Br. J. Cancer , v.82, n.3, p.702-704, 2000.	WHITBY <i>et al.</i>	BCP-1	4 % para formaldeído	1/100	LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA LANA	HIV-/SK- <1a HIV-/SK- 1-2a HIV-/SK- 3-5a HIV-/SK- 6-10a HIV-/SK- 11-15a HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS HIV-/SK- DS - Total	2/57(4%) 4/109(4%) 1/90(1%) 6/94(6%) 3/38(8%) 16/388(4%) 3/76(4%) 6/103(6%) 25/567(4%)	Modena - Itália Modena - Itália Modena - Itália Modena - Itália Modena - Itália Modena - Itália Brindisi - Itália Palermo - Itália Itália
Sex. Trans. Dis. , v.27, n.3, p.159-164, 2000.	REZZA <i>et al.</i>	BCBL-1 (núcleo para LANA)	acetona metanol	1/10	LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico LANA Lítico	HIV-/SK- 5-10a HIV-/SK- 5-10a HIV-/SK- 15-20a HIV-/SK- 15-20a HIV-/SK- 30-40a HIV-/SK- 30-40a HIV-/SK- Total HIV-/SK- Total	25/98(26%) 39/98(40%) 23/97(24%) 50/97(52%) 25/97(26%) 60/97(62%) 73/292(25%) 149/292(51%)	Camarões Camarões Camarões Camarões Camarões Camarões Camarões Camarões
Transp. Proc. , v.32, n.3, p.526-527, 2000.	CATTANI <i>et al.</i>	BC-3	acetona	1/80	Lítico Lítico	HIV-/SK-Pré Transp HIV-/SK-Pós Transp	26/175 (15%) 12/100 (12%)	Sul e Centro Itália
Braz J. Med. Biol. Res. , v.34, n.7, p.879-886, 2001	KELLER <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA Lítico LANA Lítico	HIV+/SK+ HIV+/SK+ HIV+/SK- HIV+/SK-	31/39(80%) 31/39(80%) 5/27(19%) 5/27(19%)	Vitória - Brasil Vitória - Brasil Vitória- Brasil Vitória- Brasil
Emerg. Infect. Dis. , v.7, n.5, p.893-895, 2001.	REZZA <i>et al.</i>	BCBL-1	acetona metanol	1/20	Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico Lítico	HIV-/SK- <25a urb HIV-/SK- < 25a rur HIV-/SK- 25-35a urb HIV-/SK- 25-35a rur HIV-/SK- > 35a urb HIV-/SK- > 35a rur	13/72(18%) 2/11(18%) 3/12(25%) 3/16(19%) 4/10(40%) 12/29(41%)	Papua N. Guiné Papua N. Guiné Papua N. Guiné Papua N. Guiné Papua N. Guiné Papua N. Guiné

Cont. ANEXO A

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	AUTORES	LINHAGEM CELULAR	FIXADOR	DILUIÇÃO DO SORO	IFI	CASUÍSTICA	RESULTADO +/total (%)	LOCALIDADE
J. Natl. Cancer Inst. , v.93, n.3, p.194-202, 2001.	DAVIDOVICI <i>et al.</i>	BCP-1	4% para formaldeído	1/100	LANA	HIV-/SK- Intrafam2-14a	78/906(9%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- 15-24a	53/578(9%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- 25-34a	10/168(6%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- 35-44a	66/518(13%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- 45-54a	20/172(12%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- > 55a	11/61(18%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- Norte África	37/232(16%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- Eur e Amér	12/140(9%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- Total	238/2403(10%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- DS- 35-44a	200/1009(20%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- DS- 45-54a	102/420(24%)	Israel
					LANA	HIV-/SK- DS > 55a	51/202(25%)	Israel
					J. Med. Virol. , v.65,p.368-372, 2001	SANTARELLI <i>et al.</i>	BC-3	acetona metanol
Transplantation , v.71, n.8, p.1120-1124,2001	ALMUNEEF <i>et al.</i>	BC-3	acetona	1/10	Lítico	HIV-/SK-Hom. Hemodial	17/24(71%)	Arábia Saudita
					Lítico	HIV-/SK- Mulh.Hemodial	7/24(29%)	Arábia Saudita
					Lítico	HIV-/SK- Diálise	14/24(58%)	Arábia Saudita
					Lítico	HIV-/SK- Origem Sul	11/24(46%)	Arábia Saudita
					Lítico	HIV-/SK- Origem Riyadh	13/24(54%)	Arábia Saudita
					Lítico	HIV-/SK- Ag HBV +	4/14(29%)	Arábia Saudita
					Lítico	HIV-/SK- HCV +	6/14(43%)	Arábia Saudita

ANEXO B**B.1 - Conjunto de Reagentes do ELISA - ABI**

HHV-8 Ig G Antibody	
ADVANCED BIOTECHNOLOGIES INCORPORATED - Maryland - USA	
Linhagem celular (antígeno)	KS-1 - Lisado viral
Diluição da amostra	1:101 em diluente da amostra - 4x diluir em água deionizada
Tampão de lavagem	Tampão fosfato-tween - 20x diluir em água deionizada
Conjugado	Anti-Ig G humana marcada com peroxidase - pronto para o uso
Substrato	Tetrametilbenzidina - pronto para o uso
Solução de parada	Ácido sulfúrico 1 N - pronto para o uso

ANEXO C**C.1 - Conjunto de Reagentes da I.F.I - ABI**

HHV-8 Ig G IFA Kit	
ADVANCED BIOTECHNOLOGIES INCORPORATED - Maryland - USA	
Linhagem celular (antígeno)	KS-1
Diluição da amostra	1:40 em tampão fosfato pH 7,4
Tampão de lavagem	Tampão fosfato pH 7,4 - 20x diluir em água deionizada
Conjugado	Anti-Ig G humana marcada com fluoresceína - pronta para o uso

ANEXO D

D - Meios de Cultura

D₁ - RPMI-1640

Meio de cultura para a célula BCBL-1

Preparar o meio RPMI-1640 (GIBCO/BRL) de acordo com as especificações do fabricante e acrescentar:

HEPES	10,0 mM
Bicarbonato de sódio	2,0 mg/mL
L-glutamina	2,0 mM
Piruvato de sódio	1,0 mM
Soro fetal bovino inativado (GIBCO/BRL)	10%
Penicilina/estreptomicina (GIBCO/BRL)	100 U/μg/mL
Anfotericina B (GIBCO/BRL)	2,5 μg/mL

Inativar o soro fetal bovino a 56°C por 30 min. Filtrar todos os componentes do meio em filtro MILLIPORE 0.22 μm. Estocar o meio pronto para uso a 4°C.

D₂ - RPMI-1640

Meio de cultura para a célula Ramos

Preparar o meio RPMI-1640 (GIBCO/BRL) de acordo com as especificações do fabricante e acrescentar:

HEPES	10,0 mM
Bicarbonato de sódio	2,0 g/L
L-glutamina	2,0 mM
Piruvato de sódio	1,0 mM
Soro fetal bovino inativado(GIBCO/BRL)	10%
Glicose	3,0 g/L
Penicilina/estreptomicina (GIBCO/BRL)	100U/μg/mL
Anfotericina B (GIBCO/BRL)	2,5 μg/mL

Inativar o soro fetal bovino a 56°C por 30 min. Filtrar todos os componentes do meio em filtro MILLIPORE 0.22 μm. Estocar o meio pronto para uso a 4°C.

D₃ - Eagle

Meio de cultura para a célula Hep2

Preparar o meio essencial Eagle (GIBCO/BRL) de acordo com as especificações do fabricante e acrescentar:

L-glutamina	2,0 mM
Aminoácidos não essenciais	0,1 mM
Piruvato de sódio	1,0 mM
Soro fetal bovino inativado	10%

Inativar o soro fetal bovino a 56°C por 30 min. Filtrar todos os componentes do meio em filtro MILLIPORE 0.22 µm. Estocar o meio pronto para uso a 4°C. As culturas de células Hep2 foram realizadas na Seção de Culturas Celulares do IAL após descongelamento e repique em tubo de vidro inclinado, na proporção 1:11 em meio essencial Eagle, por 24 h a 37°C

ANEXO E**E 1 - Soluções utilizadas nos ensaios de Imunofluorescência Indireta "in house" (IFI-LANA e IFI-Lítico)****E1.1 - PBS (tampão fosfato) pH 7,2 - 10 X concentrado**

Cloreto de sódio (Merck)	81,7 g
Fosfato de sódio dibásico (Merck)	19,8 g
Fosfato de potássio monobásico (Merck)	3,6 g
Água destilada qsp	1.000,0 mL

E1.2 - Solução tampão com carbonato de sódio - 0.5 M

Carbonato de sódio anidro (Merck)	5,3 g
Água destilada qsp	100,0 mL

E1.3 - Solução tampão com bicarbonato de sódio - 0.5 M

Bicarbonato de sódio (Merck)	4,2 g
Água destilada qsp	100,0 mL

E1.4 - Glicerina tamponada para montagem de lâminas

9 partes de glicerina P.A.(ECIBRA) + 1 parte de tampão pH 8,5.

Tampão pH 8,5 = 0,4 mL de E1.2 + 10,0 mL de E1.3. ,medir pH.

E1.5 - Azul de Evans (0,005%)

Azul de Evans	5,0 mg
Tampão fosfato (PBS) pH 7,2	100,0 mL

E1.6 - PBS/leite 1%

Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé)	1,0 g
Tampão fosfato(PBS) pH 7,2	100,0 mL

ANEXO F**F₁ - Soluções utilizadas na Técnica de Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida em sistema descontínuo SDS-PAGE****F_{1.1} - Solução A**

Acrilamida (Sigma)	30,0 g
Bis-acrilamida (Sigma)	0,8 g
Água bidestilada qsp	100,0 mL

Adicionar a água sobre a acrilamida e manter a solução a 56 °C coberta com “parafilm” até a dissolução completa. Filtrar a solução e guardar em frasco escuro. Pode ser conservada durante 3 a 4 meses a 4 °C.

F_{1.2} - Solução B

Trizma base (Sigma)	18,2 g
SDS (20%) (Sigma)	2,0 mL
Água bidestilada qsp	100,0 mL

Adicionar 50 mL de água ao trizma base e acertar o pH para 8,8 com HCl 6 N. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estável durante meses a 4 °C.

F_{1.3} - Solução C

Trizma base (Sigma)	6,1 g
SDS (20%) (Sigma)	2,0 mL
Água bidestilada qsp	100,0 mL

Adicionar 50 mL de água ao trizma base e acertar o pH para 6,8 com HCl 6 N. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estável durante meses a 4 °C.

F_{1.4} - SDS 20% (dodecil sulfato de sódio)

SDS (Sigma)	10,0 g
Água bidestilada qsp	50,0 mL

F_{1.5} - Persulfato de amônio a 10%

Persulfato de amônio (Sigma)	0,5 g
Água bidestilada qsp	5,0 mL
Distribuir em alíquotas e manter congelado a - 20 °C.	

F_{1.6} - Tampão de corrida pH 8,3

Trizma (Sigma)	3,0 g
Glicina (Sigma)	14,4 g
SDS (Sigma)	1,0 g
Água bidestilada qsp	1.000,0 mL

F_{1.7}- Tampão de ruptura 5 vezes concentrado (10 mL)

Trizma (Sigma) 1M (pH 6,8)	0,6 mL
Glicerol (Sigma)	2,5 mL
SDS (Sigma) 20%	1,0 mL
2-mercaptoetanol (Sigma)	0,5 mL
Azul de bromofenol (Sigma) 1%	0,1 mL
Água deionizada qsp	4,4 mL
Distribuir em alíquotas e estocar a - 20 °C.	

F_{1.8} - Gel de separação na concentração de 10 % (10 mL volume necessário para 2 mini géis)

Água bidestilada	4,2 mL
Solução A	3,3 mL
Solução B	2,5 mL
Persulfato de amônio(Sigma)	50 µL
TEMED (Sigma)	5 µL

O preparo do gel de separação foi realizado segundo as normas do fabricante utilizando o sistema para eletroforese mini-protean II (Bio-Rad, Hercules, USA).

F_{1.9} - Gel de empilhamento na concentração de 5% (4 mL volume necessário para 2 mini-géis)

Água bidestilada	2,3 mL
Solução A	0,67 mL
Solução C	1,0 mL
Persulfato de amônio (Sigma)	30,0 µL
TEMED (Sigma)	5,0 µL

O preparo do gel de empilhamento foi realizado segundo as normas do fabricante, utilizando o sistema para eletroforese mini-protean II (Bio-Rad, Hercules, USA).

PORCENTAGEM DO GEL DE AGRILAMIDA							
Soluções p/ 10 mL	7,0%	7,5%	8,0%	9,0%	10,0%	12,0%	12,5%
Água Bidestilada (mL)	5,2	5,0	4,8	4,5	4,2	3,5	3,4
Solução A (mL)	2,3	2,5	2,7	3,0	3,3	4,0	4,2
Solução B (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Persulfato amônio(µL)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
TEMED (µL)	10,0	10,0	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0

F2.0 - Coloração de proteínas com Comassie Blue.

F2.1 - Solução fixadora

Metanol (Merck)	40,0 mL
Ácido acético (Merck)	10,0 mL
Água bidestilada qsp	100,0 mL

F2.2 - Corante Comassie Blue

Comassie Blue R-250 (Sigma)	1,0 g
Metanol (Merck)	450,0 mL
Água bidestilada	450,0 mL
Ácido acético glacial (Merck)	100,0 mL

F2.3 - Solução descorante

Ácido acético glacial (Merck)	70,0 mL
Água destilada qsp	1.000,0 mL

ANEXO G**G₁ - Soluções utilizadas nos ensaios de "Western blotting" (WB-LANA e WB-Lítico)****G_{1.1} - Soluções utilizadas na transferência****G_{1.1.1} - Tampão de transferência pH 8,3**

Tris (Merck)	3,0 g
Glicina (Sigma)	14,4 g
Metanol (Merck)	200,0 mL
Água destilada qsp	1.000,0 mL

G_{1.1.2} - Solução corante utilizada para controle da transferência

Ponceau S (Sigma)	0,5 g
Ácido acético (Merck)	0,1 mL
Água bidestilada qsp	100,0 mL

G_{1.2} - Tampão Tris-salina pH 7,5

Tris (Merck)	1,2 g
Cloreto de sódio (Merck)	9,0 g
Água bidestilada qsp	1.000,0 mL

G_{1.3} - Solução bloqueadora (5%)

Leite desnatado (Molico, Nestlé)	5,0 g
Tris-salina pH 7,5	100,0 mL

Após o preparar, ferver e filtrar a solução.

G_{1.4} - Solução de trabalho (1%)

Diluir a solução bloqueadora na razão 1:5 em Tampão Tris-Salina

G1.5 - Solução corante para revelação da reação

4 cloro 1 naftol (Sigma)	6,0 mg
Metanol (Sigma)	2,0 mL
Tris-Salina pH 7,5	10,0 mL
Água oxigenada pH 7,5	10,0 µL

Dissolver o 4 cloro 1 naftol no metanol. Adicionar o tampão Tris-Salina e, por último, a água oxigenada.

ANEXO H

H₁ – Conjugado utilizado no ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI-LANA e IFI-Lítico)

H_{1.1} - Conjugado anti-IgG humano marcado com fluoresceína (Sigma)

Após titulação foi utilizado na diluição 1:256, em PBS com azul de Evans contendo 1% de leite desnatado.

H₂ - Conjugado utilizado nos ensaios de “Western Blotting” (WB-LANA e WB-Lítico)

H_{2.1} - Conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma)

Após titulação foi utilizado na diluição 1:2.000, em tampão Tris-salina contendo 1% de leite desnatado.

ANEXO I

Quadro 3A. Resultados individuais obtidos com os ensaios de ELISA-ABI, IFI-ABI, IFI-LANA, WB-LANA e IFI-LÍTICO para a pesquisa de anticorpos dirigidos ao HHV-8 em 477 amostras de soro de pacientes com infecção HIV/AIDS, sem sarcoma de Kaposi

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
1-HHS	08/06/94	33/F/Hetero	-	+	-/-	200
2-APF	08/06/94	25/F/UDEV	-	-	-/-	-
3-CRR	08/06/94	21/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
4-EWS	08/06/94	25/M/Hetero	-	-	-/-	-
5-EBB	08/06/94	22/M/Hetero	-	+	-/-	-
6-SRS	09/06/94	27/F/Hetero	+	+++	-/-	-
7-EAV	09/06/94	36/M/Homo	+	+	-/-	-
8-RSL	09/06/94	20/F/Hetero	-	-	-/-	-
9-MAA	09/06/94	24/F/UDEV	-	-	-/-	-
10-IRC	13/06/94	24/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
11-JPN	13/06/94	29/M/Homo	+	+	-/-	200
12-LCU	13/06/94	38/M/Hetero	-	-	-/-	-
13-HBA	13/06/94	30/M/UDEV	-	-	-/-	200
14-LAM	13/06/94	31/M/Hetero	-	-	-/-	-
15-JAN	13/06/94	35/F/Hetero	-	-	-/-	-
16-SRC	13/06/94	28/M/Desc	-	-	-/-	-
17-SLS	13/06/94	31/M/UDEV	-	-	-/-	-
18-WRC	13/06/94	23/M/Desc	-	+	-/-	-
19-MOC	14/06/94	28/M/Bis	-	+++	-/-	100
20-JW	14/06/94	50/M/Homo	-	-	-/-	-
21-EA	14/06/94	27/M/UDEV	-	-	-/-	-
22-AAP	14/06/94	36/M/Homo	-	-	-/-	-
23-JCS	14/06/94	22/M/UDEV	-	++	-/-	-
24-MBS	14/06/94	29/F/Hetero	-	+	-/-	-
25-VCS	15/06/94	23/F/Hetero	-	-	-/-	-
26-PADR	15/06/94	34/M/Bis	-	-	-/-	-
27-JS	15/06/94	32/M/Bis	-	++	-/-	-
28-EPP	15/06/94	24/M/Homo	+	+++	-/-	-
29-MRS	15/06/94	40/F/Hetero	-	+	-/-	-
30-JAP	15/06/94	30/M/Homo	-	-	-/-	-
31-ALG	15/06/94	29/F/Hetero	-	++	-/-	-
32-JCMR	15/06/94	43/M/Hetero	-	-	-/-	-
33-AAIS	15/06/94	22/F/UDEV	-	-	-/-	-
34-MAO	15/06/94	19/F/Hetero	-	-	-/-	-
35-AGL	15/06/94	32/M/Bis	+	++++	3.200/+	800
36-FAP	15/06/94	31/M/Hetero	-	-	-/-	-
37-MAAS	15/06/94	34/M/Hetero	-	-	-/-	-
38-MCS	15/06/94	25/F/Hetero	-	-	-/-	-
39-AT	15/06/94	32/M/Homo	-	-	-/-	-
40-FON	16/06/94	35/M/Hetero	-	-	-/-	-
41-MFGO	16/06/94	30/F/Hetero	+	++++	800/+	800
42-EF	16/06/94	32/M/Homo	-	+++	-/-	-
43-RLA	16/06/94	27/M/Homo	-	+	100/-	200
44-UV	16/06/94	54/M/Hetero	-	-	-/-	-
45-ALL	16/06/94	22/M/UDEV	-	-	-/-	-
46-SM	16/06/94	32/F/Hetero	-	+	-/-	-
47-MNO	17/06/94	45/F/Hetero	-	-	-/-	-
48-TMS	17/06/94	35/M/Hetero	-	-	-/-	-
49-MAA	17/06/94	37/F/Hetero	-	-	-/-	-

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
50-MAI	17/06/94	31/F/Hetero	+	+	-/-	-
51-TRA	17/06/94	16/F/Hetero	-	+	-/-	-
52-VR	17/06/94	52/F/TS	-	-	-/-	-
53-JDM	17/06/94	30/M/Homo	-	-	-/-	-
54-DO	17/06/94	33/M/UDEV	-	+	-/-	-
55-JLF	17/06/94	26/M/UDEV	-	-	-/-	-
56-PET	17/06/94	35/M/Desc	-	+	-/-	-
57-RFC	17/06/94	37/F/Hetero	-	+	-/-	-
58- CFA	20/06/94	28/F/Hetero	-	+	-/-	-
59-NSBC	20/06/94	38/F/Hetero	-	-	-/-	-
60-CJL	20/06/94	33/M/Homo	+	+++	800/+	200
61-AGC	20/06/94	30/M/TS	-	-	-/-	-
62-DS	20/06/94	31/M/Homo	+	++	-/-	-
63-IMF	20/06/94	47/M/Homo	+	+++	50/-	-
64-MJ	20/06/94	38/F/Hetero	-	-	-/-	-
65-AJC	21/06/94	31/M/Desc	-	+	-/-	-
66-ABFS	21/06/94	32/M/Desc	-	+	-/-	-
67-RLG	21/06/94	31/M/UDEV	-	-	-/-	-
68-MJCS	21/06/94	28/F/Hetero	-	+	-/-	-
69-RRS	21/06/94	33/M/Hetero	-	-	-/-	-
70-VLS	22/06/94	47/F/Hetero	-	-	-/-	-
72-EAC	22/06/94	23/M/Desc	-	-	-/-	-
73-NPN	22/06/94	35/M/Homo	-	+	-/-	-
74-MJR	22/06/94	25/F/Desc	+	+++	-/-	-
75-NPO	22/06/94	37/M/Homo	-	-	-/-	-
76-JPN	23/06/94	55/M/UDEV	-	-	-/-	-
77-SCT	23/06/94	30/M/UDEV	-	+	-/-	-
78-JRR	23/06/94	36/M/Hetero	+	+++	-/-	-
79-SAE	23/06/94	25/M/Homo	-	-	-/-	-
81-JDC	23/06/94	30/F/UDEV	-	++	-/-	-
82-JMM	23/06/94	28/M/Bis	-	+	-/-	-
83-JGCN	23/06/94	26/M/Bis	+	++++	400/+	200
84-MACo	24/06/94	25/M/Hetero	-	++	-/-	100
85-FRDM	24/06/94	26/M/UDEV	-	+	-/-	-
86-RCV	24/06/94	29/M/Homo	+	+++	200/+	400
87-CMF	24/06/94	38/F/Hetero	-	+++	-/-	-
88-MLD	27/06/94	21/F/Hetero	-	-	-/-	-
89-RMS	27/06/94	22/F/Hetero	-	+++	-/-	400
90-DPL	27/06/94	31/M/Homo	+	++++	-/-	200
91-ARO	27/06/94	27/M/Homo	-	-	-/-	-
92-RCVM	27/06/94	24/F/UDEV	-	-	-/-	-
93-COS	27/06/94	26/M/Homo	+	+++	-/-	200
94-EGS	28/06/94	34/M/Hetero	-	+	-/-	-
95-MAS	28/06/94	38/M/Homo	-	-	-/-	-
97-WB	28/06/94	34/M/Homo	+	++	400/+	-
98-ARBS	28/06/94	25/F/Hetero	-	+	-/-	-
101-MRCS	29/06/94	20/M/Desc	+	++	-/-	-
102-GSL	29/06/94	24/F/Hetero	-	-	-/-	-
103-TAR	29/06/94	25/F/Hetero	-	-	-/-	-
104-RSQ	30/06/94	29/M/Hetero	-	+	-/-	-
105-IFS	30/06/94	33/F/Hetero	-	-	-/-	-
106-RVS	30/06/94	30/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
107-MS	30/06/94	33/F/UDEV	-	+	-/-	-
108-LGC	30/06/94	27/M/Desc	+	+++	200/+	400

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
109-SJC	01/07/94	41/M/Hetero	-	++	-/-	-
110-MAS	01/07/94	38/M/Homo	-	+	-/-	-
112-LCCJr	01/07/94	25/M/UDEV	-	+	-/-	-
113-AFD	01/07/94	37/M/Hetero	-	+	-/-	-
114-GSS	04/07/94	43/M/Bis	+	+++	200/+	-
115-NRC	04/07/94	38/M/Hetero	-	++	-/-	-
116-CJO	04/07/94	37/M/UDEV	-	-	-/-	-
117-RH	04/07/94	26/M/Homo	-	-	-/-	-
118-LMO	04/07/94	28/M/Homo	+	+++	100/+	200
119-IFA	04/07/94	37/F/Hetero	-	-	-/-	-
120-WVR	04/07/94	25/M/Hetero	-	+	-/-	-
121-CJKS	05/07/94	23/F/Hetero	-	-	-/-	-
122-ARS	05/07/94	23/F/TS	-	+	-/-	-
123-FPC	05/07/94	49/M/Hetero	+	++++	-/-	1.600
124-AFF	05/07/94	18/F/Hetero	-	-	-/-	-
125-SAD	05/07/94	27/F/UDEV	-	+	-/-	-
126-HLL	05/07/94	30/F/Hetero	-	-	-/-	-
127-ACC	05/07/94	20/F/Desc	+	-	-/-	-
128-LCS	05/07/94	21/M/UDEV	-	++	-/-	-
129-GSA	05/07/94	23/F/Homo	-	-	-/-	-
130-ALS	06/07/94	26/F/UDEV	-	-	-/-	-
131-SFBN	06/07/94	38/M/Homo	-	-	-/-	-
132-CNS	06/07/94	30/M/UDEV	-	-	-/-	-
133-DLS	06/07/94	48/M/Hetero	-	-	-/-	-
134-ARL	06/07/94	24/M/UDEV	-	-	-/-	-
135-ACS	06/07/94	27/F/Hetero	-	-	-/-	-
136-EA	06/07/94	36/M/Hetero	-	+	-/-	-
137-SOE	06/07/94	36/M/Hetero	+	++	-/-	800
138-MMM	06/07/94	22/M/UDEV	-	+++	-/-	-
139-MNO	06/07/94	45/F/Hetero	-	+	-/-	-
140-JOM	07/07/94	34/M/Homo	+	++++	-/-	3.200
141-VOC	07/07/94	36/M/Homo	-	++	50/+	-
142-VAP	07/07/94	34/M/Homo	-	-	-/-	-
143-OAA	07/07/94	27/M/Hetero	-	+	-/-	-
144-MAV	07/07/94	40/M/Hetero	-	+++	-/-	-
145-MCF	07/07/94	40/F/Desc	-	+	-/-	-
146-NGD	07/07/94	41/F/Hetero	-	++	-/-	-
147-AAF	08/07/94	33/F/TS	-	-	-/-	-
148-AAF	08/07/94	39/M/Homo	-	+	-/-	-
149-CR	08/07/94	35/F/Hetero	+	++	-/-	200
150-JC	11/07/94	18/M/Desc	-	-	-/-	-
151-AJES	11/07/94	30/M/Desc	+	+++	-/-	-
154-SS	11/07/94	21/F/Hetero	-	-	-/-	-
155-VMS	12/07/94	23/F/Hetero	-	-	-/-	-
156-MCR	12/07/94	23/F/Hetero	-	+	-/-	-
157-AM	12/07/94	33/M/Homo	-	+++	-/-	200
158-LC	12/07/94	30/M/UDEV	-	++	-/-	-
159-CAT	12/07/94	36/M/Bis	-	++	-/-	-
160-ASL	13/07/94	17/M/UDEV	-	++++	-/-	200
161-SAS	13/07/94	53/M/Desc	-	+	-/-	-
162-OPS	13/07/94	31/M/Hetero	-	+	-/-	-
163-RF	13/07/94	31/M/UDEV	-	-	-/-	200
164-USM	13/07/94	21/M/UDEV	-	++	-/-	-
165-JMS	13/07/94	51/M/Bis	+	++++	-/-	400

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
166-YA	14/07/94	33/M/Hetero	-	+++	-/-	200
167-LCS	14/07/94	46/F/Hetero	-	-	-/-	-
168-BSR	14/07/94	38/M/Homo	+	+++	800/+	200
169-ELS	14/07/94	31/M/Hetero	+	++++	-/-	200
170-ICS	14/07/94	31/F/Hetero	-	++	-/-	-
171-EF	14/07/94	42/F/Hetero	-	++	-/-	-
172-RFS	15/07/94	29/M/Desc	-	+	-/-	-
173-JHC	15/07/94	19/M/UDEV	-	-	-/-	-
174-IGF	15/07/94	46/F/Hetero	-	+++	-/-	-
175-VSR	15/07/94	35/F/Hetero	-	+	-/-	-
176-JBF	15/07/94	43/M/Hetero	-	+	-/-	-
178-MT	15/07/94	24/M/Hetero	-	++	-/-	-
180-MT	15/07/94	33/F/Hetero	-	+	-/-	-
181-PET	15/07/94	35/M/Hetero	-	+	-/-	-
182-NMO	15/07/94	34/F/Hetero	-	-	-/-	-
183-JÁ	15/07/94	30/M/UDEV	-	-	-/-	-
184-CMSS	15/07/94	30/F/Desc	-	+	-/-	-
185-JAS	15/07/94	19/M/Homo	+	+++	800/+	-
186-MRF	15/07/94	33/F/Desc	-	++	-/-	-
187-TCS	18/07/94	30/F/Desc	-	-	-/-	-
189-RGS	18/07/94	33/M/Desc	-	-	-/-	-
190-ERS	18/07/94	22/M/Homo	-	+	-/-	1.600
191-JAS	18/07/94	41/M/Hetero	+	++++	-/-	3.200
193-MAJV	19/07/94	33/F/Desc	-	-	-/-	-
194-MA	19/07/94	26/M/Hetero	-	+	-/-	-
195-MHG	19/07/94	37/F/Hetero	-	-	-/-	-
196-RRS	19/07/94	33/M/Hetero	-	+	-/-	-
197-RG	19/07/94	35/M/Hetero	-	++	-/-	-
198-RMS	19/07/94	27/F/Hetero	-	-	-/-	-
199-RAR	19/07/94	13/F/TS	-	+	-/-	-
200-ICBS	19/07/94	34/F/Hetero	-	-	-/-	-
201-MTP	19/07/94	28/M/Homo	-	-	-/-	-
202-CM	19/07/94	22/M/Homo	-	+	-/-	-
203-CIS	19/07/94	36/M/Homo	+	+++	-/-	100
204-MZSC	20/07/94	25/F/Hetero	-	++	-/-	-
205-ATF	20/07/94	30/M/Hetero	-	++	-/-	-
206-JJL	20/07/94	25/M/Homo	-	+	-/-	-
207-DBS	20/07/94	26/M/Hetero	+	+	-/-	-
208-MEC	20/07/94	28/M/UDEV	-	++	-/-	-
209-WBP	20/07/94	31/M/Desc	-	+++	-/-	-
210-SKL	20/07/94	36/M/Desc	+	++++	-/-	800
211-DPS	20/07/94	48/M/Hetero	-	++	-/-	-
212-LAS	20/07/94	28/M/Hetero	-	-	-/-	-
213-MLA	21/07/94	29/F/Hetero	-	+++	400/-	-
214-JLTM	21/07/94	46/M/Desc	+	++++	-/-	400
215-PSS	21/07/94	25/M/Homo	-	++	-/-	-
216-ICL	21/07/94	33/M/Homo	-	++	50/-	-
217-IAL	21/07/94	30/M/Hetero	-	+++	-/-	-
218-SFS	21/07/94	18/F/Hetero	-	++	-/-	-
219-EAC	21/07/94	23/M/Hetero	-	++	-/-	-
220-HAS	22/07/94	28/M/Hetero	-	+++	-/-	-
221-ALR	22/07/94	20/M/Homo	-	+++	-/-	-
222-PLLL	22/07/94	28/M/Hetero	+	++++	-/-	400
223-JGA	22/07/94	21/M/Hetero	-	-	-/-	-

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
225-AG	22/07/94	28/M/Hetero	-	+	-/-	-
226-SPS	22/07/94	27/F/Hetero	-	+	-/-	-
227-JBC	22/07/94	28/M/Hetero	-	+	-/-	-
228-FMF	22/07/94	28/M/hetero	-	-	-/-	-
229-RJN	22/07/94	24/F/Hetero	-	+	-/-	-
230-GPGR	22/07/94	33/M/UDEV	-	-	-/-	-
231-AO	22/07/94	30/M/Homo	-	-	-/-	-
232-JAM	22/07/94	26/M/Hetero	-	+	-/-	-
233-LSG	22/07/94	24/F/Hetero	-	+	-/-	-
235-LS	26/07/94	30/F/Hetero	-	-	-/-	-
236-PFO	26/07/94	36/M/Hetero	-	++	-/-	-
238-LDD	26/07/94	38/M/Hetero	+	++	-/-	-
239-IF	26/07/94	40/M/Homo	+	++	-/-	-
241-LGBG	26/07/94	32/F/Hetero	-	-	-/-	-
242-CJ	26/07/94	17/M/Homo	-	-	-/-	-
243-CAS	26/07/94	23/M/Homo	-	+	-/-	-
244-IL	26/07/94	40/M/Homo	-	++	-/-	-
247-ALC	27/07/94	26/M/Hetero	-	-	-/-	-
248-MLP	27/07/94	39/F/Hetero	-	+	-/-	-
249-JVT	27/07/94	25/M/Homo	+	+++	-/-	400
251-ZRN	27/07/94	39/F/Hetero	-	-	-/-	-
252-VLP	27/07/94	26/F/Hetero	-	++	-/-	-
253-JJF	28/07/94	24/M/Homo	-	+	-/-	-
254-MCC	28/07/94	37/F/Hetero	-	+	-/-	-
255-LRS	28/07/94	55/F/Hetero	-	++	-/-	-
256-JGD	28/07/94	27/M/Hetero	-	+	-/-	-
257-VAV	28/07/94	32/M/Homo	-	++	-/-	-
258-NGS	28/07/94	33/M/UDEV	-	++	-/-	-
259-LPS	28/07/94	27/M/Homo	+	++++	-/-	1.600
260-ECT	28/07/94	32/M/Hetero	+	+++	-/-	-
261-SFS	28/07/94	34/F/Hetero	-	+++	-/-	-
262-DCB	28/07/94	36/M/UDEV	-	+++	-/-	-
263-LCT	29/07/94	34/M/Hetero	-	+++	-/-	-
264-MBR	29/07/94	25/M/Hetero	-	-	-/-	-
265-RTAJ	29/07/94	25/M/Hetero	-	+	-/-	-
266-VFB	29/07/94	31/M/Hetero	-	-	-/-	-
267-IF	01/08/94	43/M/Bis	+	++++	-/-	3.200
268-SPL	01/08/94	43/M/Desc	-	+	-/-	-
269-AASF	01/08/94	24/F/Hetero	-	-	-/-	-
272-MLC	01/08/94	25/F/Hetero	-	+	-/-	-
273-CLB	01/08/94	29/F/UDEV	-	+	-/-	-
274-IMM	01/08/94	25/F/Hetero	-	-	-/-	-
276-JRM	02/08/94	25/M/Homo	+	NR	1.600/+	-
277-SMN	02/08/94	26/M/UDEV	-	NR	-/-	-
278-MLP	02/08/94	33/F/Hetero	-	NR	-/-	-
280-SMS	02/08/94	17/F/Hetero	-	NR	-/-	-
281-RAO	02/08/94	29/M/UDEV	-	NR	-/-	-
282-ÉDA	02/08/94	35/M/Homo	-	NR	-/-	-
283-JAP	03/08/94	29/F/Hetero	-	NR	-/-	400
284-ATN	03/08/94	37/M/Hetero	-	NR	-/-	3.200
285-EJR	03/08/94	44/F/Hetero	-	NR	-/-	1.600
286-RD	03/08/94	29/M/Homo	-	NR	-/-	1.600
288-DS	03/08/94	28/M/Bis	-	NR	-/-	200
289-WRLL	04/08/94	29/M/UDEV	-	NR	-/-	-

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
290-MFC	04/08/94	33/F/Hetero	-	NR	-/-	-
291-JSA	04/08/94	20/M/Homo	-	NR	-/-	200
293-CAM	04/08/94	06/F/Hetero	-	NR	-/-	-
294-CRM	04/08/94	27/M/Hetero	-	NR	-/-	-
296-RFA	04/08/94	29/M/Hetero	-	NR	-/-	-
297-RAC	04/08/94	30/F/UDEV	-	NR	-/-	-
298-DMF	04/08/94	40/F/Hetero	-	NR	-/-	-
299-LCB	04/08/94	23/M/Bis	-	NR	-/-	-
300-AIS	04/08/94	32/M/Homo	-	NR	-/-	-
301-JSA	05/08/94	31/M/Bis	-	NR	-/-	-
302-MFTR	05/08/94	49/M/Homo	+	NR	-/-	100
303-LCA	05/08/94	39/M/Bis	+	NR	100/+	25.600
304-CHC	05/08/94	37/M/Bis	+	NR	-/-	800
305-AS	05/08/94	24/M/Hetero	-	NR	-/-	-
306-MSP	05/08/94	24/M/Hetero	-	NR	-/-	-
307-MEC	05/08/94	28/M/UDEV	-	NR	-/-	-
309-ESP	05/08/94	34/M/UDEV	-	NR	-/-	-
310-MPM	05/08/94	44/M/Hetero	+	NR	50/-	1.600
311-GSA	05/08/94	27/M/Hetero	+	NR	-/-	200
312-SLM	05/08/94	26/M/Hetero	-	NR	-/-	-
313-NCO	05/08/94	43/M/Hetero	-	NR	-/-	-
314-APS	08/08/94	26/F/Hetero	-	NR	-/-	-
315-MHC	08/08/94	26/F/UDEV	-	NR	-/-	-
316-AB	08/08/94	24/M/Homo	-	NR	-/-	-
317-CML	08/08/94	32/F/Hetero	-	NR	-/-	-
318-DPS	09/08/94	23/F/Hetero	+	NR	-/-	100
319-SSFP	09/08/94	32/F/Hetero	-	NR	-/-	-
321-CHA	10/08/94	34/M/Desc	-	NR	-/-	-
322-EGG	10/08/94	20/M/Homo	-	NR	-/-	-
323-LMO	10/08/94	28/M/Homo	+	NR	100/+	-
325-LBS	10/08/94	35/F/Hetero	-	NR	-/-	-
326-SS	10/08/94	42/M/Homo	-	NR	-/-	-
327-MAS	10/08/94	35/F/Hetero	-	NR	-/-	-
328-ACMJ	10/08/94	26/M/Hetero	-	NR	-/-	-
331-ZIS	10/08/94	32/M/Homo	-	NR	-/-	12.800
333-JBR	11/08/94	42/M/Bis	-	NR	-/-	-
334-EFS	11/08/94	38/M/Desc	-	+	-/-	-
336-JAA	11/08/94	51/M/Hetero	-	-	-/-	100
338-LAN	11/08/94	27/M/Homo	-	++	-/-	-
339-TRS	12/08/94	39/M/Hetero	-	+	-/-	-
340-RV	12/08/94	30/F/Hetero	-	++	-/-	-
341-JCR	12/08/94	26/M/Homo	-	+	-/-	-
342-GMS	12/08/94	29/M/Hetero	-	+	-/-	-
343-ACDR	12/08/94	28/M/UDEV	-	+	-/-	-
344-ACO	12/08/94	23/M/Hetero	-	-	-/-	-
345-MGRS	12/08/94	24/F/Hetero	-	++	-/-	-
346-VC	12/08/94	31/F/Hetero	-	-	-/-	-
348-JR	15/08/94	45/M/Desc	-	-	-/-	-
351-FAZ	15/08/94	38/M/Hetero	-	+	-/-	-
353-ECS	15/08/94	24/F/UDEV	-	+	-/-	100
354-JCN	15/08/94	30/M/UDEV	+	++	-/-	-
355-DABB	16/08/94	26/M/UDEV	-	+	-/-	-
357-EBA	16/08/94	32/F/Hetero	-	-	-/-	-
358-EGS	16/08/94	29/M/Homo	-	++	-/-	-

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
361-CFG	16/08/94	45/M/TS	-	-	-/-	-
362-ZVA	17/08/94	37/F/UDEV	-	+	-/-	-
363-NSBC	17/08/94	36/F/Hetero	-	-	-/-	-
364-CPP	17/08/94	32/M/Hetero	-	-	-/-	-
365-MFP	17/08/94	41/M/UDEV	-	+	-/-	-
367-RGB	17/08/94	41/M/Hetero	-	-	-/-	-
368-NCF	17/08/94	32/F/Hetero	-	-	-/-	-
369-LHDR	17/08/94	31/M/UDEV	-	+	-/-	-
372-AFC	18/08/94	25/M/Homo	-	-	-/-	-
373-EBB	18/08/94	55/M/Homo	+	+++	-/+	100
374-JLTMV	18/08/94	46/M/Desc	+	+++	-/-	200
375-AP	18/08/94	44/F/UDEV	-	-	-/-	-
376-JRSN	18/08/94	22/M/Homo	+	+++	-/-	200
377-LM	18/08/94	23/F/UDEV	-	+	-/-	-
378-ERL	18/08/94	24/F/UDEV	-	++	-/-	-
379-SCV	18/08/94	31/F/Hetero	-	++	-/-	-
381-AES	18/08/94	39/F/Desc	-	+	-/-	-
382-VP	18/08/94	65/M/Hetero	-	-	-/-	-
383-DCB	18/08/94	45/F/Hetero	-	+	-/-	-
384-MRC	18/08/94	32/F/Hetero	-	-	-/-	-
386-MECM	18/08/94	38/M/Bis	-	-	-/-	-
387-VAM	18/08/94	36/M/Homo	+	++++	400/+	-
388-CLOC	19/08/94	27/F/UDEV	-	-	-/-	-
389-RM	19/08/94	33/F/Hetero	+	++	-/-	200
390-IMM	19/08/94	33/F/Desc	-	-	-/-	-
391-EAA	19/08/94	37/F/UDEV	-	+	-/-	-
392-GEP	19/08/94	35/M/UDEV	-	-	-/-	-
393-MJF	19/08/94	34/F/Hetero	-	+++	-/-	100
394-GDL	19/08/94	29/M/Hetero	-	-	-/-	-
395-CG	19/08/94	26/F/Hetero	-	+	-/-	-
396-VDS	19/08/94	24/M/Hetero	+	++++	-/-	-
397-JS	19/08/94	33/M/Desc	-	-	-/-	-
398-LFS	19/08/94	35/M/Desc	-	+	-/-	-
400-JAO	19/08/94	28/M/UDEV	-	-	-/-	-
401-ASC	19/08/94	32/M/UDEV	-	+	-/-	-
404-MAF	19/08/94	23/M/Desc	-	+	-/-	-
405-CRRS	22/08/94	29/F/UDEV	-	+	-/-	-
406-RAAB	22/08/94	30/F/UDEV	-	-	-/-	-
407-SCC	22/08/94	18/F/Hetero	+	-	-/-	-
408-RMB	22/08/94	20/F/Hetero	-	-	-/-	-
409-MAB	22/08/94	34/M/Hetero	-	-	-/-	-
410-RMP	22/08/94	33/F/Hetero	-	-	-/-	-
412-RRM	22/08/94	16/M/UDEV	-	-	-/-	-
413-JVS	22/08/94	51/M/Homo	+	++++	-/-	400
414-LC	22/08/94	30/M/Hetero	-	-	-/-	-
415-GDP	22/08/94	37/M/UDEV	-	+	-/-	-
416-LMB	23/08/94	49/M/Hetero	+	++	-/-	-
417-MAS	23/08/94	36/F/Hetero	-	-	-/-	-
418-RLG	23/08/94	31/M/UDEV	-	-	-/-	-
419-MRB	23/08/94	33/F/Hetero	-	++	-/-	-
421-VO	23/08/94	36/M/Bis	+	+++	800/+	-
422-GOS	23/08/94	26/F/Hetero	-	-	-/-	-
423-ADB	23/08/94	28/F/Hetero	-	-	-/-	-
424-NC	23/08/94	36/M/Homo	-	-	-/-	-

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
426-RF	23/08/94	35/M/Homo	+	+++	800/+	1.600
428-EAS	23/08/94	21/F/Hetero	-	-	-/-	-
429-FAZ	23/08/94	29/M/Hetero	-	-	-/-	-
430-CSR	23/08/94	31/F/Hetero	-	-	-/-	-
431-SACA	23/08/94	45/F/Hetero	-	-	-/-	-
432-IAS	23/08/94	29/M/UDEV	-	+	-/-	-
433-MM	24/08/94	36/M/Homo	-	-	-/-	-
434-RPA	24/08/94	52/M/Homo	+	++	-/-	-
435-EPS	24/08/94	25/F/Hetero	+	++	-/-	3.200
436-OMB	24/08/94	36/M/Hetero	-	+	-/-	1.600
437-RJF	24/08/94	33/F/UDEV	-	+	-/-	-
438-JRO	24/08/94	38/M/UDEV	-	+	-/-	-
439-NMS	24/08/94	31/M/Homo	-	-	-/-	-
441-DLP	24/08/94	39/M/UDEV	-	+	-/-	-
444-FCN	25/08/94	42/M/Homo	+	++	-/-	100
445-LAM	25/08/94	34/M/Hetero	-	++	-/-	-
446-OJS	25/08/94	43/M/Homo	-	NR	-/-	-
448-MRWD	25/08/94	36/F/Hetero	-	NR	100/+	-
449-MC	25/08/94	29/M/Homo	-	NR	-/-	-
450-DAS	25/08/94	27/M/UDEV	-	NR	-/-	-
451-FJR	25/08/94	33/M/Hetero	-	NR	-/-	-
452-WJR	25/08/94	18/M/Homo	+	NR	-/-	400
453-ANS	25/08/94	64/M/Hetero	+	NR	-/-	1.600
454-JFS	25/08/94	34/M/Hetero	-	NR	-/-	-
455-DMM	25/08/94	36/F/Hetero	-	NR	-/-	-
456-AOSS	25/08/94	22/F/Desc	-	NR	-/-	-
458-GS	25/08/94	38/M/Homo	-	NR	-/-	-
459-IRL	25/08/94	46/M/Homo	-	NR	-/-	-
460-JER	25/08/94	29/M/Desc	+	NR	-/-	-
461-ACA	25/08/94	35/M/Homo	+	NR	-/-	25.600
462-JCS	30/08/94	28/M/Homo	-	NR	-/-	-
463-EB	30/08/94	44/M/Desc	-	NR	-/-	-
466-FAR	30/08/94	29/F/Hetero	-	NR	-/-	-
467-SM	30/08/94	26/M/Hetero	-	NR	-/-	-
468-CLS	30/08/94	28/M/Desc	-	NR	-/-	3.200
469-MAC	30/08/94	40/M/Hetero	-	NR	-/-	-
470-LGF	31/08/94	41/M/Homo	+	NR	100/+	-
471-WOC	31/08/94	27/M/UDEV	-	NR	-/-	-
472-EGC	31/08/94	41/M/UDEV	-	NR	-/-	-
473-JCB	31/08/94	27/M/Homo	-	NR	-/-	-
474-LLS	31/08/94	32/M/Homo	-	NR	-/-	-
476-INR	31/08/94	38/M/Hetero	-	NR	-/-	-
477-DMT	31/08/94	44/M/Homo	-	NR	-/-	-
478-EAB	31/08/94	59/M/Hetero	+	NR	-/-	-
479-PSS	01/09/94	43/M/Hetero	+	NR	-/-	6.400
480-WMR	01/09/94	32/M/UDEV	-	NR	-/-	-
481-RAM	01/09/94	26/M/Desc	-	NR	-/-	-
482-JMM	01/09/94	26/M/Homo	-	NR	-/-	-
483-EAS	01/09/94	25/F/Hetero	-	NR	-/-	-
484-AAS	01/09/94	30/M/Desc	-	NR	-/-	-
486-BEM	01/09/94	25/F/Hetero	-	NR	-/-	-
487-SC	01/09/94	47/M/Homo	+	NR	-/-	200
491-MMP	02/09/94	52/M/Hetero	-	NR	-/-	-
494-ELC	02/09/94	22/F/Hetero	-	NR	-/-	-

Cont. Quadro 3A

PACIENTE N. - NOME	DATA	ID/SEXO/RISCO	ELISA- ABI*	IFI- ABI*	IFI-LANA WB-LANA*	IFI- LÍTICO*
496-EHA	02/09/94	30/M/UDEV	+	NR	-/-	800
497-MTS	02/09/94	24/F/Hetero	-	NR	-/-	-
498-GCS	02/09/94	29/M/Homo	-	NR	-/-	-
499-ERS	02/09/94	26/M/Hetero	-	NR	-/-	-
500-MS	02/09/94	25/M/Hetero	-	NR	-/-	-
501-MLPS	05/09/94	43/F/Hetero	-	NR	-/-	-
502-AMM	05/09/94	36/F/Hetero	-	NR	-/-	-
503-CMS	05/09/94	42/F/Desc	-	NR	-/-	-
504-LFS	05/09/94	32/F/Hetero	-	NR	-/-	-
505-OFS	06/09/94	37/M/Bis	-	NR	-/-	-
506-ASS	06/09/94	30/F/Hetero	-	NR	-/-	-
508-JTS	06/09/94	37/M/Desc	+	NR	-/-	1.600
509-DDG	09/06/94	36/M/Desc	-	NR	-/-	-
510-LGRC	09/09/94	26/M/UDEV	+	NR	-/-	100
511-ACSP	09/09/94	29/M/Desc	-	NR	-/-	-
512-RS	09/09/94	43/M/Homo	-	NR	-/-	-
513-MSS	09/09/94	48/F/Desc	-	NR	-/-	-
515-MVS	09/09/94	63/M/Homo	-	NR	-/-	3.200
516-EOL	09/09/94	32/M/Homo	-	NR	-/-	-
518-AJM	09/09/94	46/M/Desc	-	NR	-/-	-
519-TLD	08/09/94	54/F/Hetero	-	NR	-/-	-
520-JSA	12/09/94	29/M/Homo	-	NR	-/-	-
521-ACA	12/09/94	51/F/UDEV	-	NR	-/-	-
522-LFF	12/09/94	40/M/Hetero	-	NR	-/-	-
524-JMA	13/09/94	40/M/Homo	+	NR	-/-	-
527-ICF	13/09/94	60/F/Desc	-	NR	-/-	-
528-AR	13/09/94	28/M/Hetero	-	NR	-/-	-
529-ABL	13/09/94	34/M/Desc	+	NR	-/-	1.600
530-MCS	13/09/94	29/F/Hetero	-	NR	-/-	100
531-SMBN	13/09/94	30/F/Hetero	-	NR	-/-	-
532-JOS	13/09/94	54/M/Hetero	-	NR	-/-	-
533-JPSL	13/09/94	30/F/Desc	-	NR	-/-	-
534-VLL	13/09/94	37/M/Desc	-	NR	-/-	-
535-MJCS	14/09/94	33/F/Hetero	-	NR	-/-	-
536-ASP	14/09/94	22/F/Hetero	-	NR	-/-	-
538-OFSF	14/08/94	52/M/Hetero	+	NR	-/-	25.600
539-KK	14/09/94	31/M/Hetero	-	NR	-/-	-
540-GFO	14/09/94	37/M/UDEV	-	NR	-/-	-
541-ANP	14/09/94	42/M/Desc	-	NR	-/-	-
543-HAS	14/08/94	46/M/Homo	-	NR	-/-	-
544-JMP	14/09/94	42/M/Hetero	-	NR	-/-	-
545-HP	14/09/94	30/M/Hetero	-	NR	-/-	400
546-WTF	14/09/94	31/M/Hetero	-	NR	-/-	100
547-MCF	14/09/94	34/F/Hetero	-	NR	-/-	100
548-JLP	14/09/94	31/M/Desc	-	NR	-/-	-
549-WS	14/09/94	34/M/Homo	-	NR	100/+	-
550-CML	15/09/94	33/F/Hetero	-	NR	-/-	-
551-EB	15/09/94	45/M/Hetero	+	NR	-/-	100
553-EBL	15/09/94	24/F/Hetero	+	NR	-/-	-

Idade em anos; Categoria de risco para adquirir a infecção HIV: Homossexual ou Bissexual, Heterossexual, Usuário de drogas endovenosas, Desconhecido

Casos em negrito desenvolveram KS durante estudo longitudinal de 5 anos.

* Resultados expressos segundo descrição em Material e Métodos

NR não realizado; - negativo; + positivo

Soros reagentes na IFI-Ramos, absorvidos com células HEp 2 e excluídos do cálculo de prevalência

■ Soros que resultaram IFI-LANA negativa após absorção com células HEp 2

AIDS

Volume 14 Number 10

<http://www.AIDSONline.com>

BASIC SCIENCE

1299 Lipopolysaccharide-induced HIV-1 expression in transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- α and interleukin-1, but not by interferon- γ nor interleukin-6
Jun Tanaka, Hidenori Ozaki, Jiro Yasuda, Reiko Horai, Yoichi Tagawa, Masahide Asano, Shinobu Saijo, Mitsunobu Imai, Kenji Sakikawa, Manfred Kopf and Yoichiro Iwakura

1309 Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection
Simon A Mallat, Mira John, Corey B. Moore, Ian R. James and Elizabeth J. McKinnon

1317 Effect of cytokines on HIV-induced depletion of thymocytes in vivo
Christel H. Uittenbogaart, W. John Boscardin, Deborah J. Anisman-Posner, Prasad S. Koka, Greg Bristol and Jerome A. Zack

CLINICAL

1327 Neurocognitive and psychological contributions to quality of life in HIV-1-infected women
Dana M. Osowiecki, Ronald A. Cohen, Kathleen M. Morrow, Robert H. Paul, Charles C.J. Carpenter, Timothy Flanigan and Robert J. Boland

1333 Importance of protease inhibitor plasma levels in HIV-infected patients treated with genotypic-guided therapy: pharmacological data from the Viradap Study
J. Durant, P. Clevenbergh, R. Garraffo, P. Hallon, S. Icard, P. Del Giudice, N. Montagne, J.M. Schapiro and P. Dellamonica

1341 Trial of oral fumagillin for the treatment of intestinal microsporidiosis in patients with HIV infection
Jean-Michel Molina, Jérôme Goguel, Claudine Sarfati, Jean-François Michiels, Isabelle Desportes-Livage, Sana Balkan, Claude Chastang, Laurent Colte, Caroline Maslo, Annie Struxiano, Francis Derouin, and Jean-Marie Decazes, for the ANRS 054 Study Group

1349 A randomized, double-blind trial of half versus standard dose of zidovudine plus zalcitabine in Thai HIV-1-infected patients (study HIV-NAT 001)
Eugène D.M.B. Kroon, Chaiwat Ungsedthapand, Kiat Ruxrungtham, Mena Chuenyam, Sasiwimol Ubolyam, Mark E. Newell, Remko van Leeuwen, Chayos Kuanusont, Supranee Baranapraditkul, Sunee Sirivichayakul, Joep M.A. Lange, David A. Cooper and Praphan Phanuphak

1357 Pre-HAART HIV burden approximates post-HAART viral levels following interruption of therapy in patients with sustained viral suppression
Hiroyu Hatano, Susan Vogel, Christian Yoder, Julia A. Metcalf, Robin Dewar, Richard T. Davey, Jr. and Michael A. Polis

1365 Cytokine profiles in seronegative volunteers immunized with a recombinant canarypox and gp120 prime-boost HIV-1 vaccine
Stefanie Sabbaj, Mark J. Mulligan, Ray-Hahn Hsieh, Robert B. Belshe, Jerry R. McGhee and the NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group

1375 A randomized, dose-finding study with didanosine plus stavudine versus didanosine alone in antiretroviral-naïve, HIV-infected Thai patients
Kiat Ruxrungtham, Eugène D.M.B. Kroon, Chaiwat Ungsedthapand, Somsong Teeratakulpisarn, Sasiwimol Ubolyam, Supranee Buranapraditkul, Remko van Leeuwen, Gerrit-Jan Weverling, Chayos Kuanusont, Joep M.A. Lange, David A. Cooper and Praphan Phanuphak

1383 Highly active antiretroviral therapy including protease inhibitors does not confer a unique CD4 cell benefit
The AVANTI and INCAS Study Groups

1389 Risk factors for preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth retardation in infants born to HIV-infected pregnant women receiving zidovudine
John S. Lambert, D. Heather Watts, Lynne McEnerson, E. Richard Stiehm, D. Robert Harris, James Bethel, Jean Whitehouse, Eleanor Jimenez, Jorge Gandia, Gwen Scott, Mary Jo O'Sullivan, Andrea Kovacs, Alice Stek, William T. Shearer, Hunter Hammill, Russell van Dyke, Robert Maupin, Maggie Silio and Mary Glenn Fowler for the Pediatric AIDS Clinical Trials Group 185 Team

1401 Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients
James G. Hakim, Innocent T. Gangaizoo, Robert S. Heyderman, Jens Mielke, Ebbah Mushangi, Albert Taziwa, Valerie J. Robertson, Praise Musvaire and Peter R. Mason

CONCISE COMMUNICATION

1409 Discontinuing or withholding primary prophylaxis against *Mycobacterium avium* in patients on successful antiretroviral combination therapy. The Swiss HIV Cohort Study
Hansjakob Furrer, Amalia Telenti, Marco Rossi, Bruno Ledergerber for the Swiss HIV Cohort Study

EPIDEMIOLOGY & SOCIAL

1413 High AIDS awareness may cause tuberculosis patient delay: results from an HIV epidemic area, Thailand
Jintana Ngamvithayapong, Anna Winkvist and Vinod Diwan

1421 Interventions to prevent vertical transmission of HIV-1: effect on viral detection rate in early infant samples
David T. Dunn, RJ Simonds, Marc Bulterys, Leslie A. Kalish, Jack Maye, Jr., Andrea de Maria, Christian Kind, Christoph Rudin, Erick Denamur, Anne Krivine, Clive Loveday and Marie-Louise Newell

1429 Syndromic treatment of sexually transmitted diseases reduces the proportion of incident HIV infections attributable to these diseases in rural Tanzania
Kate K. Orroth, Awena Gavyole, James Todd, Frank Moshia, David Ross, Ezra Mwijarubi, Heiner Grosskurth and Richard J. Hayes

1439 Evaluating changes in health status in HIV-infected patients: Medical Outcomes Study-HIV and Multidimensional Quality of Life-HIV quality of life questionnaires
Xavier Badia, Daniel Podzamczar, Alfonso Casado, Carmen López-Lavid C, Margarida García, and the Spanish MOS-HIV and MQOL-HIV Validation Group

EDITORIAL COMMENT

1449 Quality of life assessment comes of age in the era of highly active antiretroviral therapy
Albert W. Wu

CORRESPONDENCE
Listed inside

LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS

IAS INTERNATIONAL AIDS SOCIETY

PBMC cultured in the presence of the drug ($P < 0.001$), these levels (1300–28 000 pg/ml) are in accordance with the range required to block infection with some HIV isolates *in vitro* [2]. It is accepted that MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES play a beneficial role in the early phases of HIV infection *in vivo* by inhibiting macrophage tropic HIV-1 strains, and the CCR-5 co-receptor plays a major role in HIV infection. Because the isolation of HIV-1 for primary cultures was not systematically carried out, in the study no virus production was observed in untreated or AY 9944-treated cells. Further experiments are needed to investigate the capacity of resistance of treated cells to infection with primary isolates of HIV-1 [5,7]. To our knowledge, this is the first report indicating that the production of MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES β -chemokines was enhanced in PBMC derived from HIV-1-infected individuals after the *in-vitro* action of a chemical compound.

This finding suggests that AY 9944 and derived molecules may represent important candidates for therapies based on enhancing the level of resistance to HIV infection.

Ammar Achour, Université Pierre et Marie Curie, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France.
Laboratoire d'Oncologie et Virologie Moléculaires, Hôpi-

tal Laënnec, 42, Rue de Sévres 75340, Paris CEDEX 07, France.

Received 4 February 2000; accepted: 9 February 2000.

References

- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Mutsaers K. Properties of the novel proinflammatory supergene interleukin cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:617–648.
- Cocchi F, DeVico A, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8 $^{+}$ T cells. *Science* 1995; 270:1811–1815.
- Alkhatib G, Broderick C, Broder CC, et al. CCR-5 is a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272:1953–1958.
- Duigé T, Litwin V, Allaway GF, et al. HIV-1 entry into CD4 $^{+}$ cells is mediated by the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; 381:667–671.
- Potterat WA, Morin SR, Tie D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. *Nat Med* 1996; 2:412–417.
- MacLennan B, Barker E, Genco G, Rayne-Smith G, Levy JA. Do β chemokines have clinical relevance in HIV infection. *J Clin Invest* 1997; 100:921–930.
- Achour A, Landureau JC, Salomo-Concalves R, Mazzière JC, Zaayen D. Restoration of immune response by a cationic amphiphile (AY 9944) *in vitro*: a new approach to chemotherapy against immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Agents Chemother* 1998; 42:2402–2451.

Absence of an association between the presence of human herpesvirus 8 antibodies and the development of Kaposi's sarcoma in HIV-1-infected patients receiving antiretroviral therapy

Several months ago a preliminary study was conducted on the seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies in HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil [1], which showed that HHV-8 is easily transmitted by sexual routes, mostly among homosexual or bisexual men with AIDS. We have now expanded these data, and also searched for a possible prognostic value of these antibodies in predicting the development of Kaposi's sarcoma (KS) or primary effusion lymphoma in HIV/HHV-8 co-infected patients. Using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (HHV-8 IgG Antibody, Advanced Biotechnologies Inc., Maryland, USA), which contains HHV-8 whole virus extract obtained from the KS-1 cell line (derived from a body cavity lymphoma of an Epstein-Barr virus/HIV-negative patient), and according to the manufacturer's instructions, we detected antibodies to the majority of HHV-8 structural proteins in serum samples from a bank of the Immunology Department of Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. The samples belonged to a cohort of 493 HIV-1-infected patients seen at the Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, for whom the presence of human T cell leukemia/lymphoma virus (HTLV)-I and HTLV-II

infections was determined [2]. The patients have been followed at the Instituto de Infectologia Emílio Ribas since 1994, receiving medical and therapeutic care for opportunistic infections, and also antiretroviral therapy. They were first treated with transcriptase inhibitors, and from 1996 also with protease inhibitors.

The results obtained using HHV-8 serology in this group of patients confirmed our previous data [1]: an overall frequency of 17.2% (ranging from 34.1 to 0%, depending on the patients' risk factor for acquiring HIV-1 infection) was detected (Table 1). The highest percentage of seropositivity was observed among homosexual or bisexual men (34.1% of cases), followed by men with unknown risk factors (28.6%) and heterosexual men (15.8%). Of interest was the detection of HHV-8 seropositive cases among women (Table 1). As reported by Kedes *et al.* [3] and Zhang *et al.* [4], the blood route of HHV-8 transmission continues to be less important than the sexual routes (Table 1).

Looking for HHV-8-associated diseases in the medical records of the 493 patients, after a 5-year follow-up, we detected only 10 cases of KS, seven of which had

Table 1. Detection of HHV-8 antibodies among HIV-1-infected patients according to risk group.

Risk factor	Group	No. tested	HHV-8 seropositive (%)
Homosexual contact	Men	129	44 (34.1)
	Women	1	0
	Subtotal	130	44 (33.9)
Heterosexual contact	Men	101	16 (15.8)
	Women	127	9 (7.1)
	Subtotal	228	25 (10.9)
IVDU	Men	35	4 (11.3)
	Women	22	0
	Subtotal	57	4 (7.0)
Blood transfusion	Men	2	0
	Women	4	0
	Subtotal	6	0
Unknown	Men	35	10 (28.6)
	Women	17	2 (11.8)
	Subtotal	52	12 (23.1)
Total		493	85 (17.2)

HHV-8, Human herpes virus 8; IVDU, intravenous drug user.

previously been found to be HHV-8 seropositive. The other three cases probably acquired HHV-8 infection during follow-up. Of note was one HHV-8-seropositive patient who died of empyema, whose pleural effusion was completely negative for all bacterial culture analyses and who may have been a case of primary effusion lymphoma. Among the 10 KS cases, nine were homosexual or bisexual men and one was a male intravenous drug user.

The low percentage of KS cases (2%) in this cohort of patients contrasts with the high percentages (approximately 20%) detected before the start of antiretroviral therapy in this hospital, and indicates that if no change in the epidemiology or the treatment of AIDS had occurred, the high percentage of KS-AIDS would be maintained (see the percentage of HHV-8-seropositive cases among men from different sexual risk groups in Table 1). The results obtained thus suggest that HHV-8 antibodies have no value in predicting the development of KS in HIV-1-infected patients under antiretroviral therapy.

These data contrast with the first results obtained by Gao *et al.* [5] and Whitby *et al.* [6], who reported the detection of HHV-8 antibodies or DNA sequences in blood over the ensuing years as predictive markers of KS. Those studies were conducted before the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART), which seems in some way to control HHV-8 replication. In agreement with the present results, in the past few years some authors [7–9] have described the impact of antiretroviral drugs, mostly protease inhibitors, on the clearance of HHV-8 from the blood. We also observed a reduced detection of HHV-8 DNA

sequences in the blood of KS-AIDS patients under HAART in São Paulo (unpublished data).

The exact mechanism of HAART on HHV-8 clearance is not yet known, but it is thought that these drugs act indirectly on HHV-8, inhibiting HIV-1 replication and consequently diminishing the production of tat protein, which in turn regulates HHV-8 viral growth. In addition, during antiretroviral therapy, the immune system is partly restored and consequently HHV-8 could remain in latency.

In conclusion, this letter adds to the information concerning the major route of HHV-8 transmission among HIV-1-infected adult men and women, and supports the view that antiretroviral therapy could interfere with HHV-8 infection and its consequent related diseases. We are currently interested in detecting HHV-8 variants in patients presenting resistance to specific anti-herpesvirus therapy and HAART.

Adele Caterino-de-Araujo^a, Paulo H.L. Carbone^a, Fábio L.B. Martinelli^b, Elizabeth de los Santos-Fortuna^a, Abdiel A. Moreira^a, Jamal Suleiman^b and Luiz A.C. Barra^a. ^aDepartment of Immunology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil; and ^bInstituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, SP, Brazil.

Informed consent was obtained from patients, and the study was conducted in accordance with the human experimentation guidelines of the Instituto de Infectologia Emílio Ribas and Instituto Adolfo Lutz, Secretary of Health of São Paulo, SP, Brazil.

Sponsorship: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant no. 98/13313-5.

Received: 11 February 2000; accepted: 16 February 2000.

References

- Caterino-de-Araujo A, Calabro ML, Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chiosso-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1999; 179:1591–1592.
- Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Zandoná-Meleiro MC, *et al.* Sensitivity of two ELISA tests in relation to western blot in detecting HIV-1 and HIV-2 infections among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 38:173–182.
- Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Rothen R, Flood J, Ganeri D. The seroprevalence of human herpesvirus 8 (KSHV): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med* 1996; 2:918–924.
- Zhang X, Fitzpatrick L, Campbell TR, *et al.* Comparison of the prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Brazil and Colorado. *J Infect Dis* 1998; 178:1488–1491.
- Gao S, Emley L, Hoover DR, *et al.* Seroreversion in anti-

- Antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus related latent nuclear antigens before the development of KS. *N Engl J Med* 1996; 335:233-241.
6. Whiteby D, Howard ML, Tenzel-Florent M, et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 346:799-802.
 7. Rizzieri DA, Liu J, Tronick ST, Arshady GD. Clearance of HHV-8 from peripheral blood mononuclear cells with a protease inhibitor. *Lancet* 1997; 349:774-775.
 8. Leibel C, Blum L, Pellet C, et al. Clinical and biological impact of antiretroviral therapy with protease inhibitors on HIV-related Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1998; 12:F43-F49.
 9. Laine JC, Kumar NP, McLennan KA, et al. Effect of HIV-1 protease inhibitors on the clearance of HHV-8 from blood of HIV-1 infected patients. *J Med Virol* 2001; in press.

Stanford V regimen and concomitant highly active antiretroviral therapy is feasible and active in patients with Hodgkin's disease and HIV infection

Hodgkin's disease (HD) is the most common non-AIDS-defining tumour occurring in patients with HIV infection. All the available literature on the subject has documented unusually aggressive tumour behaviour in comparison with HD outside the HIV setting, including a higher frequency of unfavourable histological subtypes, advanced stages at presentation and poor therapeutic outcome [1]. The most commonly employed chemotherapy regimens for HD, i.e. doxorubicin-bleomycin-vinblastine-decarbazine (ABVD) and mechlorethamine-oncovin-procarbazine-prednisolone (MOPP), have not been able to achieve such high complete response, disease-free survival and overall survival rates as in the general population [2].

In order to improve the outcome of these patients, we performed a phase II study with Stanford V, a short-term (12 week) intensive chemotherapy regimen with adjuvant radiotherapy employed in unfavourable HD in the general population, with excellent complete response, disease-free survival and overall survival rates [3]. Table 1 shows the drug dose applied and the schedule. Highly active antiretroviral therapy (HAART) was given concomitantly with chemotherapy, which was selected according to the patients' previous antiretroviral exposure irrespective of the CD4 cell count and HIV viral load. The combined chemotherapy and HAART approach was tested successfully by our group in patients with HIV-related non-Hodgkin's lymphoma [4].

Granulocyte colony-stimulating factors were adminis-

tered prophylactically from days 3 to 13 and from days 17 to 26 in every cycle. Moreover, all patients received *Pneumocystis carinii* pneumonia and fungal prophylaxis.

From May 1997 to June 1999, 20 patients (19 men and one woman) were treated in seven centres participating in the European Intergroup Study HD-HIV. The median age of the patients was 36 years (range 28-56). In accordance with the epidemiology of AIDS in Italy, half of the patients were intravenous drug users. Only three patients (15%) had been diagnosed with AIDS before starting chemotherapy (two patients with oesophageal candida and one patient with *Pneumocystis carinii* pneumonia). The median CD4 cell count was 230/ μ l (range 45-468) and 10 out of 20 (50%) patients had a detectable HIV viral load (median 30 785 copies/ μ l, range 60-455 000). The median performance status according to ECOG was 1 (range 0-3). As for the HD histological subtype, the distribution was as follows: mixed cellularity in nine (45%) cases, nodular sclerosis in six (30%) and lymphocyte depletion in one (25%). In four cases the histological subtype was not determined. Stage II was detected in five (25%) patients, stage III in five (25%) and stage IV in 10 (50%) cases. Fourteen out of 20 patients (70%) had B symptoms. Half of the patients had extranodal involvement, in particular in the bone marrow in all patients involved and in the liver in two patients. Overall, Stanford V was well tolerated and 11 out of 20 (55%) patients completed treatment, with no dose reduction and no delay in the administration of chemotherapy. In eight patients (40%) the dosage of all drugs except prednisone had to be reduced to 75% of the planned dose, because of constipation in three cases (grade 3), paraesthesia in three (two G2 and one G3), bone marrow toxicity in one patient, and worsening performance status in another. In only one patient, who had developed life-threatening sepsis, was chemotherapy definitely discontinued after the second cycle. No toxic deaths were observed. All patients except two experienced G3-G4 bone marrow toxicity and seven (35%) developed febrile neutropenia treated with intravenous antibiotics. Sepsis occurred in only two cases. As far as extra-haematological toxicity was concerned, nine patients had mucositis (G2 in six cases and G3 in three cases).

Table 1. Stanford V chemotherapy regimen.

Drug	Dose	Schedule*
Mechlorethamine	6 mg/m ² i.v.	Day 1
Doxorubicin	25 mg/m ² i.v.	Days 1 and 15
Vinblastine	6 mg/m ² i.v.	Days 1 and 15
Vincristine	2 mg i.v.	Days 8 and 22
Bleomycin	3 U/m ² i.v.	Days 8 and 22
Etoposide	60 mg/m ² i.v.	Days 15 and 16
Prednisone	40 mg/m ² p.o.	Every other day

*The cycle was repeated every 28 days for three cycles. i.v., intravenously; p.o., by mouth (per os).