

Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção

ISSN 2238-3360 | Ano III - Volume 3 - Número 4 - 2013 - Out/Dez



ARTIGO ORIGINAL

Avaliação sorológica de HIV por técnicas de ELISA de quarta geração *HIV serology using fourth-generation ELISA techniques*

Aline Daniele Schuster¹, Michelle Larissa Zini Lise², Jairo Luis Hoerlle³¹Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.³Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brasil.

Recebido em: 07/08/2013

Aceito em: 11/12/2013

schuster.alined@gmail.com

RESUMO

Justificativa e Objetivos: Desde a introdução, em meados da década de 1980, o teste de HIV melhorou gradualmente, em termos de sensibilidade e especificidade. Visando comparar duas metodologias de teste imunoenzimático (ELISA) de 4ª geração para identificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi realizado um estudo das técnicas utilizadas em um centro hemoterápico para sua determinação. **Métodos:** estudo retrospectivo descritivo das técnicas de ELISA de 4ª geração, onde foram analisados todos os resultados gerados a partir das amostras de sangue obtidas de doadores com idade de 16 a 68 anos conforme a legislação vigente, que compareceram a um banco de sangue regional no período de novembro de 2010 a outubro de 2011. **Resultados:** A partir de 8.475 amostras colhidas através da doação de sangue, 06 destas foram reagentes ou inconclusivas para testes de triagem, sendo então analisadas por um teste confirmatório, o Western Blot, onde dentre estas apenas uma foi confirmada como reagente para o vírus. **Conclusão:** Diversos fatores influenciam na positividade de amostras em triagens, tais como, tipo de teste utilizado, janela imunológica, o uso de antirretrovirais, além de fatores biológicos pessoais dos indivíduos infectados. A eficácia dos testes de triagem de HIV deve ser determinada e a metodologia aprimorada a fim de que se possa determinar com segurança a existência ou não de contaminação dos materiais derivados que serão utilizados posteriormente. São necessárias várias pesquisas para aprimorar cada vez mais os testes de triagem e dar a devida ênfase a fatores que se evidenciaram na distorção dos resultados.

DESCRITORES

Diagnóstico
ELISA
HIV
Transfusão sanguínea

ABSTRACT

Background and Objectives: Since its introduction in the mid-1980s, HIV testing has gradually improved in terms of sensitivity and specificity. A study was carried out to assess the techniques used in a hemotherapy center for human immunodeficiency virus (HIV) identification using two 4th-generation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. **Methods:** descriptive and retrospective study of 4th-generation ELISA techniques, which analyzed all the results generated from blood samples obtained from donors aged 16 to 68 years, according to current legislation, who attended a regional blood bank from November 2010 to October 2011. **Results:** Of 8,475 samples collected through blood donation, 06 were positive or inconclusive at the screening tests and were then analyzed through Western Blot confirmatory test, which confirmed one of them was reagent for the virus. **Conclusion:** Several factors influence positive results of screening samples, such as type of test used, the immunological window, use of antiretroviral drugs, and personal biological factors of infected individuals. The effectiveness of HIV screening tests should be determined and the methodology improved, so that it can establish with certainty the existence or not of contamination of blood products that will be used later. More research is needed to constantly improve the screening tests and give adequate emphasis to factors that have shown to alter results.

KEYWORDS

Diagnosis
ELISA
HIV
Blood transfusion

INTRODUÇÃO

A Síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), causada pela infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), foi identificada no início da década de 1980. O HIV é um retrovírus que contém ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentiviridae*, diferenciando-se em tipo 1 e 2.¹ O tipo HIV-1 é mais patogênico e prevalente no mundo, enquanto que o HIV-2 é endêmico na África Ocidental e vem se disseminando pela Ásia. Ambos são transmitidos pelas vias sexual, parenteral ou vertical.²

O HIV-1 é classificado em três grupos, o M (*main*) responsável pela maioria das infecções, o O (*outlier*) e o N (*new*). Na atualidade, nove subtipos puros e 43 formas recombinantes do grupo M são reconhecidos incluindo subsubtipos (A1, A2, F1 e F2). O grupo O é o mais prevalente, representando aproximadamente 56% das infecções no mundo. A infectividade do HIV-1 depende da sua carga viral e da presença de células infectadas com o vírus em fluidos corporais, embora os requisitos para transmissões virais e de célula para o HIV-1 permaneçam pouco compreendidos.³

A SIDA é um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil⁴ e do mundo. Globalmente, cerca de 34 milhões de pessoas já possuíam a infecção e na América do Sul, mais de 2,0 milhões de adultos e crianças possuem a síndrome em 2011. Apenas no Brasil os casos de SIDA atualizados até junho de 2010 contabilizavam 592.914 novos casos desde 1980, quando o HIV foi identificado. A incidência tem variado em torno de 20 casos de novas infecções para cada 100 mil habitantes. Apesar do número de novas infecções vir diminuindo globalmente, a infecção pelo HIV em 2011 foi de 2,5 milhões, 20% menor do que em 2001.⁵

Embora a transmissão do vírus HIV seja preponderantemente sexual, a contaminação por transfusão sanguínea também é preocupante, pois, a despeito da sensibilidade dos testes sorológicos de triagem, há o risco de contágio especialmente na fase de janela imunológica da infecção, quando os anticorpos estão presentes em níveis baixos e indetectáveis. Assim, a contaminação por esta via tem ocasionado grande temor na população em relação à segurança nos serviços hemoterápicos.⁶

A infecção pelo vírus HIV pode ser dividida em quatro fases clínicas: infecção aguda, fase assintomática, também conhecida como latência clínica, fase sintomática inicial ou precoce e AIDS. A infecção aguda ocorre em cerca de 50% a 90% dos casos. O tempo entre a infecção pelo HIV e o aparecimento de sinais e sintomas, na fase aguda, é de 5 a 30 dias. O período de latência clínica, após a infecção aguda, até o desenvolvimento da imunodeficiência é longo, em média de seis anos.⁷ Caracterizada pela estabilização da viremia de acordo com a velocidade da replicação e de depuração viral.⁸

Anticorpos contra o vírus HIV aparecem principalmente no soro ou plasma de indivíduos infectados, em média, 3 a 12 semanas após a infecção. O período compreendido entre o início da infecção e a detecção dos anticorpos é denominado de janela imunológica.⁹ A infectividade na fase aguda é até 43 vezes maior do que na fase latente.¹⁰ Esta fase caracteriza-se tanto por viremia elevada, quanto por resposta imune intensa e consequentemente rápida queda na contagem de linfócitos CD4+ de caráter transitório.⁷

O diagnóstico sorológico da infecção por HIV é realizado a partir de métodos que detectam a presença de anticorpos e ou antígenos específicos para HIV-1. Com o objetivo de encurtar cada vez mais o período sem diagnóstico laboratorial, conhecido como janela imunológica, os testes de detecção do genoma viral,

chamados testes de ácidos nucleicos (NAT),¹² foram implantados na triagem sorológica de agentes patogênicos transmissíveis por transfusão, principalmente para os vírus HIV. Desde a sua introdução em meados dos anos 1980, os testes de HIV com detecção combinada de antígenos/anticorpos tem melhorado gradualmente, tanto em termos de sensibilidade quanto de especificidade.¹³ No Brasil, alguns serviços hemoterápicos da rede privada também já utilizam a tecnologia genômica na rotina de triagem laboratorial de doadores de sangue.¹⁴ De acordo com a Portaria nº 1.353 de 13 de junho de 2011, a partir de dezembro de 2011, todos os centros hemoterápicos deveriam utilizar NAT, sendo possível a realização de exames em *pool* de amostras de sangue com esta metodologia.¹⁵

Segundo o Regulamento Sanitário para Serviços relacionados ao ciclo produtivo do sangue humano, componentes e procedimentos transfusionais, o RDC nº 57/2010, em toda doação deve ser realizado obrigatoriamente testes laboratoriais de triagem de alta sensibilidade para detecção de marcadores de doenças infecciosas, dentre eles o HIV-1 e o HIV-2. Estes devem ser testados em dois testes em paralelo, em uma mesma metodologia, sendo um teste para detecção de anticorpos anti-HIV-1 e 2, que incluía a detecção do grupo O, e um teste para detecção combinada de antígeno/anticorpo. Nos casos de resultados reagentes ou inconclusivos nos testes sorológicos de triagem, o serviço de hemoterapia deve repetir os testes iniciais em duplicata, na mesma amostra da doação. Se esta persistir reagente ou inconclusiva, deverão ser encaminhadas amostras para laboratórios de referência para confirmação com uso de outra metodologia.¹⁶

O teste imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA), específico para anti-HIV realizado por ensaio de imunoabsorbância por ligações enzimáticas tem alta especificidade e sensibilidade.¹⁷ Assim é classificado como um teste de triagem, pois tem como função detectar todos os indivíduos infectados com HIV, produzindo poucos resultados falso-negativos. Seu princípio consiste na detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos virais (usualmente anti-p24, gp41 e/ou gp120). Recentemente, ensaios para detecção de antígenos (p24) também têm sido introduzidos, o que reduz a "janela imunológica" em aproximadamente uma semana, sendo denominados como testes de 4ª geração.¹¹

Testes de ELISA com resultados positivos devem ser confirmados por testes como o Western Blot (WB). O WB detecta proteínas específicas seja a partir de amostras biológicas como aquelas obtidas por recombinação gênica. A técnica consiste na eletroforese de proteínas virais, antígenos, em um gel de poliacrilamida. Estes antígenos virais separados pela eletroforese são transferidos para uma membrana de nitrocelulose e posteriormente incubados com o soro do paciente.¹¹

Nesta técnica, os componentes virais se distribuem de acordo com seus pesos moleculares.¹⁸ Este ensaio compartilha alguns princípios do ELISA com a vantagem de identificar anticorpos específicos para diferentes antígenos virais do HIV, anticorpos dirigidos contra proteínas virais codificadas por diferentes genes, a saber: core (p17,p24,p55), env (gp160/120, gp41) e pol (p31,p51,p66). O WB não deve ser utilizado como um teste de triagem em decorrência de seu alto percentual de resultados falso positivos (>2%), por ser muito sensível e detectar pequenas quantidades das proteínas pesquisadas. Assim 4 a 20% das amostras que são reativas no ELISA HIV são interpretadas como indeterminadas pelo WB.⁶

Este estudo tem a finalidade de realizar a comparação da eficiência da metodologia de ELISA de 4ª geração em centros hemoterápicos.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo descritivo, no qual foram analisados os resultados das 8475 amostras de sangue de todos os doadores de um banco de sangue da Região dos Vales no estado do Rio Grande do Sul coletadas de novembro de 2010 a outubro de 2011. Foram incluídos no estudo dados de doadores com idade entre 16 e 68 anos e excluídas todas aquelas amostras testadas com ELISA de 3ª geração.

Foram avaliados os resultados dos testes de HIV realizados com ELISA de 4ª geração de duas marcas distintas. As empresas fabricantes dos kits foram preservadas, quanto a identificação utilizando-se apenas a descrição "A" e "B". A empresa "A" utiliza o teste de ELISA baseado no princípio de sanduíche de antígenos: gp160, peptídeo ANT70 de HIV-1 grupo-O, peptídeo *env* do HIV-2 e anticorpos anti-p24 do HIV-1 associados à presença de uma esfera de conjugado em cada poço de microelisa. A empresa "B" utiliza também o teste de ELISA baseado no princípio de sanduíche de antígenos e anticorpos, porém sem a presença de esfera. Utiliza uma combinação de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos contra anticorpos para gp41 de HIV-1, gp41 de HIV-1 grupo-O, gp36 de HIV-2 e anticorpos monoclonais contra p24. As amostras com resultado reagente no teste de triagem de 4ª geração foram encaminhadas para análise pelo Western Blot (WB), em laboratório terceirizado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Univates sob protocolo número 0342/2010.

RESULTADOS

Do total de amostras analisadas no período do estudo, 6 obtiveram resultados positivos ou inconclusivos para HIV, as quais foram encaminhadas para realização do WB. Destas seis, apenas uma amostra foi confirmada como reagente. Estas amostras foram analisadas e classificadas de acordo com pontos de corte, chamados *cut off* (CO), estes variam conforme os controles negativos e positivos. A tabela 1 mostra o perfil dos doadores e dos resultados dos exames positivos em ELISA com o teste A, B e WB.

DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas houve crescimento considerável da preocupação com a garantia da segurança transfusional, desencadeada principalmente pelo surgimento da epidemia de AIDS. No Brasil, estima-se que a taxa de descarte sorológico nos bancos de sangue nacionais varia de 10% a 20%, apresentando-se

mais alta do que em países desenvolvidos, principalmente devido à alta porcentagem de pessoas que doam pela primeira vez e que apresentam uma prevalência de infecções próxima à da população em geral, pois não realizam testes de triagem frequentemente.¹⁹

Para se obter segurança dos produtos sanguíneos a serem utilizados em transfusões, rígidos parâmetros de qualidade devem ser seguidos. De acordo com a Portaria nº 1.353 de 13 de junho de 2011, os serviços de hemoterapia deverão adotar ferramentas de boas práticas para a avaliação, manipulação e monitoração, que garantam a qualidade dos serviços prestados. O controle do processo da triagem sorológica deverá compreender desde validação inicial, validação dos lotes, monitoramento diário, calibração periódica de equipamentos, bem como, manutenção preventiva e corretiva. O controle de qualidade interno positivo e o controle de qualidade interno negativo deverão ser adquiridos utilizados diariamente com a finalidade de evidenciar a perda da sensibilidade dos ensaios, identificarem variações lote a lote, detectar erros aleatórios ou sistemáticos entre outros.¹⁵

Entretanto não podemos descartar a importância de um teste com *cut off* seguro. De acordo com dados da Tabela 1, vemos que a amostra F, apresentou densidades ópticas aumentadas caracterizando a amostra positiva já nos testes de triagem. Tal fato não se verificou nas outras amostras. É possível observar que no teste A, os valores de *cut off* são lineares e semelhantes, já do teste B estes valores variam, porém é necessário lembrar que todas as amostras testadas passaram pelo mesmo processo que os controles, então esta variação não interfere na sensibilidade e especificidade do teste de acordo com os fabricantes dos testes.

Com o aumento da sensibilidade pelo ELISA de 4ª geração, através de pesquisa da proteína viral p24, foi evidente o aumento no tempo de detecção de carga viral diminuída. Esta lacuna é compreensível, porque a área da superfície da fase sólida para a detecção é constante e limitada, independentemente se é utilizado para um único teste ou testes combinados. No entanto, isso não significa que ELISA para detecção de antígeno p24 não possua deficiências. A proteína viral p24 é um marcador transitório que pode cair para um nível indetectável após a infecção aguda inicial e só ressurge na fase avançada da AIDS em pacientes. Assim, os testes utilizando este marcador são mais valiosos para situações de triagem de sangue de indivíduos, que não possuem níveis detectáveis de anticorpos, detectando infecções no início, através do antígeno viral de pessoas que foram expostas, auxiliando também no monitoramento da terapia antirretroviral.²⁰

O risco de transmissão diminui consideravelmente durante o uso de antirretrovirais, em cerca de 6,6 milhões de pessoas já

Tabela 1. Dados doadores reagentes/inconclusivos nos testes de triagem e confirmados através de Western Blot.

	Idade	Sexo	Estado civil	Teste A DO/CO	Teste B DO/CO	Teste ELISA 4ª geração	Western Blot
A	38	F	União estável	0.339/0.165	0.039/0.356	Inconclusivo	Não Reagente
B	31	M	União estável	0.131/0.157	0.330/0.437	Reagente	Não Reagente
C	42	F	União estável	0.047/0.147	0.760/0.143	Inconclusivo	Não Reagente
D	28	F	Solteiro	0.157/0.154	0.028/0.196	Inconclusivo	Não Reagente
E	55	F	Divorciada	0.164/0.163	0.043/0.467	Inconclusivo	Não Reagente
F	30	F	União estável	2.879/0.151	2.320/0.190	Reagente	Reagente

DO: Densidade Óptica; CO: Cut Off

estão utilizando antirretrovirais dentre as 34 milhões de pessoas infectadas globalmente.²¹ Pois a infectividade está relacionada com a concentração de RNA do HIV no soro, sendo que quando a presença de RNA não é mensurada em exames laboratoriais, o risco de transmissão é praticamente zero. Todos os dados epidemiológicos e laboratoriais indicam que a utilização da terapia antirretroviral pode diminuir significativamente o risco de transmissão, pois há a diminuição de carga viral. Entretanto os anticorpos continuam presentes, sendo normalmente detectados. Porém crianças que utilizam a terapia antirretroviral desde seu nascimento podem ter anticorpos em níveis indetectáveis, em uma carga viral constantemente muito baixa, tornando-se negativo nos testes de triagem.¹⁸ De acordo com um relato de caso o tratamento antirretroviral, mesmo em uma criança gravemente sintomática e imunossuprimida, pode resultar em supressão da replicação viral, tal que anticorpos específicos de HIV-1 não são detectáveis. Em consequência pode ser erroneamente identificada como sendo HIV negativo, e isso tem implicações sobre a segurança dos produtos de sangue e doação de órgãos.⁹

Existe um período curto de 2 a 5 dias, em que ELISA de 3ª geração é positiva e o teste de Western Blot é negativo. Quando usado o teste de triagem de 4ª geração, este período aumenta, pois a carga viral circulante esta aumentada e ainda não houve produção de anticorpos, sendo que após um período de 3 a 7 dias o ELISA ainda é positivo e o WB indeterminado.¹⁸

Para a reatividade específica para o HIV é necessário pelo menos duas proteínas p24, gp41, e gp120/gp160 para a interpretação como um resultado positivo no WB. Pois de vez em quando há perfis de reatividade que não são compatíveis, portanto, produz resultados indeterminados, que muitas vezes refletem o status sorológico real do indivíduo, como infecção aguda do HIV-1 ou HIV-2, porém há alguns fatores que interferem nos resultados, pois as proteínas são encontradas somente no HIV.²⁰

Segundo o Ministério da Saúde,⁶ quando um indivíduo tem um resultado positivo no teste de ELISA, negativo ou indeterminado no teste de WB, ele pode estar na fase de soro conversão. A coleta da amostra 30 dias após a primeira, confirma o resultado. Isto não acontece nos indivíduos com resultados falso-positivos ou a reatividade inicial desaparece ou é mantida sem soro conversão.

Há fatores biológicos que causam resultados falso-positivos na pesquisa de anticorpos anti-HIV, incluindo os testes ELISA e WB, dentre outros. Sendo elas artrite reumatóide; Doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, doenças do tecido conectivo e esclerodermia; Colangite esclerosante primária; Terapia com interferon em pacientes hemodialisados; Síndrome de Stevens-Johnson; Anticorpo antimicrosomal (anti-TPO); Anticorpos HLA; Infecção viral aguda; Aquisição passiva de anticorpos anti-HIV (de mãe para filho); Neoplasias malignas; Outras retrovírus; Múltiplas transfusões de sangue; Anticorpos anti-músculo liso.¹¹

Observou-se em estudos, de acordo com Malm et al¹³ que amostras de soro conversão do HIV tipo 1 foram detectadas mais cedo, com os ensaios onde há a pesquisa de antígenos e anticorpos em comparação com testes de pesquisa de somente anticorpos. Essa melhoria pode ser de grande importância na transfusão de sangue, pois demonstraram que o período de janela a partir da data de infecção para a detecção é reduzida se comparada com testes que pesquisam somente anticorpos.¹³

Segundo o Ministério da Saúde,⁶ é necessário ter em vista

que o sistema imunológico de cada indivíduo responde de forma diferente à infecção do HIV. O desenvolvimento de anticorpos anti-HIV ou da replicação viral em quantidade suficiente para ser detectada pelos métodos de diagnóstico utilizados é dependente da resposta individual, onde o tempo de janela imunológica varia de indivíduo para indivíduo. Conclui-se que são necessárias várias pesquisas para aprimorar cada vez mais os testes de triagem para doenças virais, em especial o HIV. Em centro hemoterápicos, seria fundamental a pesquisa dos fatores relacionados à distorção dos resultados obtidos nos testes de triagem, através de entrevistas mais detalhadas, questionamentos adequados e pertinentes para avaliar o perfil dos doadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Coordenador do Centro Hemoterápico do Vale do Taquari que permitiu a realização do estudo, as colegas Fernanda Marca, Leila Dahmer e Kesiane da Costa pelas críticas, discussões, apoio e incentivo para concretização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Peçanha EP, Antunes OAC, Tanuri A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Quim. Nova.* 2002;25(6B):1108-16.
2. Lazzarotto AR, Deresz LF, Sprinz E. HIV/AIDS e treinamento concorrente: a revisão sistemática. *Rev Bras Med Esporte.* 2010;16(2):149-54.
3. Silva GK, Guimarães R, Mattevi VS, et al. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS.* 2011; 25(4): 411-8.
4. Silva SFR, Pereira MRP, Neto RM, et al. Aids no Brasil: uma epidemia em transformação. *Rev. bras. anal. clin.* 2010;42(3):209-212.
5. UNAIDS. Global Report. UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2012. WHO Library Cataloguing, 2012.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
8. Ribeiro AS, Borges HCBG. Confecção de painel sorológico para controle da qualidade de conjuntos de diagnósticos para detecção do anti - HIV. [monografia]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Coordenação do Programa de Pós - Graduação Lato Sensu, 2006.
9. Neubert J, Laws HJ, Adams O, et al. HIV-1 seroreversion following antirretroviral therapy in an HIV-infected child initially presenting with acquired immunodeficiency syndrome. *AIDS.* 2010;24(2):327-8.
10. Shelton JD. A tale of two-component generalised HIV epidemics. *Lancet.* 2010;375(9719):964-6.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Implicações Éticas do Diagnóstico e da Triagem Sorológica do HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
12. Neto CA, Júnior AM, Salles NA, et al. O papel do médico na redução do risco residual da transmissão do vírus da

- imunodeficiência humana (HIV) por transfusão de sangue e hemocomponentes. *Diagn Tratamento*. 2009;14(2):57-61.
13. Malm K, Sydow M, Andersson S. Performance of three automated fourth-generation combined HIV antigen/antibody assays in large-scale screening of blood donors and clinical samples. *Transfus Med*. 2009;19(2):78-88.
 14. Lajolo CP, Júnior DML, Júnior JFCM. HIV - Negative ELISA and positive NAT: a reality in Blood Banking. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):330-1.
 15. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 1353 de 13 de junho de 2011, que aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. Brasil: Ministério da Saúde, 2011.
 16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010, que determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Brasil: Ministério da Saúde, 2010.
 17. Harmening D. *Técnicas Modernas em Bancos de Sangue e Transfusão*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2006.
 18. Vernazza P, Hirschel B, Bernasconi E, Flepp M. Les personnes séropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antirétroviral efficace ne transmettent pas le VIH par voie sexuelle. *Bulletin des médecins suisses | Schweizerische Ärztezeitung | Bollettino dei medici svizzeri*. 2008;89:5.
 19. Ferreira DM, Griza D, Sisti E. Análise dos aspectos epidemiológicos, hematológicos e sorológicos presentes em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Cruz Alta. *Rev. bras. anal. clin.* 2012;44(1):10-4.
 20. Guan M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in Western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(6):649-59.
 21. Shelton JD. HIV/AIDS. ARVs as HIV prevention: a tough road to wide impact. *Science*. 2011;334(6063):1645-6.